HAL
open science

Analogues peptidiques marqués au gallium-68 pour l'imagerie TEP des récepteurs membranaires couplés aux protéines G

Aurelie Prignon

To cite this version:

Aurelie Prignon. Analogues peptidiques marqués au gallium-68 pour l'imagerie TEP des récepteurs membranaires couplés aux protéines G. Imagerie. Université Paris-Saclay, 2017. Français. NNT : 2017SACLS552 . tel-02156041

HAL Id: tel-02156041

https://theses.hal.science/tel-02156041

Submitted on 14 Jun 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT: 2017SACLS552

Analogues peptidiques marqués au gallium-68 pour l'imagerie TEP des récepteurs membranaires couplés aux protéines G

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-sud

École doctorale n°582 CBMS

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 21 décembre 2017 par

Aurélie Prignon

Composition du Jury :

Martin SCHLUMBERGER Professeur à l'Université Paris Saclay	Président
François DAVODEAU Chargé de Recherche Inserm, Université de Nantes	Rapporteur
Roger LACAVE Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
Patricia FORGEZ Directrice de Recherche Inserm, Université Paris Descartes	Examinatrice
Jacques BARBET Directeur de Recherche Inserm, Université de Nantes	Examinateur
Jean-Noël TALBOT Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie	Directeur de thèse
Anne GRUAZ-GUYON Directrice de Recherche Inserm, Université Paris Diderot	Invitée, co-encadrante

Thèse de doctorat

Titre : Analogues peptidiques marqués au gallium-68 pour l'imagerie TEP des récepteurs membranaires couplés aux protéines G

Mots clés : Récepteurs membranaires couplés aux protéines G (RCPG), neurotensine, bombésine, gallium-68, imagerie TEP, cancer.

Ces dernières années, le ciblage des RCPG avec des ligands radiomarqués est devenu très important en imagerie nucléaire, notamment avec le remplacement progressif d'analogues peptidiques de la somatostatine marqués à l'^{111}In pour la TEMP par d'autres marqués au ^{68}Ga pour l'imagerie TEP qui présente une meilleure efficacité diagnostique. Les récepteurs de haute affinité de la bombésine (GRPR) ou de la neurotensine (NTR1) sont eux aussi des RCPG surexprimés par les cellules tumorales par rapport au tissu sain. Le GRPR est surexprimé dans 83% des carcinomes mammaires canalaires estrogènes dépendants. Dans la première partie de ce travail, nous avons démontré qu'un agoniste du GRPR, l'AMBA marqué au ^{68}Ga, permettait la détection en TEP d'un modèle murin de cancer du sein humain estrogène-dépendant et qu'il permettait de prédire la réponse tumorale à une hormonothérapie de manière plus sensible que le ^{18}F-FDG.
L'équipe du Dr. Gruaz-Guyon a développé de nouveaux radioligands analogues de la neurotensine pour le ciblage des tumeurs exprimant le NTR1 et a étudié les propriétés de ces peptides marqués à l'^{111}In dans un modèle de tumeurs d'adénocarcinome colique surexprimant le NTR1. L'obtention d'images TEMP de contraste élevé, permettant une détection des greffes tumorales dans des temps courts après injection, a conduit cette équipe à envisager ce traceur peptidique pour l'imagerie TEP. Dans la seconde partie de ce travail, nous avons réalisé le radiomarquage au ^{68}Ga du meilleur de ces dérivés (DOTA NT20.3) et évalué son potentiel pour l'imagerie TEP et la détection de tumeurs d'adénocarcinome colique. La surexpression de NTR1 a été démontrée dans plusieurs autres cancers comme l'adénocarcinome pancréatique (PDAC) (75-88%). Nous avons donc voulu étudier l'expression du NTR1 dans une tumorothèque locale de PDAC. Nous avons ensuite démontré le potentiel du ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 pour l'imagerie TEP dans deux modèles murins de PDAC humains. Nous avons caractérisé sa biodistribution, évalué sa spécificité in vivo et l'avons comparé au ^{18}F-FDG, notamment pour valider sa capacité à discriminer in vivo la pancréatite de l'adénocarcinome pancréatique.

Title: PET imaging of G protein-coupled membrane receptors with ^{68}Ga radiolabelled peptides

Key words: G protein-coupled membrane receptors (GPCR), neurotensin, bombesin, gallium-68, PET imaging, cancer.

In recent years, the targeting of G protein-coupled membrane receptors (GPCRs) with radiolabelled ligands has become very important in nuclear imaging, particularly with the progressive replacement of somatostatin analogues labelled with ^{111}In for SPECT by others labelled with ^{68}Ga for PET imaging, which improves diagnostic efficacy. High-affinity bombesin receptors (GRPR) or neurotensin receptors (NTR1) are also GPCRs overexpressed in many cancers as compared with normal tissue. GRPR is overexpressed in 83% of oestrogen-dependent ductal carcinomas. In the first part of this work, we demonstrated that ^{68}Ga-AMBA, an agonist ligand of GRPR, allowed the PET detection of a mouse model of oestrogen-dependent breast cancer and could be more sensitive than ^{18}F-FDG to predict and monitor tumour response to hormone therapy.
Dr. Gruaz-Guyon's team has developed new neurotensin radioanalogues for targeting NTR1-positive tumours. They studied the properties of these ^{111}In-labeled peptides in a model of colon adenocarcinoma overexpressing NTR1. Obtaining high-contrast images allowing the detection of cancer within a short time after injection, this team subsequently developed this peptide radiotracer for PET imaging. In the second part of this work, we carried out the ^{68}Ga radiolabelling of the best-performing of these derivatives and evaluated its potential for PET imaging of colon adenocarcinoma in a tumour model. Overexpression of NTR1 has been demonstrated in several human cancers such as PDAC (75-88%). We characterized the expression of NTR1 using specimens of human pancreatic cancer and then demonstrated the potential of this PET radiotracer to image two mouse models of human PDAC. We characterized its biodistribution, assessed its specificity in vivo in comparison with ^{18}F-FDG, in particular its ability to discriminate in vivo pancreatitis from pancreatic adenocarcinoma.

REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer cette thèse

Au Président du jury

Monsieur Martin Schlumberger
Professeur à l'Université de Paris Saclay
Professeur Hospitalier, chef du service de médecine nucléaire de l'Institut Gustave Roussy
Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury.

Aux membres du jury

Monsieur Roger Lacave
Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie
Professeur Hospitalier, responsable de l'Unité de Génomique des tumeurs solides
Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur, merci pour votre bienveillance à mon égard.

Monsieur François Davodeau
Chargé de recherche dans l'UMR-S 1232 au Centre de recherche en cancérologie et immunologie Nantes-Angers
Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur.

Madame Patricia Forgez
Chargé de recherche dans UMR-S 1007 "Homéostasie Cellulaire et Cancer"
Groupe Facteurs de croissance et hormones stéroïdiennes : développements thérapeutiques
Je vous remercie pour votre disponibilité, votre soutien et votre participation active à l'écriture du 3ème article, j'espère que nous pourrons continuer à travailler ensemble sur la neurotensine.

Monsieur Jacques Barbet
Directeur de recherche au CNRS
Directeur du Groupement d'Intérêt Public (GIP) ARRONAX (accélérateur pour la recherche en radiochimie et en oncologie de Nantes Atlantique)
Je vous remercie pour votre disponibilité et vos relectures de mes travaux
J'espère que votre peptide apportera une avancée considérable aux patients en médecine nucléaire.

Monsieur Jean-Noël Talbot
Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie
Professeur Hospitalier, chef du service de médecine nucléaire de l'hôpital Tenon
Je vous remercie d'avoir dirigé mes travaux de thèse
Un grand merci pour votre disponibilité, votre écoute et votre patience ainsi que pour la transmission de tout votre savoir
Merci d'avoir toujours cru en moi.

Madame Anne Gruaz-Guyon
Directrice de recherche U773 INSERM. Responsable de l'équipe « Ciblage radioisotopique de récepteurs: diagnostic et thérapie »
Reçois mes remerciements les plus sincères pour toutes les connaissances que tu m'as transmises. Démarrer cette thèse à tes côtés a été une évidence puis tu m'as guidée tout au long de ces 7 années de thèse sans jamais lâcher. Merci pour tes conseils et ta disponibilité, merci ta gentillesse et pour tous ces bons moments passés ensemble.

Veuillez recevoir l'expression de ma sincère reconnaissance

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS 3
TABLE DES MATIERES 4
LISTE DES FIGURES 6
LISTE DES TABLEAUX 6
LISTE DES ABREVIATIONS 7
AVANT PROPOS 9
INTRODUCTION 14
I. L'imagerie moléculaire fonctionnelle 14
I.1. La radioactivité au service du diagnostic et de la thérapie 14
I.2. La TEMP ou imagerie mono-photonique 17
I.3. La TEP ou imagerie bi-photonique 18
II. Le radiopharmaceutique le plus utilisé en TEP: le ^{18}F-FDG 22
II.1. La synthèse du ^{18}F-FDG marquage direct par liaison covalente 22
II.2. Les propriétés biologiques du ^{18}F-FDG 23
II.3. Les applications en cancérologie 24
III. ^{18}F-FDG et cancer du sein 25
III.1. Le cancer du sein 26
III.2. Intérêts et limites de la TEP/TDM au ^{18}F-FDG dans les carcinomes canalaires ... 28
IV. ^{18}F-FDG, pancréatite et adénocarcinome pancréatique 31
IV.1. Le pancréas 32
IV.2. La pancréatite 32
IV.3. Le cancer du pancréas 33
IV.4. Intérêts et limites de la TEP/TDM au ^{18}F-FDG dans les PDAC 34
V. Les radiotraceurs peptidiques 37
VI. Les radiotraceurs peptidiques marqués au gallium-68 39
VI.1. Propriétés chimiques et nucléaires du gallium-68 39
VI.2. Production du gallium-68 40
VI.3. Les conditions de marquage 44
VI.4. Purification et contrôle de qualité 48
VI.5. Mesure de l'efficacité du radiomarquage 49
VII. Ciblage moléculaire et ligands d'intérêt 49
VII.1. Cibles potentielles pour l'imagerie fonctionnelle du cancer 49
VII.2. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) 53
VII.3. Exemple de la somatostatine (SST) et du ciblage de ses récepteurs 54
VIII. Bombésine (GRP) et récepteurs du GRP 55
VIII.1. La bombésine ou « gastrin-releasing peptide » 55
VIII.2. Les récepteurs du « gastrin-releasing peptide » 56
VIII.3. Interactions entre le GRP et son récepteur BB2 humain 56
VIII.4. Bombésine et cancer 57
VIII.5. Les radiotraceurs peptidiques analogues de la bombésine BN 59
IX. Neurotensine et récepteurs de la neurotensine 62
IX.1. La neurotensine 62
IX.2. Les récepteurs de la neurotensine 65
IX.3. Interactions entre NT et NTR1 66
IX.4. Signalisation intracellulaire induite par la fixation de la NT sur NTR1 68
IX.5. Internalisation et régulation autocrine du complexe NT/NTR1 69
IX.6. Neurotensine et cancer 70
IX.7. Les radiotraceurs peptidiques analogues de la neurotensine NT 73

RESULTATS 81
X. L'AMBA, un analogue de la bombésine portant le DOTA 81
X.1. Introduction 81
X.2. Article 1: ^{68}Ga-AMBA et ^{18}F-FDG pour l'imagerie TEP préclinique du cancer du sein. Effet d'un traitement au tamoxifène sur la captation tumorale des radiotraceurs. . 83
X.3. Discussion 91
XI. Analogues de la neurotensine portant le DOTA 95
XI.1. Introduction 95
XI.2. Article 2: Analogues de la neurotensine porteurs d'un chélatant DOTA 98
XI.3. Discussion 111
XII. ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 pour l'imagerie TEP du cancer 114
XII.1. Introduction 114
XII.2. Article 3: Evaluation du ^{68}Ga-DOTA-NT20 3 comme agent d'imagerie TEP pour la détection de l'expression du NTR1 dans un modèle d'adénocarcinome pancréatique.. 115
XII.3. Discussion 139
XII.4. Conclusion 141
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 142
XIII. Conclusions et perspectives sur les analogues radiomarqués de la bombésine... 142
XIV. Conclusions et perspectives sur les analogues radiomarqués de la neurotensine 144
XIV.1. Projet FluoNTep 146
XIV.2. Projet NeuroTEPsine 147
BIBLIOGRAPHIE 148

Liste des figures

Figure 1 : Parcours des rayonnements alpha, béta, gamma dans les tissus..... 15
Figure 2 : Principe de la TEMP 18
Figure 3 : Phénomène d'annihilation des positons 19
Figure 4 : Principe de la TEP 20
Figure 5 : Le 2-désoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glucose (^{18}F-FDG), analogue du glucose 22
Figure 6 : Métabolisme du ^{18}F-FDG 23
Figure 7 : Les carcinomes canalaires et lobulaires 26
Figure 8 : Classement des carcinomes canalaires en fonction des sous-types moléculaires, .. 27
Figure 9 : Variation du SUV pré-thérapeutique d'un phénotype tumoral à l'autre. 29
Figure 10 : Le pancréas. 32
Figure 11 : Progression de l'épithélium sain au PanIN puis au carcinome 33
Figure 12 : Illustration d'un radiotraceur, basé sur un chélate bifonctionnel 38
Figure 13 : Décroissance du gallium-68 et de son élément père le germanium-68 39
Figure 14 : Régénération d'un générateur de ^{68}Ge/^{68}Ga 40
Figure 15 : Elution fractionnée 41
Figure 16 : Module Synchrom R&D de Raytest 43
Figure 17 : Cassette à usage unique 43
Figure 18 : ^{68}Ga-chélate (A) versus ^{68}Ga contre (B) chez la souris 46
Figure 19 : Principaux acides aminés utilisés pour la bioconjugaison du chélate 46
Figure 20 : Les agents chélatants les plus utilisés 47
Figure 21 : Influence du chélate sur la biodistribution d'un même peptide. 48
Figure 22 : Structure d'un RCPG et cascade cellulaire 53
Figure 23 : Classification des récepteurs couplés aux protéines G 54
Figure 24 : Séquences primaires du GRP 56
Figure 25 : Mécanisme de régulation autocrine et paracrine du GRP 57
Figure 26 : Image TEP/TDM d'une souris injectée avec du ^{68}Ga-NeoBOMB1 61
Figure 27 : Etude de liaison de la ^{125}I-[Tyr4]BBN à différentes lignées de cancer du sein 62
Figure 28 : Sites de clivage de la NT avec les métallopeptidases 64
Figure 29 : Signalisation cellulaire des récepteurs de la NT dans les cellules β 65
Figure 30 : Liaison de la NT 8-13 au récepteur NTR1 67
Figure 31 : Représentation du NTR1-GW5-T4L 68
Figure 32 : Schéma simplifié de la signalisation intracellulaire induite par la fixation de la NT sur le NTR1 associée à la cancérogenèse 69
Figure 33 : Structure du [68Ga]3 et images TEP d'une souris porteuse d'une tumeur HT29. 79
Figure 34 : Structure du ^{18}F-FGlc-NT4 et de l'antagoniste SR142948A 79
Figure 35 : Image TEP du radiotraceur ^{18}F-8 80

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les radionucléides les plus couramment utilisés en imagerie diagnostique 17
Tableau 2 : Ligands de RCPG et leurs indications proposées en imagerie 50
Tableau 3 : Analogues de la bombésine marqués au ^{99m}Tc pour l'imagerie TEMP 59
Tableau 4 : Analogues de la bombésine marqués au gallium-68 et utilisés en TEP 60
Tableau 5 : Caractéristiques d'analogues (Nα-His)Ac-NT$_{8-13}$ non complexés ou complexés avec le ^{99m}Tc. 74
Tableau 6: Caractéristiques de liaison, stabilité, biodistribution des démotensines 5 et 6 76
Tableau 7 : Une série d'analogues de la neurotensine marqué à l'^{111}In 77

Liste des abréviations

α : alpha
β : béta
β- : électron
β+ : positon
γ : gamma
% ID / g : Pourcentage de dose injectée par gramme d'organe
^{68}Ga : Gallium-68
AMM: Autorisation de mise sur le marché
ARNm: Acide ribonucléique messager
AS : Activité spécifique
AUC: Aire sous la courbe
BN: Bombésine
Bq: Becquerel
CA19-9: Carbohydrate antigen 19-9
CCI: Carcinome canalaire invasif
DOTA: 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetique Acid
DTPA: Diethylentriaminepentacitic acid
EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique
ER: œstrogènes
FMP: Focal Mass Pancreatitis = Masse focale formant une pancréatite
GI: Gastro-intestinal
GLUT1: Transporteur de glucose 1
GMP: Good Manufacturing Practice
GRP : « gastrin-releasing peptide » ou peptide libérant de la gastrine
GRPR : Gastrin realeasing peptide receptor
HER2: « Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 »
EGF: « Epidermal Growth Factor »
IC50 : concentration inhibitrice à 50%
IgG4 : Immunoglobuline G4
IRM: Imagerie par résonance magnétique
Kd : Constante de dissociation
keV : Kiloélectronvolts
Kg : Kilogramme
Ki-67 : Indice de prolifération
MBq : Mégabecquerel (106 Bq).
NaCl: Chlorure de sodium
NMB : Neuromédine B
NET : Tumeurs neuroendocrines
NHS: N-hydroxysuccinimide
NOTA: 1,4,7,-triazacyclononanetriacetate
NSCLC: Non small cell lung cancer
NT: Neurotensine
NTR1 ;2 ;3 : Récepteur de la neurotensine de type 1 ;2 ;3
PanIN : Néoplasie intraépithéliale pancréatique
PDAC: « Pancreatic ductal adenocarcinoma » ou adénocarcinome pancréatique exocrine
PEG : Polyéthylène glycol
PET: « Positron Emission Tomography »
PSMA: « Prostate specific membrane antigen »
PR: Progestérone

PRRT : Radiothérapie par récepteur de peptide
RCPG : Récepteurs membranaires couplés aux protéines G
SCLC: « Small Cell Lung Carcinoma »
SNC: Système nerveux central
SPECT: "Single photon Emission Computed Tomography"
SST : Somatostatine
SSTR2 et SSTR5 : Récepteurs de la somatostatine de type 2 et 5
SUVmax : « Standardized Uptake Value maximum » ou valeur maximale de fixation normalisée
T½ : Période ou demi-vie
TDM: Tomodensitométrie X
TEMP: Tomographie par émission mono-photonique dite aussi SPECT
TEP: Tomographie par émission de positons dite aussi PET
TMA : « tissue-micro-array »

Avant PROPOS

Durant ces 15 dernières années, la tomographie par émission de positons (TEP), couplée à la tomodensitométrie (TEP/TDM) ou plus récemment à l'imagerie par résonance magnétique (IRM), est devenue un examen d'imagerie majeur largement pratiqué en cancérologie. Elle permet de réaliser le diagnostic initial de certaines tumeurs, de stadifier de nombreux cancers en évaluant la présence ou l'absence de métastases ou de détecter une récidive cancéreuse, et également d'évaluer de façon précoce la réponse ou la résistance des localisations néoplasiques à la thérapeutique.

Le [^{18}F]fluorodésoxyglucose ou ^{18}F-FDG est un analogue radioactif du glucose. C'est le radiopharmaceutique le plus utilisé pour la TEP/TDM en cancérologie, du fait de son mode d'action non spécifique selon le type de cancer primitif : l'intensité de fixation par les lésions cancéreuses et leur contraste (signal sur bruit de fond) sont liés à l'augmentation du transport intracellulaire du glucose et de l'activité glycolytique du tissu néoplasique pour ses besoins métaboliques. Ce seul traceur métabolique permet donc l'imagerie de la grande majorité des cancers où ces phénomènes sont franchement accrus.

Néanmoins, le ^{18}F-FDG présente des limites ; sa non spécificité peut donner lieu à des résultats faux positifs, en particulier dans le cas de lésions inflammatoires, ou faux négatifs dans le cas de cancer métaboliquement peu actifs ou de lésion de taille infracentimétrique.

Le carcinome canalaire infiltrant (CCI) est le plus fréquent des cancers du sein et représente 75% des tumeurs mammaires invasives. Ainsi, la caractérisation du cancer du sein infiltrant et le suivi thérapeutique de ce cancer, notamment lorsqu'il est œstrogène dépendant, est encore difficile. L'hormonothérapie, première thérapeutique ciblée, a considérablement amélioré les résultats cliniques de ces cancers, mais environ 20% - 30% des patientes finissent par présenter une récidive due à l'acquisition d'une résistance au traitement. L'identification de biomarqueurs complémentaires pour prédire l'hormono-sensibilité des lésions métastatiques d'un cancer initialement est alors une problématique clinique d'actualité à laquelle l'imagerie TEP/TDM essaye de répondre.

Le diagnostic et la stadification initiale de l'adénocarcinome pancréatique exocrine (PDAC) présentent des difficultés du fait du caractère tardif et ambigu des signes cliniques. Le PDAC parvenu à une extension macroscopique évolue rapidement et dissémine souvent avant d'avoir été reconnu. Les techniques d'imagerie conventionnelles ont une capacité limitée pour mettre en évidence l'invasion locale ou les petites métastases. Ces métastases occultes rendent difficile l'estimation préopératoire de la résécabilité.

La TEP/TDM au ^{18}F-FDG contribue à améliorer et à préciser le diagnostic initial de ce cancer, cependant sa spécificité est réduite dans le cas de pancréatite ou de masse pancréatique d'étiologie inconnue. De plus, son utilisation dans la stadification tumorale est limitée par une faible sensibilité pour la détection des petites lésions métastatiques. Bien que de nombreux efforts aient été faits pour améliorer l'efficacité diagnostique de la TEP/TDM au ^{18}F-FDG dans les PDAC, ses résultats restent inférieurs à ce qui est obtenu dans d'autres cancers primitifs. La découverte de traceurs plus spécifiques des PDAC que le ^{18}F-FDG pourrait permettre de pallier les limites de la TEP dans ce cancer.

Un grand nombre de récepteurs membranaires sont surexprimés à la surface des cellules tumorales et constituent autant de cibles moléculaires potentielles pour une approche thérapeutique ou diagnostique du cancer. Les ligands naturels de ces récepteurs s'y lient avec une très bonne affinité et sélectivité. Ces dernières années, le ciblage de récepteurs membranaires couplés aux protéines G (RCPG) avec des ligands radiomarqués est devenu un sujet très important en oncologie nucléaire. Un domaine d'application bien documenté depuis 3 décennies, même s'il s'agit d'une néoplasie rare et habituellement d'évolution lente, sont les tumeurs neuroendocrines (TNE) grâce au développement d'analogues peptidiques radiomarqués de la somatostatine, initialement pour la tomographie par émission mono-photonique (TEMP), puis pour l'imagerie par émission de positons (TEP). L'un des analogues les mieux documentés, le ^{68}Ga-DOTATOC (édotréotide), présente une meilleure efficacité diagnostique que les analogues utilisés en TEMP. D'autres radionucléides ont été chélatés à ce type d'analogue pour le traitement par radiothérapie ciblée, par exemple le ^{177}Lu-DOTATATE pour la radiothérapie vectorisée des TNE ou, récemment, des ligands de l'antigène membranaire spécifique de la prostate marqués également au ^{177}Lu.
Les récepteurs de la bombésine (BN) ou de la neurotensine (NT) sont eux aussi des RCPG surexprimés par certaines cellules tumorales par rapport au tissu sain.
D'après la littérature, un des récepteurs de la BN, le récepteur du peptide libérant la gastrine (GRPR) est surexprimé dans 83% des cas de carcinomes canalaires estrogène- dépendant. Le récepteur de la neurotensine (NTR1) est lui détecté dans 75 à 80% des adénocarcinomes pancréatiques (PDAC).
Ainsi le développement de nouveaux traceurs analogues spécifiques de ces récepteurs a pour but d'améliorer le repérage de ces cancers à l'aide de l'imagerie TEP, de permettre une meilleure décision et un meilleur suivi thérapeutiques.

L'imagerie basée sur le concept ligand récepteur est en plein développement ces dernières années et promet encore de belles avancées, notamment grâce à disponibilité en France des générateurs de gallium-68 qui ouvrent la voie au radiomarquage « à la demande » de nombreux peptides. Avec le

développement des traceurs TEP permettant de vérifier la surexpression des cibles biologiques par le tissu cancéreux, c'est également la radiothérapie interne vectorisée qui se diversifie.

Depuis les années 2000, des radiotraceurs peptidiques ciblant le GRPR ont été développés, majoritairement pour permettre la détection du cancer de la prostate surexprimant ce récepteur par rapport au tissu sain. En effet le cancer de la prostate est fréquent, généralement peu agressif et ne fixe pas intensément le FDG. Ils ont été développés d'abord pour la TEMP puis, à partir de 2007, pour la TEP et la radiothérapie ciblée.
Au début de nos travaux, peu d'études avaient démontré l'accumulation d'un radiotraceur ligand du GRPR dans des cancers du sein, les données étaient principalement disponibles *in vitro* et en préclinique dans certains modèles murins de cancer du sein humain estrogène-dépendant.
Dans la première partie de ce travail, nous avons souhaité vérifier si un agoniste du GRPR radiomarqué au gallium-68, l'AMBA, permettrait la détection en TEP d'un autre modèle murin de cancer du sein humain estrogène-dépendant, encore peu décrit dans la littérature, et que ce radiotraceur permettrait de prédire la réponse tumorale à une hormonothérapie de manière plus sensible que le ^{18}F-FDG.

Au début de nos travaux, les dérivés de la neurotensine (NT) décrits dans la littérature, procuraient chez l'Homme, ou dans des modèles animaux d'adénocarcinome colique, une fixation tumorale limitée et une forte accumulation rénale de la radioactivité. L'équipe du Dr. Anne Gruaz-Guyon avait développé une série de nouveaux analogues de la neurotensine portant le DTPA un chélatant polyaminopolycarboxylique. Un de ceux-ci marqué à l'indium-111 le DTPA-NT-20.3 ayant permis l'obtention d'images de fort contraste, une nouvelle série portant un chélatant de type DOTA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-N,N',N'',N'''-tétraacétique) avait été développée. Le DOTA, en effet, présente l'avantage de fixer de nombreux radionucléides métalliques. Il était ainsi possible de marquer la même molécule avec une grande variété de radiométaux et de l'utiliser pour la TEMP ou la TEP et également pour la radiothérapie ciblée, selon le radiométal utilisé. Le Dr. Faisal Al Shoukr a étudié les propriétés de ces peptides marqués à l'^{111}In dans un modèle de tumeur d'adénocarcinome colique humain surexprimant le récepteur NTR1. L'obtention d'images avec un contraste tumoral élevé permettant la détection des greffes tumorales dans des délais courts après injection, inférieurs à 60 min délai compatible avec la demi-vie du gallium-68 (68 min). a conduit cette équipe à envisager l'emploi de ce traceur peptidique pour l'imagerie TEP. J'ai dans la seconde partie de ce travail, étudié le radiomarquage au gallium-68 du meilleur de ces dérivés et évalué son potentiel pour l'imagerie TEP et la détection de tumeurs d'adénocarcinome colique.

Dans le but d'améliorer la prise en charge des patients atteints de PDAC, nous avons ensuite souhaité démontrer le potentiel de ce radiotraceur TEP pour imager deux modèles murins de PDAC humains ; nous avons donc caractérisé sa biodistribution, évalué sa spécificité *in vivo* et l'avons comparé au ^{18}F-FDG, notamment pour valider sa capacité à discriminer *in vivo* la pancréatite et le PDAC, un point faible reconnu de la TEP au ^{18}F-FDG.

Ce travail a été réalisé sous la direction du Pr. Jean-Noël Talbot et sous le co-encadrement du Dr. Anne Gruaz-Guyon au sein du Laboratoire d'Imagerie Moléculaire Positonique (LIMP) installé sur le site de l'hôpital Tenon, dans les locaux du bâtiment de recherche. Ce laboratoire est conforme aux législations en vigueur pour la gestion et la manipulation de sources radioactives non scellées et pour l'hébergement transitoire de rongeurs (souris, rats) après leur injection et la réalisation de l'imagerie.

Ce travail a donné lieu aux publications suivantes :

Articles dans des revues internationales à comités de lecture

Prignon, A.; Nataf, V.; Provost, C.; Cagnolini, A.; Montravers, F.; Gruaz-Guyon, A.; Lantry, L. E.; Talbot, J. N.; Nunn, A. D.: (68)Ga-AMBA and (18)F-FDG for preclinical PET imaging of breast cancer: effect of tamoxifen treatment on tracer uptake by tumor. *Nuclear medicine and biology* **2015**, *42*, 92-8.

Alshoukr, F.; Prignon, A.; Brans, L.; Jallane, A.; Mendes, S.; Talbot, J. N.; Tourwe, D.; Barbet, J.; Gruaz-Guyon, A.: Novel DOTA-neurotensin analogues for 111In scintigraphy and 68Ga PET imaging of neurotensin receptor-positive tumors. *Bioconjugate chemistry* **2011**, *22*, 1374-85.

Article prochainement soumis à European journal of nuclear medicine and molecular imaging

Prignon A., Provost C., Alshoukr F., Wendum D., Couvelard A., Barbet J., Forgez P., Talbot JN., and Gruaz-Guyon A.
Evaluation of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 as a PET imaging agent for neurotensin receptor-1 expression in a model of exocrine pancreatic adenocarcinoma.

Communications orales

Imagerie TEP au gallium-68 de tumeurs exprimant le récepteur de la neurotensine NTSR1
Aurélie Prignon, Journées scientifiques de l'école doctorale, Roscoff, 13 au 15 mai **2013**

Radiolabeling and biodistribution of ^{68}Ga-AMBA in ZR75-1 human breast cancer tumors
Aurélie Prignon, Valérie Nataf, Jimmy Rose, Claire Provost, Lucile Durand, Adrian D. Nunn*, Françoise Montravers, Jean-Noël Talbot. 1st World Congress on Gallium-68 and Peptide Receptor Radionuclide Therapy (PRRNT), Bad Berka, Germany, 27-29 juin **2011**

Communications par posters à des congrès

^{68}Ga-DOTA-NT20.3 a PET imaging probe for targeting neurotensin receptor-1 in mouse models of human ductal pancreatic carcinoma.
Prignon Aurélie[1], Provost Claire[1], Talbot Jean-Noël[2], Gruaz-Guyon Anne [3]
World Molecular Imaging Congress, New York, USA, **2016**

Preclinical evaluation of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 as a PET imaging agent for neurotensin receptor-1 expression in a model of exocrine adenocarcinoma of the pancreas.
Prignon Aurélie[1], Provost Claire[1], Talbot Jean-Nöel[2]
11th European Molecular Imaging Meeting, Utrecht, Holland, **2016**

PET imaging of G-protein coupled receptors using gallium 68 radiolabelled peptides
Prignon A., Provost C., Nataf V., Gruaz Guyon A., Talbot JN.
1er Congrès National d'Imagerie du Vivant, Paris, CNIV 2016, Paris, 10-12 février **2016**

PET imaging of G-protein coupled receptors using gallium 68 radiolabelled peptides
Prignon A., Provost C., Nataf V., Gruaz Guyon A., Talbot JN.
7ème Réunion annuelle ITMO Technologies pour la Santé, Montpellier, 15-16 décembre **2015**

A fully automated anionic pre-purification of gallium eluate on a SynChrom R&D Raytest module.synthesis. Comparison with the fractionated elution, method of reference for ^{68}Ga peptide radiolabelling.
Prignon A., Provost C., Nataf V., Montravers F., Talbot J-N. 12ème symposium européen de radiopharmacie, ESRR12, Nantes, 26-29 avril **2012**

Introduction

L'imagerie médicale conventionnelle dite anatomique regroupe la radiographie X, le scanner ou tomodensitométrie X (TDM), l'échographie, et l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Ces techniques permettent d'obtenir des informations sur la structure des organes, leur forme, leurs limites, et dans certains cas leur contenu (structures osseuses, calculs vésicaux, densité aérique, hydrique ou graisseuse). Ces techniques d'imagerie correspondent au domaine de la radiologie.

A l'opposé, les techniques d'imagerie fonctionnelle s'intéressent à la fonction des organes, des tissus ou des cellules, c'est-à-dire à leur métabolisme ou leurs particularités biologiques. Elles nécessitent l'utilisation de sources radioactives non scellées et sont réalisées dans des services de médecine nucléaire. Elles permettent de mettre en évidence des phénomènes biologiques au niveau moléculaire, *in vivo*, de façon non invasive ainsi que leur variation au cours du temps, aussi bien chez l'Homme que chez l'animal. Elles regroupent la scintigraphie ou imagerie planaire et des techniques de tomographie tridimensionnelle (3D), obtenant des images en coupe comme la tomographie par émission mono-photonique (TEMP) (aussi abrégée en SPECT de l'anglais : Single photon Emission Computed Tomography) ou la tomographie par émission de positons (TEP) (aussi abrégée en PET de l'anglais Positron Emission Tomography).

I. L'imagerie moléculaire fonctionnelle

I.1. La radioactivité au service du diagnostic et de la thérapie

a. Définitions

Un radionucléide est un atome instable se transformant dans le temps en une autre entité, stable ou instable, en émettant des particules ou des rayonnements électromagnétiques.. L'unité de radioactivité est le Becquerel (Bq), qui correspond à la désintégration d'un atome du radionucléide par seconde. Compte tenu des quantités importantes de radioactivité émises par ces substances pour les applications médicales, on rencontre plus souvent des multiples de cette unité et plus particulièrement le mégabecquerel (1 MBq = 10^6 Bq).

Le caractère radioactif s'accompagne donc du phénomène de décroissance, qui correspond à la réduction dans le temps de la quantité de rayonnement émis. La période (ou demi-vie T½) détermine le temps au bout duquel la moitié des radionucléides s'est transformée en un autre nucléide, stable ou radioactif.

Un radiotraceur est une molécule organique ou biologique à laquelle est greffé un radionucléide. Le radiotraceur est administré au patient (par injection intraveineuse, ingestion, inhalation...) et s'accumule dans un tissu biologique ou un ensemble d'organes qu'il reconnaît sélectivement et qui le concentre. Un radiotraceur est dit radiopharmaceutique lorsqu'il est administré à l'Homme, en

tant que médicament expérimental ou médicament enregistré par les autorités sanitaires. Le terme radiotraceur implique à la fois la notion de très faibles quantités de matière (traces) mise en œuvre et l'avantage du signal radioactif permettant de suivre de façon non invasive la distribution de la molécule dans l'organisme ou de cibler l'irradiation d'un tissu fonctionnellement anormal. Le choix du radionucléide, basé sur la nature du rayonnement ionisant émis, ses propriétés physiques, énergie et période, et ses propriétés chimiques, est lié au mode d'utilisation du radiotraceur : soit pour en visualiser les sites d'accumulation dans l'organisme (imagerie diagnostique), soit pour détruire des cellules cibles (radiothérapie ciblée).

b. Les rayonnements ionisants

Outre les rayonnements ionisants X utilisés en radiologie (dont plus récemment en TDM) et produits par des générateurs électriques, il existe trois types de rayonnements ionisants issus de radionucléides artificiels. Les particules α sont des noyaux d'hélium. Ils ne parcourent que quelques centimètres dans l'air et une simple feuille de papier suffit à les arrêter ; ils sont donc inutilisables pour l'imagerie non invasive, mais ouvrent des possibilités de radiothérapie ciblée s'il est possible de les concentrer au sein même des cellules néoplasiques à traiter. Il existe deux types de particules β, l'électron « ordinaire » (β-) et l'électron positif ou positon (β+). Ils peuvent traverser quelques dizaines de centimètres de matière. Les rayons bêta moins sont donc inutilisables pour l'imagerie non invasive, mais ouvrent des possibilités de radiothérapie ciblée, avec une portée plus grande que les rayons alpha. Le rayonnement γ, constitué de photons tout comme les rayons X, est bien plus pénétrant que les autres types de rayonnements. En fonction de son énergie, il peut parcourir plusieurs centaines de mètres dans l'air et son parcours dans la matière permet, pour des énergies suffisantes, la détection de ce signal par des capteurs externes au patient. Il entraine par contre moins d'effets biologiques que les rayonnements β et α et est donc utilisable pour l'imagerie non invasive si son énergie est adaptée, de l'ordre de la centaine de keV, voire 511 keV dans le cas particulier des photons de dématérialisation provenant de l'annihilation des positons qui sont détectés pour l'imagerie TEP.

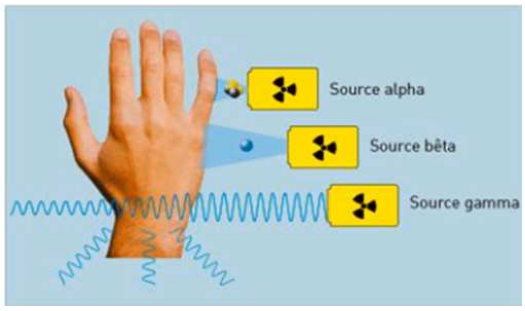


Figure 1 : Parcours des rayonnements alpha, béta, gamma dans les tissus

c. Les radionucléides utilisés en imagerie diagnostique

La plupart des radionucléides sont produits par un cyclotron (accélérateur de particules) dont peu de centres universitaires disposent et qui sont en France des outils de l'industrie pour produire certains radionucléides à usage médical. D'autres sont issus de générateurs sur lesquels le radionucléide père est greffé (détails chapitre VI.2.) et qui permettent l'obtention *in situ* d'une solution contenant le radionucléide, dans le laboratoire ou la radiopharmacie au sein du service de médecine nucléaire, sans la nécessité d'un cyclotron sur place. Les générateurs sont également une alternative à la livraison quotidienne de radiopharmaceutiques prêts à l'emploi chez le patient. Ils permettent une réduction des coûts et introduisent davantage de flexibilité dans la pratique de l'imagerie nucléaire en routine.

Les radionucléides émetteurs de rayonnements gamma (γ) utilisés en médecine (hors radiothérapie externe) ont des énergies d'émission situées entre 100 et 300 kiloélectronvolts (keV). Le plus utilisé est le technétium-99m du fait de son faible coût de production, de sa facilité d'obtention (par générateur) et de son émission γ pure à 140 keV. Sa période de 6 heures est assez longue pour permettre de suivre les processus physiologiques d'intérêt, mais assez courte pour limiter la radioexposition du patient. L'indium-111 est un radiométal émetteur gamma d'intérêt pour le marquage de peptides. Sa double émission de photons γ (171 et 245 keV) lors de sa décroissance par capture électronique et sa période de 2,8 jours en font un radionucléide particulièrement adapté pour l'étude de processus biologiques lents (Tableau 1).

Les radionucléides émetteurs de positons β+ d'intérêt médical se divisent en deux classes :

- les radionucléides non métalliques incorporables à des molécules vectrices par une liaison covalente simple et stable dans le temps. Certains sont des éléments chimiques légers et abondants dans la matière vivante (oxygène-15 T½ = 2 min, carbone-11 T½ = 20 min, azote-13 T½ = 2 min, etc...) mais leur période extrêmement courte nécessite une production et, lorsque le radiopharmaceutique n'est pas limité au seul radionucléide, un radiomarquage sur site pour une injection rapide, ce qui limite leur utilisation en clinique. D'autres sont des halogènes, le plus utilisé étant le fluor-18 T½ = 110min dont la demi-vie permet le radiomarquage en amont par un industriel fournissant le radiotraceur ou radiopharmaceutique livré prêt à l'emploi.
- les radionucléides métalliques (^{68}Ga, ^{64}Cu, …) incorporables via des agents chélatants à des molécules par formation de liaisons de coordination.

Le gallium-68 est, tout comme l'indium-111, un cation métallique trivalent. Il a été utilisé dans nombreuses études précliniques et cliniques ces dernières années.

Tableau 1 : Les radionucléides les plus couramment utilisés en imagerie diagnostique

	Radionucléide	Période (heures)	Energie principaux γ KeV	Exemple de chélate
Emetteurs gamma	^{99m}Tc	6,02	140	N_2S_2
				MAG3
	^{111}In	67,9	171, 245	DTPA
	^{123}I	13,2	159	-
	^{67}Ga	78,3	93, 184, 300	DOTA
Emetteurs béta +	^{68}Ga	1.14	511	DOTA
	^{18}F	1,83	635	-
	^{64}Cu	12,7	660	DOTA
	^{89}Zr	78,5	897	DOTA

d. La radiothérapie interne ciblée ou métabolique

La radiothérapie interne consiste à administrer, le plus souvent par voie générale, des médicaments radioactifs dont les propriétés biologiques conduisent à un ciblage sélectif des cellules cancéreuses, permettant ainsi d'irradier des cibles tumorales de petite taille et disséminées dans l'organisme. Les propriétés physico-chimiques de ces radionucléides émetteurs de particules β- ou α (applications plus récentes) ont ainsi un effet destructeur sur les cellules cibles. La première application, le traitement des cancers différenciés de la thyroïde, exploite le métabolisme de l'iode pour accumuler de l'iode-131 dans les cellules cancéreuses (Weigel *et al.*, 2006). Ces médicaments radioactifs peuvent aussi être des anticorps ou des peptides utilisés en association avec des radionucléides émetteurs de rayonnement β- ou α. Des anticorps marqués reconnaissant sélectivement les antigènes tumoraux peuvent être utilisés dans le cadre de traitements par radio-immunothérapie. Ainsi leur efficacité par rapport à l'anticorps administré seul est augmentée, par exemple le Zevalin® (ibritumomab tiuxetan), un anticorps monoclonal anti CD20 marqué à l'yttrium-90 est indiqué dans le traitement des patients adultes atteints d'un lymphome non hodgkinien à cellules B CD20+, de type folliculaire, en rechute ou réfractaire après traitement par le rituximab (Rizzieri, 2016).

La radiothérapie métabolique ou ciblée utilisant des peptides radiomarqués (PRRT ou radiothérapie par récepteur de peptide) est une autre voie qui se développe. L'intérêt majeur réside dans le fait qu'un même type de molécule peut servir pour l'imagerie avec un radionucléide émetteur ɤ ou β+ et pour la radiothérapie interne ciblée avec un radionucléide émetteur α ou β-. Les résultats obtenus avec des analogues radiomarqués de la somatostatine dans les tumeurs neuroendocrines (NET) en sont actuellement le meilleur exemple.

I.2. La TEMP ou imagerie mono-photonique

Les technologies d'acquisition d'images associées à des outils informatiques puissants a permis de

faire évoluer la scintigraphie qui permettait l'obtention d'images planaires (2D) vers des techniques de tomographie permettant des reconstructions tridimensionnelles (3D).

La TEMP repose sur l'utilisation de radiotraceurs émetteurs de rayonnements gammas (détails chapitre I.1.c), en faisant effectuer aux détecteurs de la gamma caméra une rotation de 180 ou 360 degrés autour du patient pour acquérir selon diverses positions angulaires des mesures de radioactivité selon une matrice de pixels (Figure 2). À l'aide d'un algorithme de reconstruction, l'ordinateur reconstruit en 3D les images de la distribution des radionucléides dans l'organe. La TEMP exige un collimateur sur chaque tête détectrice de la gamma-caméra afin de sélectionner les photons émis par les foyers concentrant le radiotraceur dans une direction perpendiculaire (dans le cas le plus répandu) au détecteur de la gamma-caméra. Ce collimateur doit être adapté à l'énergie des photons émis par le radionucléide (collimateur « haute énergie » pour l'iode 131 par exemple). Ce procédé induit la perte d'une grande quantité de photons émis en provenance du patient durant la durée de l'examen et explique la mauvaise qualité relative des images avec une faible résolution spatiale (8-12 mm en clinique) malgré de nets progrès dans le développement des caméras. La gamme de radiopharmaceutiques disponibles en TEMP étant très étendue, cette modalité demeure utilisée dans différentes applications comme l'imagerie cardiaque avec le Tc-99m-sestamibi pour l'exploration de la perfusion myocardique (Alexanderson *et al.*, 2004) ou la scintigraphie TEMP du squelette avec un bisphosphonate technétié, mais son utilisation clinique en cancérologie a diminué ces dernières années au profit de la TEP.

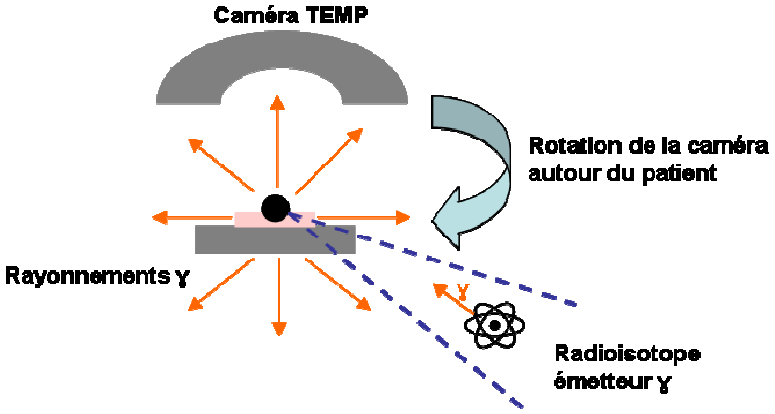


Figure 2 : Principe de la TEMP

I.3. La TEP ou imagerie bi-photonique

a. Historique

Bien que le concept de la tomographie par émission ait été présenté par Kuhl et Edwards vers la fin des années 50, les premières expérimentations tomographiques n'ont débuté qu'en 1963 à l'université de Pennsylvanie (Kuhl *et al.*, 1963). C'est Anger qui a démontré le premier la

possibilité de détecter des photons issus de l'annihilation du positon, en utilisant deux caméras à scintillations reliées électroniquement (Anger *et al.*, 1963). Brownell, quant à lui, développa les outils permettant de travailler en coïncidence sur un système de gamma caméra à deux têtes et a présenté ses résultats lors d'un symposium à Vienne en 1968. Il faut cependant attendre 1973 pour voir fonctionner le premier TEP développé à l'université de Washington, à Saint Louis, par Hoffman et Phelps. Le premier prototype a été publié dans le Journal of Nuclear Medicine en 1975 (Phelps *et al.*, 1975).

Le service de médecine nucléaire dirigé par le Pr. Talbot à l'hôpital Tenon a été le 1er hôpital français civil à être équipé d'une TEP pour la routine clinique en 1999. Depuis une quinzaine d'années, cette technique d'imagerie s'est largement répandue en routine clinique, particulièrement en oncologie. La France compte aujourd'hui plus de 20 cyclotrons dédiés à la production de radionucléides émetteurs de positons et plus particulièrement du fluor-18, plus de 45 centres médicaux équipés de caméra TEP, ainsi que 3 caméras couplant TEP et IRM.

b. Principe

La TEP repose sur l'injection au patient d'un radiotraceur émetteur de positons β+. Une fois dans l'organisme, celui-ci est accumulé dans certains organes ou structures pathologiques, selon les propriétés de la molécule vectrice, et le radionucléide s'y désintègre. Après avoir traversé quelques millimètres de matière, le positon émis lors de la désintégration entre en collision avec un électron (e-) entraînant un phénomène d'annihilation. Deux photons de 511 keV sont alors émis en coïncidence (sensiblement à 180° l'un de l'autre) (Figure 3).

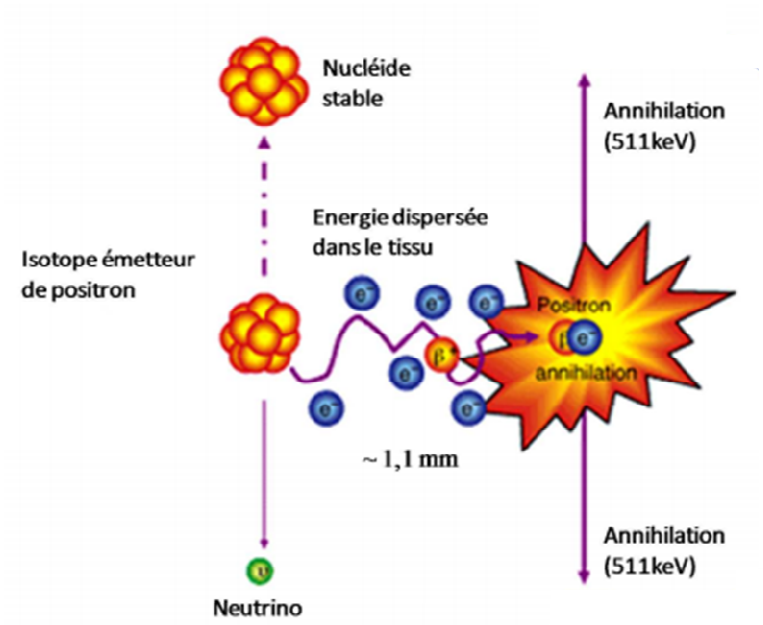


Figure 3 : Phénomène d'annihilation des positons

Des détecteurs (sous forme de cristaux) disposés en couronne autour du patient détectent en coïncidence les arrivées de ces deux photons ce qui permet de déterminer des « lignes de réponse » sur lesquelles se trouvent les organes ou structures anormales ayant fixé le radiotraceur. L'enregistrement de millions de coïncidences est nécessaire pour reconstruire une image TEP tridimensionnelle (3D). Ainsi, l'émission en coïncidence de deux photons provenant d'une seule désintégration permet d'injecter une activité plus faible de radiotraceur, en comparaison avec la TEMP car il est possible de se passer de collimateur. La TEP est donc en général une modalité plus sensible et plus résolue que la TEMP (Ziegler, 2005). Cependant, l'image obtenue comporte un certain flou car le point d'annihilation ne correspond pas au point émission du positon (Figure 4). La TEP clinique présente une résolution spatiale de l'ordre de 3-4 mm mais les repères anatomiques que procure la biodistribution du radiotraceur sont en général insuffisants pour préciser distinctement l'organe ou la structure anormale où est accumulée la radioactivité, ce qui a justifié l'association désormais systématique à une modalité d'imagerie anatomique, TDM voire IRM.

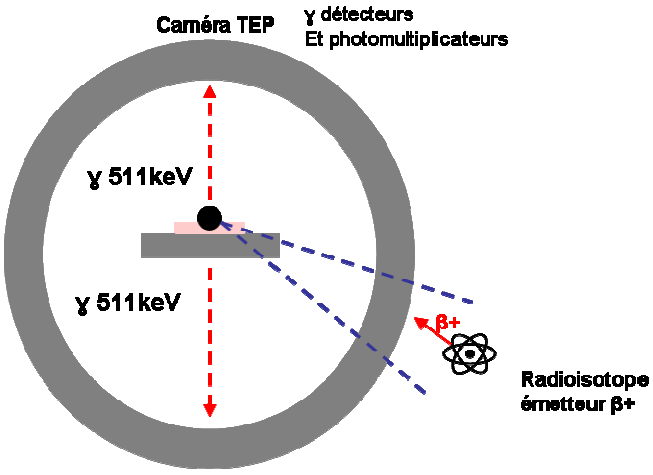


Figure 4 : Principe de la TEP

Les principaux champs d'application en clinique sont l'oncologie (diagnostic, caractérisation tumorale, stadification, suivi thérapeutique, restadification) (Kumar *et al.*, 2010), la neurologie (maladie d'Alzheimer et autres démences, maladie de Parkinson, pathologies vasculaires cérébrales) (Herholz *et al.*, 2004) ou encore la cardiologie et l'angiologie (métabolisme et viabilité myocardique, perfusion myocardique, athérosclérose) (Jonathan A. Pan *et al.*, 2016). Côté préclinique, l'étude de nouvelles stratégies thérapeutiques, le développement et l'évaluation de nouveaux traitements sur des modèles animaux intéressent tout particulièrement l'industrie pharmaceutique et les instituts de recherche biomédicale.

La TEP permet ainsi de mettre en évidence des phénomènes biologiques tels que le métabolisme énergétique, la prolifération cellulaire ou encore la liaison de macromolécules biologiques

(récepteurs, enzymes, anticorps). Elle peut également apporter des données concernant la pharmacocinétique et le mode d'action d'un principe actif.

Les contraintes de la TEP tiennent principalement à la courte période caractérisant les radionucléides les plus utilisés et au coût engendré par la production et la radiosynthèse des radiopharmaceutiques. Ainsi, il est nécessaire que la synthèse du radiopharmaceutique, l'injection au patient puis l'acquisition des images TEP soient réalisées dans un court délai.

c. L'imagerie TEP du petit animal

L'expérimentation animale est incontournable pour le développement des recherches dans les secteurs de la biologie, de la médecine et de l'industrie pharmaceutique. Les études font appel à des modèles animaux qui visent à mimer au mieux les processus pathophysiologiques et pathologiques rencontrés chez l'Homme. Les rongeurs sont des animaux de choix, d'une part par leur facilité d'élevage et de stabulation en animalerie, d'autre part en raison de l'avènement des techniques de manipulations génétiques chez la souris. Ainsi, la souris représente 90% des modèles de mammifère utilisés. En revanche, le cerveau d'une souris étant trop petit pour pouvoir être étudié aisément en imagerie externe, c'est en majorité le rat (avec un cerveau cinq fois plus gros) qui est utilisé dans le domaine des neurosciences.

La « microTEP » est un modèle réduit de la TEP utilisée dans l'imagerie diagnostique chez l'Homme mais adaptée à l'animal. Cette transposition n'a pu se faire que grâce à des avancées technologiques permettant l'analyse de structures à l'échelle réduite de l'animal. La volonté d'étudier des structures de plus en plus petites avec une sensibilité de plus en plus élevée a nécessité le développement de nouveaux systèmes de détection avec de nouvelles géométries des cristaux et des détecteurs de petite taille. Ainsi, les constructeurs ont adapté les caméras TEP humaines pour les applications chez le petit animal.

L'imagerie TEP du petit animal est une méthode très sensible. Elle peut permettre de suivre l'évolution métabolique d'une tumeur chez le petit animal au cours d'un traitement, sans avoir à sacrifier des lots d'animaux. Son caractère non invasif et la réalisation d'études longitudinales permettent d'évaluer l'efficacité antitumorale d'une molécule au cours du temps sur un même groupe d'animaux.

Lors de l'analyse, il n'y a pas de limite de profondeur, phénomène qui gène l'imagerie « optique », et on peut établir une quantification absolue de la radioactivité concentrée dans un tissu. Une caméra TEP animale (système MOSAIC, Philips Systèmes Médicaux) a été utilisée lors de cette thèse. Sa résolution est de l'ordre de 2 mm ; les machines les plus modernes permettent de descendre à une résolution submillimétrique.

d. Modalités hybrides

Aujourd'hui les modalités d'imagerie nucléaire sont hybrides associant une méthode d'imagerie anatomique avec une méthode d'imagerie fonctionnelle, améliorant ainsi le repérage des anomalies détectées par les techniques prises isolément. L'intérêt de combiner à la fois les données anatomiques et fonctionnelles a été reconnu dans le cadre des études cliniques (Czernin *et al.*, 2007) comme pour les applications précliniques. Le principal défi de la multimodalité est le recalage des images, plus complexe en imagerie préclinique pour laquelle les volumes étudiés sont de l'ordre du millimètre. La TEP peut être combinée avec l'imagerie TDM ou plus récemment IRM. L'ajout de l'imagerie TDM se fait par l'addition d'un anneau à la suite de l'anneau TEP. La TDM permet en outre de corriger l'atténuation des photons γ par les tissus biologiques, qui a en fait peu d'influence chez le rongeur du fait du petit volume de l'animal. La multimodalité TEP/IRM présente de nombreux défis technologiques. Le champ magnétique doit être très uniforme et très stable pour l'obtention d'une image sans artefact. L'IRM donnant l'information anatomique, ces instruments permettent donc d'éviter le cumul des rayonnements ionisants. De plus, l'IRM permet une meilleure visualisation des tissus mous, contrairement à la TDM. On retrouve ainsi en clinique et en préclinique la TEMP/TDM, la TEP/TDM et la TEP/IRM qui est une technique naissante.

II. Le radiopharmaceutique le plus utilisé en TEP: le ^{18}F-FDG

II.1. La synthèse du ^{18}F-FDG marquage direct par liaison covalente

Un cyclotron désigne un accélérateur circulaire de particules chargées. Il permet entre autres de produire du fluor-18 radioactif, qui peut ensuite être incorporé par radiochimie dans une molécule, par exemple le glucose. Le 2-désoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glucose (^{18}F-FDG) est un analogue du glucose dont le groupement hydroxyle en position 2 est substitué par un atome de fluor-18, obtenu grâce à un cyclotron. Cette méthode de marquage est dite directe car le radionucléide est directement fixé au vecteur (Figure 5).

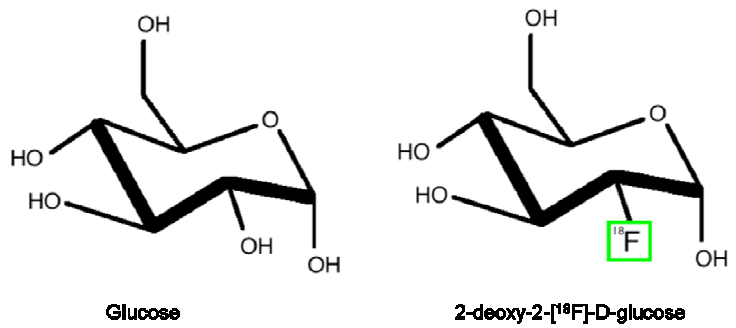


Figure 5 : Le 2-désoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glucose (^{18}F-FDG), analogue du glucose

La première synthèse de ^{18}F-FDG a été réalisée par Ido et al en 1977 (Ido *et al.*, 1977) selon une

méthode de fluoration électrophile se référant à l'addition d'atomes de fluor. Cette synthèse offrait un rendement radiochimique limité (17 % corrigé de la décroissance). Ce rendement a été optimisé et le ^{18}F-FDG a ainsi été utilisé pour la 1ère fois *in vivo* pour mesurer le métabolisme glucidique du myocarde chez l'animal en 1977 (Gallagher *et al.*, 1977), puis pour la première fois chez des patients pour mesurer le métabolisme cérébral par l'équipe de Michael Phelps (Phelps *et al.*, 1979, Reivich *et al.*, 1977), également développeur de la technique de tomographie basée sur l'utilisation des positons (Phelps *et al.*, 1975). Ensuite, les méthodes de synthèse ont été constamment optimisées jusqu'à la mise au point de la synthèse nucléophile par Hamacher et al. (Hamacher *et al.*, 1986) en 1986 qui reste aujourd'hui la synthèse de référence.

II.2. Les propriétés biologiques du ^{18}F-FDG

Son comportement *in vivo* est similaire à celui du glucose dont il est un analogue biologique. Il est transporté vers les tissus cibles par le plasma, incorporé dans les cellules grâce au transporteur transmembranaire du glucose GLUT et phosphorylé par une hexokinase en position 6. La plupart des cellules expriment physiologiquement de façon plus ou moins importante les transporteurs GLUT. Les cellules dont le métabolisme glucidique est augmenté accumulent le ^{18}F-FDG-6-phosphate (FDG-6-P), dont la métabolisation (conversion glucose/fructose) n'est pas possible à cause de l'atome de fluor-18 à la place d'un groupement hydroxyle. Comme la déphosphorylation par les phosphatases intracellulaires est un mécanisme lent, le FDG-6-P est retenu du fait de sa charge électrique dans les cellules du tissu pendant quelques heures (mécanisme de piégeage), ce qui permet la détection des tissus selon leur avidité pour le glucose.

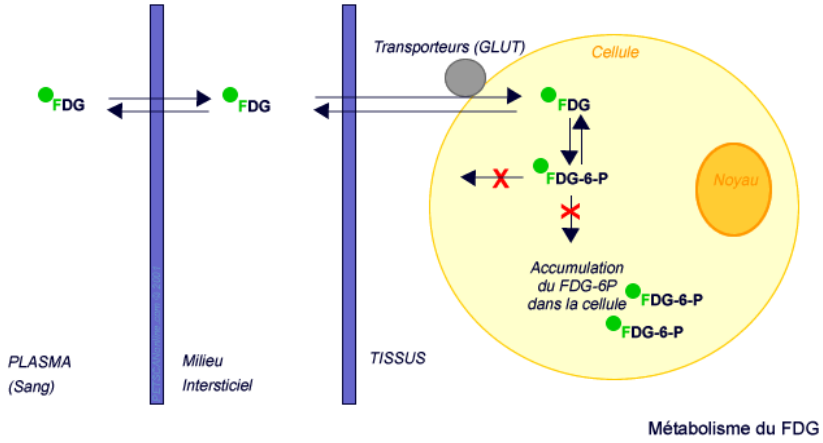


Figure 6 : Métabolisme du ^{18}F-FDG

(https://www.slideshare.net/fovak/positron-emission-tomography-and-assessment-of-cancer-therapy)

L'imagerie TEP permet de visualiser cette accumulation qui peut être pathologique ou simplement physiologique. En effet, le glucose constitue le substrat énergétique essentiel du cerveau et, comme

le ^{18}F-FDG franchit la barrière hémato-encéphalique, le cerveau est visualisé de façon intense sur les images TEP. Le système urinaire (reins et vessie) est également visualisé car le ^{18}F-FDG, contrairement au glucose dans les conditions physiologiques, n'est pas totalement réabsorbé au niveau du tubule rénal. Les muscles peuvent être visualisés en cas de contracture ou lorsqu'une activité musculaire intense précède l'examen. Le myocarde peut aussi être visible, selon semble-t-il que le jeûne a été plus ou moins bien respecté. Enfin, les glandes salivaires, le foie, l'estomac et le côlon peuvent fixer le ^{18}F-FDG de façon diffuse et modérée.

Chez l'Homme, les examens au ^{18}F-FDG représentent aujourd'hui environ 90% du diagnostic par TEP et leurs applications sont très variées. Le ^{18}F-FDG a obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en France depuis 1998 dans différentes indications :

- en neurologie, il met en évidence les foyers épileptogènes car ceux-ci présentent un hypométabolisme du glucose par rapport au reste du cerveau.
- en cardiologie, le ^{18}F-FDG est indiqué dans l'évaluation de la viabilité myocardique en dernière intention si les autres techniques d'imagerie ne sont pas concluantes.
- dans l'inflammation et certaines infections, le ^{18}F-FDG permet de détecter la présence anormale de leucocytes dans un organe ou un tissu. En effet, l'inflammation représente une réponse immunitaire non spécifique impliquant les macrophages ou les neutrophiles, des cellules qui, lorsqu'elles sont activées, utilisent de grandes quantités de glucose catabolisé par la voie des pentoses phosphates. Ces indications sont donc extrêmement variées : localisation d'un foyer anormal pour guider le diagnostic étiologique en cas de fièvre d'origine inconnue ou détection d'une infection chronique suspectée de l'os et/ou des structures adjacentes : ostéomyélite, spondylite, discite, ostéite, même en présence d'implants métalliques.
- en oncologie, il permet l'évaluation de la tumeur primitive et de ses métastases, la fixation par les structures infectées ou inflammatoire étant alors source de résultats faux-positifs.

Notre travail a porté sur les indications en oncologie.

II.3. Les applications en cancérologie

L'augmentation du nombre de transporteurs au niveau de la membrane cellulaire implique une augmentation du métabolisme du glucose. Cette forte activité de la glycolyse dans les cellules cancéreuses a été décrite par Warburg en 1927 (Warburg *et al.*, 1927). Cette adaptation métabolique irréversible des cellules cancéreuses porte le nom d'effet Warburg.

L'imagerie moléculaire peut détecter ces modifications fonctionnelles qui précèdent les changements morphologiques, en particulier dans le cancer. Le paramètre de TEP le plus utilisé pour mesurer l'accumulation du traceur dans une tumeur est la valeur maximale de fixation normalisée (SUVmax). Elle se définit comme le rapport de la fixation d'un traceur dans le tissu

d'intérêt (en kBq/mL) par l'activité injectée au patient (en kBq) rapportée à la masse corporelle du patient (en g), le SUVmax a pour unité g/mL.

Le ^{18}F-FDG est un radiopharmaceutique de choix pour les études TEP en oncologie.

- Il permet de caractériser une masse tumorale suspecte. Le ^{18}F-FDG est alors réalisé en deuxième intention lorsque la biopsie n'est pas possible ou lorsque les techniques d'imagerie classiques n'ont pu apporter une information claire.
- Il sert à stadifier la maladie, c'est-à-dire à dresser le bilan d'extension du cancer, et aide à la décision de traitement.
- Il permet une surveillance de l'évolution de la maladie sous traitement. En effet, l'activité métabolique dans les cellules tumorales diminue si le traitement est efficace. Ainsi l'intensité de fixation du ^{18}F-FDG possède une valeur pronostique sur la réponse au traitement.
- Il est utilisé pour évaluer l'efficacité d'un traitement curatif chirurgical ou par radiothérapie et déterminer la présence ou l'absence d'une maladie résiduelle.
- Enfin il permet un suivi à long terme des patients à risque après rémission de la maladie (cancers agressifs ou pour lesquels le taux de rechute est élevé) ou présentant une image douteuse en imagerie conventionnelle ou une augmentation de la concentration sérique d'un traceur biologique.

Bien qu'il donne des résultats satisfaisants dans de nombreux cancers, il présente différentes limitations liées à son manque de spécificité, à l'origine de résultats faux positifs. Ils sont dus à une suractivité métabolique de l'utilisation du glucose dans différents cas physiopathologiques non malins comme l'inflammation, certaines infections ou certaines tumeurs bénignes mais à métabolisme élevé. Parmi les cancers que nous avons étudiés expérimentalement, cette limitation est documentée dans le cas du cancer du pancréas dont le diagnostic est difficile, en particulier du fait de la fréquence de la pathologie inflammatoire non maligne. Inversement, certains cancers ne peuvent pas être détectés de façon sensible, comme les tumeurs cérébrales ou le cancer de la prostate. En effet, les cellules du système nerveux consomment naturellement beaucoup de glucose et la consommation des cellules tumorales est peu différente de celle des cellules normales, sauf en cas de tumeurs agressives. De plus, son usage est limité pour des cancers dont l'activité métabolique est faible comme les tumeurs neuroendocrines différenciées, les formes différenciées du carcinome hépatocellulaire ou du cancer de la prostate et de certains cancers bronchopulmonaires ou cancers du sein.

III. ^{18}F-FDG et cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez les femmes dans le monde. Le cancer du sein positif pour le récepteur des œstrogènes (ER) est le plus fréquent. L'hormonothérapie, première thérapeutique ciblée, a considérablement amélioré les résultats cliniques de ces cancers, mais

environ 20% - 30% des patientes finissent par présenter une récidive due à l'acquisition d'une résistance au traitement. L'identification de biomarqueurs complémentaires pour prédire l'hormono-sensibilité des lésions métastatiques d'un cancer initialement est alors une problématique clinique d'actualité à laquelle l'imagerie TEP/TDM essaye de répondre.

III.1. Le cancer du sein

a. Définitions

Le sein est constitué de différents tissus : épithélial, conjonctif, immunitaire, vasculaire qui peuvent tous donner des cancers. On peut donc observer des cancers d'origine épithéliale, mésenchymateuse ou encore lymphomateuse.

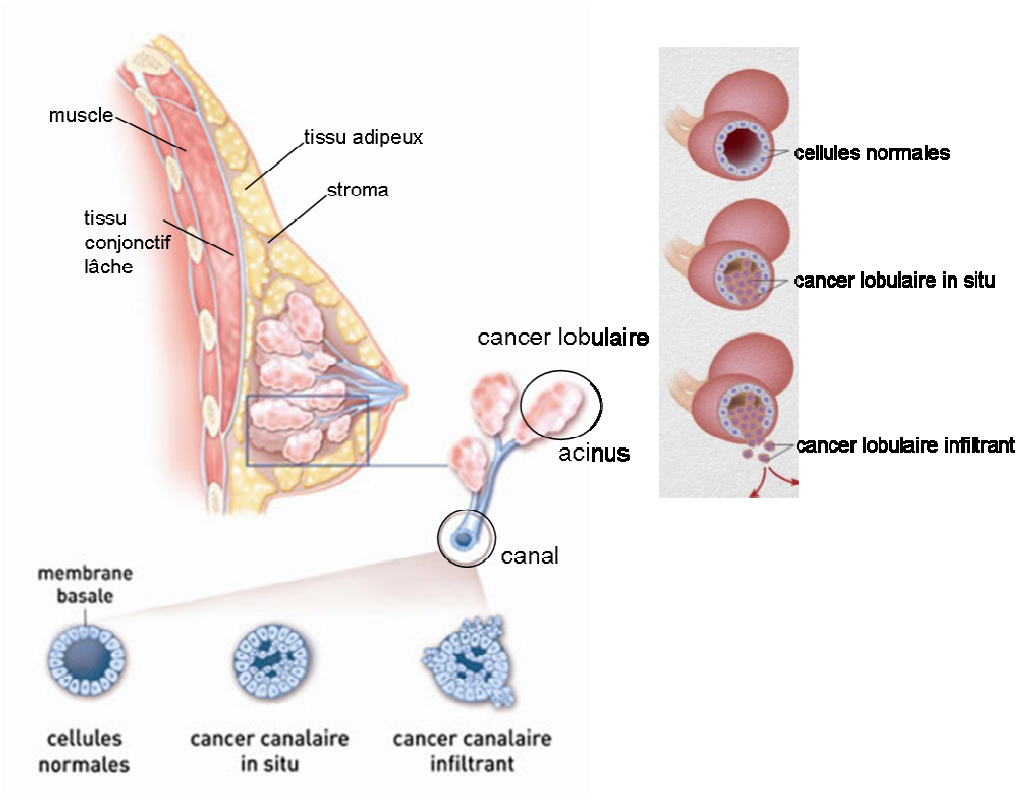


Figure 7 : Les carcinomes canalaires et lobulaires (http://www.e-cancer.fr)

Les plus fréquents sont de loin les carcinomes épithéliaux, qui peuvent être de deux types : les carcinomes canalaires et les carcinomes lobulaires. A un stade précoce, ils peuvent être localisés « *in situ* » (25% des cas), c'est-à-dire que la prolifération épithéliale maligne a lieu dans la lumière du canal galactophorique : il s'agit alors d'un carcinome intracanalaire ou dans l'acinus situé dans les lobules, cas du carcinome intralobulaire (Figure 7). La membrane basale est toujours respectée, il n'y a pas d'infiltration. A un stade plus avancé, ils sont dits « infiltrants ou invasifs » (75% des cas), envahissant le tissu mammaire, évoluant localement puis métastasant en premier dans les

ganglions axillaires (ganglions lymphatiques situés au niveau de l'aisselle). Le carcinome canalaire infiltrant (CCI) est le plus fréquent des cancers du sein et représente 75% des tumeurs mammaires invasives.

b. Contexte

Les carcinomes canalaires infiltrant sont d'agressivité très variable. Leur activité mitotique révélée par la détection immunohistochimique de l'antigène Ki67 peut être minime ou aller jusqu'à un taux de positivité de 80%.

Basé sur l'expression des récepteurs des œstrogène et de la progestérone (ER/PR) et sur le statut du récepteur du facteur de croissance épidermique humain (HER2), ils sont classés principalement dans les sous-groupes suivants (Figure 8) : luminal A (ER+/ PR+ / HER2 négatif) / luminal B (ER+/PR+/HER2+), HER2 positif (ER- / PR- / HER2 +), de type basal ou triple négatif (ER- / PR- / HER2-) (Dai *et al.*, 2015).

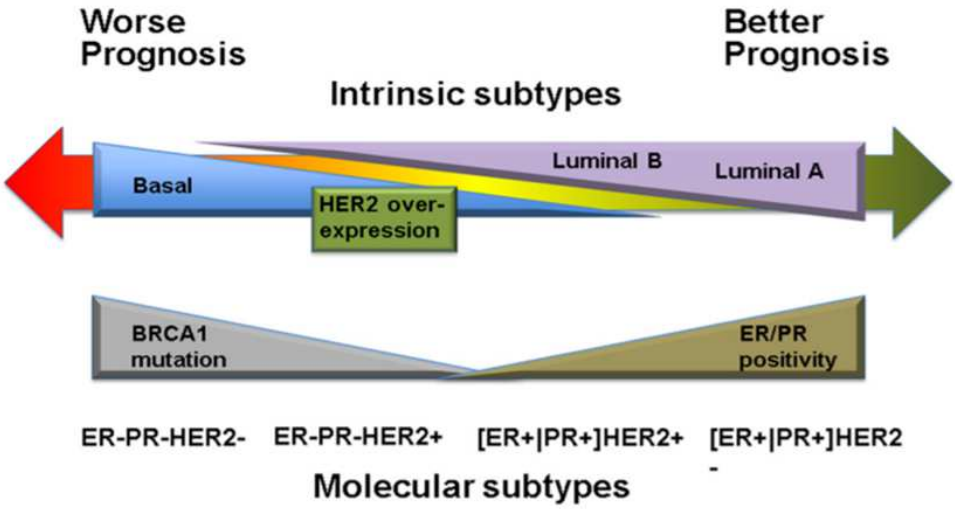


Figure 8 : Classement des carcinomes canalaires en fonction des sous-types moléculaires, d'après (Dai et al., 2015)

Les cancers du sous-type HER2 + peuvent être traités par des anticorps monoclonaux anti-HER2 ciblant la voie de signalisation HER2-dépendante. Les cancers triples négatifs présentent le sous-type avec le pronostic le plus défavorable puisqu'ils manquent d'options thérapeutiques ciblées (Figure 8).

Environ 70% des cancers du sein expriment ER et / ou PR (Lumachi *et al.*, 2013). La présence des ER est considérée comme un bon marqueur pronostique et est couramment utilisée pour identifier les cancers qui peuvent répondre à la thérapie endocrinienne ou hormonothérapie ciblant les voies de signalisation des ER. Le sous-type luminal A a un meilleur pronostic et est plus sensible à la thérapie endocrinienne que le sous-type luminal B (Hart *et al.*, 2015).

Le tamoxifène a été pendant près de 30 ans la référence du traitement par hormonothérapie mais ses effets secondaires ont favorisé l'arrivée de nouveaux médicaments de plus en plus actifs (inhibiteurs de l'aromatase, fulvestrant) élargissant les possibilités thérapeutiques (Chun-Yu Liu *et al.*, 2017).
Cependant, pour des raisons qui ne sont pas claires, plus de 30% des tumeurs ER + sont intrinsèquement résistantes aux anti-hormones (résistance de novo) dès le diagnostic du cancer. De plus, environ 40% des cancers du sein qui répondent initialement aux thérapies hormonales acquièrent ensuite une résistance (Abdel-Hafiz, 2017).
De plus, parce que les localisations métastatiques sont habituellement nombreuses et peu accessibles aux biopsies (Amir *et al.*, 2012), le statut ostrogénique des lésions métastatiques est habituellement considéré par le clinicien comme identique à celui de la lésion mammaire primitive. Cependant, en réalité, environ 40% des lésions métastatiques présentent un statut hormonal différent de celui de la tumeur primitive (Chung *et al.*, 2007).
Ainsi l'identification de biomarqueurs complémentaires pour prédire l'hormono-sensibilité tumorale est une problématique clinique d'actualité.

III.2. Intérêts et limites de la TEP/TDM au ^{18}F-FDG dans les carcinomes canalaires

a. Fixation mammaire physiologique du ^{18}F-FDG

Le tissu mammaire sain fixe le ^{18}F-FDG de façon modérée et variable. La densité du tissu mammaire est à l'origine de cette fixation significative. Le statut hormonal a également une influence sur la fixation du ^{18}F-FDG dans le tissu mammaire. Ces hyperfixations physiologiques restent cependant d'intensité très modérée (SUVmax moyen égal à 1,4 pour le tissu mammaire dense) (Vranjesevic *et al.*, 2003). La lactation induit également une fixation intense et diffuse de la glande mammaire (Hicks *et al.*, 2001).

b. Diagnostic initial

La TEP/TDM au ^{18}F-FDG n'est pas assez sensible (ni assez disponible en pratique) pour pouvoir être utilisée pour le dépistage du cancer du sein. Du fait de sa résolution spatiale limitée (environ 5mm), elle détecte moins de 50% des tumeurs mammaires malignes <1cm (Kumar *et al.*, 2006). De plus, elle donne des résultats faussement négatifs dans le cas des carcinomes de phénotype luminaux >1cm, bien différenciés avec une expression de Ki-67 faible (Humbert *et al.*, 2014). Le bilan standard d'imagerie repose sur la mammographie, éventuellement complétée par une échographie.

c. Stadification

En raison de sa résolution spatiale limitée, la TEP au ^{18}F-FDG ne met pas en évidence les micro-

métastases et les métastases ganglionnaires de petite taille. Pour les tumeurs mammaires de petite taille (<2cm), présentant une faible probabilité d'envahissement ganglionnaire, la TEP au ^{18}F-FDG n'est donc pas indiquée. On lui préfère la technique du ganglion sentinelle (Senkus *et al.*, 2013).
La TEP au ^{18}F-FDG peut être indiquée quand l'imagerie conventionnelle est peu concluante pour les patientes ayant une tumeur de taille supérieure ou égale à 5 cm ou une atteinte ganglionnaire clinique, des symptômes ou des dosages faisant suspecter une maladie métastatique ou des signes d'agressivité clinique ou biologique (Y. Liu, 2014).

d. Détection de récidive tumorale

Une récidive du cancer du sein est généralement suspectée en cas de symptômes cliniques, de ré-ascension des biomarqueurs biologiques sanguins (CA15.3 et ACE) ou d'apparition d'une image anormale lors d'un examen d'imagerie de surveillance systématique. Dans cette indication, la TEP/TDM au ^{18}F-FDG est un examen particulièrement performant pour localiser le (ou les) site(s) de récidive (Piva *et al.*, 2017) et restadifier le cancer.

e. Pronostic

Plusieurs études ont étudié l'influence du type histologique et des facteurs histo-biologiques (grade histo-pronostique, expression des récepteurs hormonaux....) sur l'intensité de fixation du ^{18}F-FDG par la tumeur donnée par la valeur de SUVmax (Figure 9) (Cochet *et al.*, 2014).

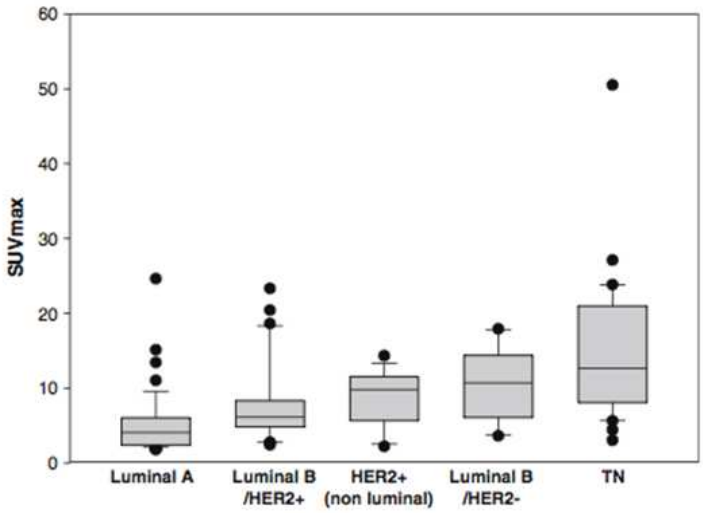


Figure 9 : Variation du SUV pré-thérapeutique d'un phénotype tumoral à l'autre (Cochet et al., 2014).

Il existe donc une corrélation entre l'indice de prolifération tumorale (expression du Ki67 en immunohistochimie) et l'intensité de captation du ^{18}F-FDG (De Cicco *et al.*, 2013, Ito *et al.*, 2015),

ainsi dans le cas des carcinomes luminaux, Ito et al. ont démontré que la TEP/TDM au ^{18}F-FDG permettait distinguer les tumeurs luminales A des luminales B suivant leur captation tumorale quantifiée en SUVmax et donc leur indice de prolifération (De Cicco *et al.*, 2013, Ito *et al.*, 2015).

f. Suivi thérapeutique

A l'heure actuelle, aucun marqueur biologique ou radiologique ne permet de prédire de manière précoce et fiable la réponse histologique complète d'une tumeur à un traitement. La TEP au ^{18}F-FDG permet une mesure *in vivo* du métabolisme glucidique tumoral, ainsi qu'un suivi évolutif de ce métabolisme en cours de chimiothérapie. L'intérêt est que les modifications du métabolisme glucidique tumoral, induites par la thérapie, précèdent la réduction de la taille tumorale observée en imagerie morphologique. La TEP/TDM au ^{18}F-FDG peut prédire l'efficacité de la chimiothérapie et/ou de l'hormonothérapie, tous sous-types confondus. Elle peut être utile en phase néo-adjuvante et au stade métastatique. Elle est en train de devenir un examen de référence de l'évaluation de l'efficacité des thérapeutiques, notamment dans le cadre d'essais cliniques évaluant de nouvelles thérapies ciblées (N. U. Lin *et al.*, 2015).

Néanmoins, elle est plus limitée dans le suivi des cancers de type luminaux ER+ caractérisés par une activité métabolique plus faible et donc démontrant des valeurs de SUVmax les plus faibles (Avril *et al.*, 2016), elle a permis de prédire une meilleure survie à 5 ans avant traitement (Humbert *et al.*, 2014) ou après traitement lorsqu'une faible diminution du SUV a pu être constatée (Groheux *et al.*, 2015).

Mais la fixation du ^{18}F-FDG peut aussi être impactée par l'hormonothérapie : ainsi Mortimer et al. ont décrit, chez les patientes répondeuses, une augmentation de la fixation du ^{18}F-FDG 7 à 10 jours après l'introduction du traitement au tamoxifène (Mortimer *et al.*, 2001). Cette réaction (dite d'embrasement ou flare up) peut s'expliquer par une augmentation initiale de la croissance cellulaire provoquée par un effet agoniste de la thérapie. Dans ce contexte, la TEP au ^{18}F-FDG prédit précocement la réponse du cancer à la thérapie endocrinienne (Mortimer *et al.*, 2001). En revanche, dans le cas d'une thérapie antiaromatase, qui abaisse la concentration sérique d'œstradiol et réduit ainsi l'effet agoniste sur la tumeur, on observe chez les patientes répondeuses une baisse précoce de la fixation de ^{18}F-FDG dans les tumeurs après l'induction de l'anti-aromatase (Kurland *et al.*, 2012).

Au-delà du ^{18}F-FDG, de nouveaux radiotraceurs sont en cours de développement. C'est le cas du 16α-18F-fluoro-17β-oestradiol (^{18}F-FES) qui aide à quantifier *in-vivo* le niveau d'expression de récepteurs des œstrogènes qui sont fonctionnels, lésion métastatique par lésion métastatique pour

une patiente donnée. Sa sensibilité et sa spécificité pour détecter les lésions ER positives sont respectivement de 84 et 98% (van Kruchten *et al.*, 2013). Plusieurs études ont étudié ou sont en cours pour confirmer la valeur prédictive de la TEP à la ^{18}FES pour prédire la réponse à l'hormonothérapie des cancers du sein métastatiques.

Néanmoins il existe toujours un besoin de mieux caractériser les lésions ER+ avec de nouveaux traceurs d'imagerie TEP et un besoin de mieux suivre l'efficacité d'un traitement avec un traceur indépendant du ^{18}F-FDG qui peut varier en fonction du traitement et indépendant de la cible du traitement.

IV. ^{18}F-FDG, pancréatite et adénocarcinome pancréatique

L'adénocarcinome canalaire pancréatique ou exocrine (PDAC de l'anglais pancreatic ductal adenocarcinoma) est une maladie dévastatrice. Elle représente le troisième cancer digestif en termes d'incidence, après le cancer du côlon et de l'estomac (Pannal, 1997) et le 4ème cancer en terme de mortalité aux Etats Unis (Parsons *et al.*, 2008) et dans les pays occidentaux. Le diagnostic et le traitement du PDAC restent difficiles.

Aujourd'hui aucun test de dépistage n'est efficace pour détecter les PDAC. L'antigène sérique CA 19-9, un antigène glucidique associé à la mucine, est détecté à une concentration élevée chez environ 75% des patients atteints d'adénocarcinome pancréatique et chez environ 10% des patients atteints d'un trouble bénin, ce qui le rend ni sensible ni spécifique pour la détection précoce d'un PDAC. La TDM multi-détecteur, l'échographie endoscopique, la cholangiopancréatographie rétrograde endoscopique, la TEP/TDM au ^{18}F-FDG, l'IRM et la cholangiopancréatographie par IRM sont les modalités d'imagerie reconnues, disponibles pour le diagnostic et la stadification du PDAC. Malheureusement les méthodes d'imagerie non invasives ont une efficacité limitée pour la détection de l'invasion locale et des petites métastases (Parsons *et al.*, 2008).

IV.1. Le pancréas

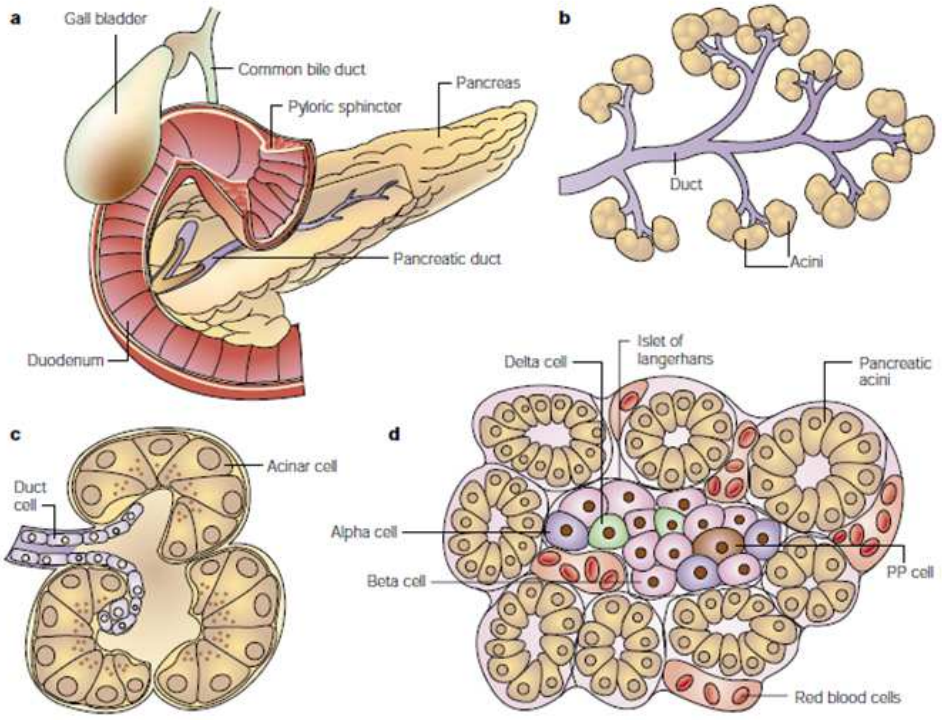


Figure 10 : Le pancréas a. Anatomie du pancréas. b. Le pancréas exocrine. c. Un seul acinus. d. Un îlot pancréatique intégré dans un tissu exocrine (Bardeesy et al., 2002).

Le pancréas est composé d'unités fonctionnelles distinctes impliquées dans deux processus physiologiques majeurs : la digestion et le métabolisme du glucose. Le pancréas exocrine est constitué de cellules acineuses et ductiles. Les cellules acineuses produisent des enzymes digestives et constituent l'essentiel du tissu pancréatique. Elles sont organisées en grappes de raisin. Les canaux, qui ajoutent du mucus et du bicarbonate au mélange enzymatique, forment un réseau aboutissant à des canaux pancréatiques principaux qui se vident dans le duodénum de leur suc pancréatique pour faciliter l'assimilation des nutriments. Le pancréas endocrine est constitué d'ilots de Langherans, intégrés dans le tissu acineux, il sécrète des hormones dans le sang. Il est composé de quatre types de cellules spécialisées : les cellules α et β régulent l'utilisation du glucose par la production de glucagon et d'insuline, respectivement. Le polypeptide pancréatique et la somatostatine produits dans les cellules PP et δ modulent les propriétés sécrétoires des autres types de cellules pancréatiques (Figure 10) (Bardeesy *et al.*, 2002).

IV.2. La pancréatite

On distingue deux types de pancréatite :

- la pancréatite aiguë est une inflammation soudaine du pancréas qui se traduit par des douleurs abdominales intenses. Elle est provoquée par des calculs biliaires ou par une consommation

abusive d'alcool dans 80% des cas mais peut être, de manière assez rare, un des symptômes précoces du cancer du pancréas, entrainant un retardement dans son diagnostic (Shaojun Li *et al.*, 2017).

- la pancréatite chronique survient le plus souvent après une période de pancréatite aiguë mais peut être liée à une inflammation pancréatique. Dans près d'un cas sur deux une pancréatite chronique est provoquée par la consommation prolongée et massive d'alcool. La présence de calculs biliaires, une pathologie héréditaire, une fibrose kystique, un taux de triglycérides élevé ainsi que certains médicaments peuvent également être des causes d'une pancréatite chronique. Le tabagisme est évoqué comme facteur de risque d'une pancréatite chronique. Il existe aussi deux formes de pancréatite chronique auto-immune: la pancréatite auto-immune de type I liée à une inflammation systémique auto-immune à IgG4. La pancréatite auto-immune de type II, moins fréquente, de découverte plus récente, qui est une maladie auto-immune associée dans 20 à 30 % des cas à une maladie inflammatoire chronique de l'intestin.

Ces formes pseudotumorales d'inflammation pancréatique peuvent simuler un cancer et représentent 5 à 10 % des interventions chirurgicales pour suspicion de cancer sous-jacent.

Elles peuvent également évoluer vers des lésions précancéreuses de type (PanIN) et aboutir à un cancer du pancréas (Lennon *et al.*, 2014).

IV.3. Le cancer du pancréas

Le PDAC est une tumeur maligne de l'épithélium du tissu de la glande pancréatique qui commence par une néoplasie intraépithéliale pancréatique (PanIN) de bas grade puis de haut grade, pour aboutir à un carcinome invasif (Figure 11) ; il représente environ 95% des cancers du pancréas.

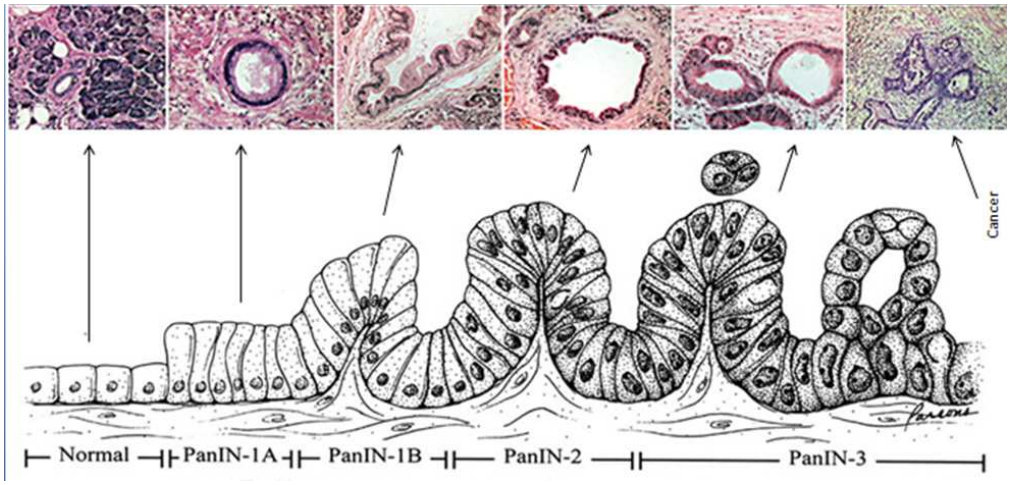


Figure 11 : Progression de l'épithélium sain au PanIN puis au carcinome

La progression d'un épithélium histologiquement normal à une néoplasie intraépithéliale pancréatique (PanIN) de bas grade (les PanINs sont des lésions microscopiques dans les canaux pancréatiques plus petits (<5 mm)), au PanIN de haut grade, au carcinome invasif (de gauche à droite sur la figure). (Hruban *et al.*, 2000)

Il produit grossièrement une masse solide et fortement sclérotique. C'est une maladie agressive caractérisée par son caractère invasif, sa progression rapide et sa résistance au traitement.

Le cancer du pancréas est principalement une maladie des personnes âgées. En outre, les hommes sont plus concernés que les femmes. L'âge et le sexe sont donc des facteurs de risque. Parmi les autres facteurs de risque établis, citons les régimes riches en viande et en matières grasses, les faibles concentrations sériques de folate, l'obésité, le diabète et la pancréatite chronique. Ce cancer est très difficile à détecter et n'a souvent aucun symptôme précoce. En outre, les symptômes ultérieurs sont non spécifiques et variés, comme des douleurs dans l'abdomen, une perte d'appétit et donc une perte de poids, une jaunisse indolore, un diabète sucré, une glycémie élevée, ou une dépression clinique. Le pronostic du cancer du pancréas est médiocre. Le taux de survie à 5 ans de tous les patients est inférieur à 5% et le temps médian de survie après le diagnostic est de 6 mois (Khosravi Shahi *et al.*, 2005).

Chez les patients atteints de PDAC, il est essentiel de déterminer la résécabilité de la tumeur primitive (résecable, limite ou non résecable) avant de proposer la chirurgie comme seul traitement curatif. La résécabilité est déterminée en fonction de la présence ou l'absence de métastases (par exemple, péritonéale ou hépatique) et du degré d'atteinte de la veine et/ou l'artère mésentérique supérieure, de l'axe cœliaque, de l'artère hépatique et l'artère gastroduodénale (Callery *et al.*, 2009). Les taux de complications chirurgicales restant élevés, il est nécessaire de bien sélectionner les patients éligibles à la chirurgie.

Chez les patients présentant un adénocarcinome localement avancé, un traitement palliatif est proposé par chimiothérapie ou par chimioradiothérapie (Huguet *et al.*, 2009).

IV.4. Intérêts et limites de la TEP/TDM au ^{18}F-FDG dans les PDAC

a. Diagnostic initial

La TEP/TDM au ^{18}F-FDG est un outil d'imagerie sensible pour la détection de l'adénocarcinome pancréatique avec une sensibilité (Se) rapportée de 85% -97% mais une spécificité (Sp) relativement faible et qui varie considérablement selon les différentes études de 61% -94%. Elle est indiquée en complément des autres techniques d'imagerie, comme outil d'aide à la biopsie chez les patients déjà suspectés, pour stadifier la maladie ou pour le suivi thérapeutique (Xiao-Yi Wang *et al.*, 2014).

Les raisons de cette faible spécificité peuvent s'expliquer par la fixation du ^{18}F-FDG par les masses pancréatiques focales (FMP) inflammatoires.

Le diagnostic différentiel entre pancréatite focale et PDAC a toujours été un défi. L'inflammation

chronique entraîne à long terme la fibrose du parenchyme pancréatique qui fait apparaître la lésion comme une masse de faible densité en TDM (van Kouwen *et al.*, 2005).

La TEP/TDM au ^{18}F-FDG aurait pu être la solution à ce problème. En effet, Reske et al [37] ont rapporté que la surexpression du transporteur de glucose 1 (GLUT1) était générale dans le PDAC, mais pas dans la pancréatite chronique, suggérant ainsi la possibilité de différencier le PDAC de la pancréatite focale. Des résultats allant dans ce sens ont été publiés par Imdahl et al. (Imdahl *et al.*, 1999) en 1999 et par van Kouwen et al. (van Kouwen *et al.*, 2005) en 2005 dans une étude prospective.

Cependant, la valeur de la TEP/TDM au ^{18}F-FDG pour le diagnostic différentiel entre PDAC et pancréatite chronique est toujours controversée, un consensus n'ayant pas été déterminé pour savoir si ou quand utiliser la TEP/TDM au ^{18}F-FDG.

La fixation du ^{18}F-FDG provoquée par une activité glycolytique accrue a été observée dans les cellules inflammatoires telles que les leucocytes neutrophiles et les macrophages activés (Jones *et al.*, 1994, Kubota *et al.*, 1992). En conséquence, le ^{18}F-FDG s'accumule dans diverses processus inflammatoires, y compris la pancréatite aiguë (Diederichs *et al.*, 2000), pancréatite auto-immune (Han *et al.*, 2014, S. Santhosh *et al.*, 2013a) et la formation de masse pancréatiques focales en relation avec à une pancréatite chronique (Kato *et al.*, 2013, S. Santhosh *et al.*, 2013c).

b. Stadification et évaluation de la résécabilité

Une stadification pré-opératoire précise est cruciale pour prendre une décision de traitement chirurgical et éviter une chirurgie lourde et inutile. En général, la résécabilité du cancer du pancréas dépend :

- de l'invasion tumorale locale des principales structures vasculaires. Strobel et al. (Strobel *et al.*, 2008) ont rapporté que la TEP/TDM au ^{18}F-FDG a permis de détecter 100% des infiltrations artérielles.

- des métastases ganglionnaires à distance (stade N). Le PDAC envahit à un stade précoce les ganglions lymphatiques ; dans une étude japonaise, 37% des tumeurs <2 cm de diamètre étaient déjà métastatiques au niveau des ganglions lymphatiques lors de la stadification initiale (Egawa *et al.*, 2004). Si la TEP/TDM au ^{18}F-FDG a obtenu de bons résultats dans la stadification N d'autres tumeurs malignes comme le cancer du poumon non à petites cellules, son utilisation dans le PDAC est limitée (Imai *et al.*, 2010) probablement à cause de la petite taille de ces lésions, fréquemment de moins de 5 mm diamètre.

- La TEP/TDM au ^{18}F-FDG est par contre très efficace pour détecter les métastases pulmonaires et osseuses mais l'est beaucoup moins pour détecter les métastases hépatiques, probablement à cause

des effets de volume partiel et/ou du bruit de fond métabolique du foie sain (Xiao-Yi Wang *et al.*, 2014).

De manière générale, la plupart des études s'accordent sur le fait que la TEP/TDM au ^{18}F-FDG fournit des informations supplémentaires par rapport à l'imagerie conventionnelle et peut entrainer une modification dans la décision de résécabilité et la prise en charge des patients (Barber *et al.*, 2011).

c. Détection de récidive cancéreuse et suivi thérapeutique

La détection précoce de la récidive tumorale et le suivi post opératoire sont cruciaux pour prescrire un traitement individualisé optimal (Kleeff *et al.*, 2007). L'élévation de la concentration sérique de CA19-9 s'est avérée être un indicateur sensible lors d'une récidive mais ne fournit pas d'information concernant l'emplacement de la récidive. Par contre son utilisation pour indiquer une TDM multi-détecteur et/ou une TEP au ^{18}F-FDG semble être la meilleure approche pour la détection de récidive du PDAC (Hamidian Jahromi *et al.*, 2013).

La TEP/TDM au ^{18}F-FDG a été utilisée avec succès pour surveiller les 'réponses métaboliques tumorales pendant la chimiothérapie et / ou la radiothérapie d'un cancer du pancréas non résécable (Choi *et al.*, 2010).

d. Indice de pronostic

L'indice de prolifération Ki-67 est un facteur important qui définit le potentiel malin d'une lésion. Dans le cas du cancer du pancréas, il a prouvé son efficacité pour différencier PDAC et pancréatite. Cependant, aucune corrélation significative n'a été trouvée dans une étude entre l'immunoréactivité de Ki-67 et la fixation de ^{18}F-FDG ($P = 0,65$) (Buck *et al.*, 2001).

La corrélation entre la réponse métabolique de la tumeur évaluée en TEP/TDM au ^{18}F-FDG et son pronostic est encore controversée. Certaines études démontrent tout de même qu'un SUVmax élevé en pré-opératoire est associé à une faible survie sans progression (Chikamoto *et al.*, 2017, Yamamoto *et al.*, 2015).

En conclusion, la TEP/TDM au ^{18}F-FDG est une modalité utile pour la détection du PDAC. Ses résultats faux-positifs dans le cas des masses pancréatiques indéterminées réduisent sa spécificité. Son utilisation dans la stadification tumorale est limitée par une sensibilité relativement faible dans la détection des ganglions lymphatiques métastatiques. Cependant, la plupart du temps, les informations supplémentaires obtenues sur la présence de métastases à distance sont cruciales pour la prise en charge des patients. La TEP/TDM au ^{18}F-FDG permet un bon suivi de la réponse métabolique, dans l'évaluation de différents types de traitements. C'est aussi un outil précieux pour

détecter les récidives suspectées. Bien que de nombreux efforts aient été faits pour améliorer l'efficacité diagnostique de la TEP/TDM au ^{18}F-FDG dans les PDAC, les résultats ne sont pas optimaux en particulier pour la caractérisation de masses douteuses et la stadification ganglionnaire initiale.

La découverte de radiotraceurs plus spécifiques du PDAC que le ^{18}F-FDG pourrait permettre de pallier les limites de cette technique.

V. Les radiotraceurs peptidiques

Le marquage d'une molécule d'intérêt par un radionucléide peut être envisagé suivant deux approches. La méthode directe permet de le fixer directement au vecteur comme c'est le cas pour le ^{18}F-FDG vu précédemment au chapitre II.1. La méthode indirecte utilise un chélate bifonctionnel capable de lier le radionucléide à une extrémité et la molécule biologiquement active à l'autre. Cette stratégie dite de coordination est principalement utilisée pour le marquage des macromolécules (peptides, protéines, oligonucléotides, anticorps) et permet de cibler des processus biologiques spécifiques, comme la surexpression de certains récepteurs en surface des cellules tumorales.

Ces radiotraceurs spécifiques sont constitués en général de quatre parties (Figure 12) :

- un **radionucléide cation métallique**, tels que ^{111}In3+ émetteur γ pour la TEMP, ^{64}Cu2+ et ^{68}Ga3+ émetteurs β+ pour la TEP ou éventuellement ^{90}Y ou ^{177}Lu émetteurs β- pour la radiothérapie interne ciblée. Ses propriétés physiques (période, nature et énergie des rayonnements émis...) doivent être adaptées aux besoins (applications diagnostiques ou thérapeutiques) et sa période physique doit être compatible avec la pharmacocinétique du traceur et la durée du phénomène biologique observé, tout en minimisant la radioexposition du patient en imagerie diagnostique.
- un **agent chélatant bifonctionnel** 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 radionucléide métallique.
-**une biomolécule d'intérêt ou ligand** permettant le ciblage spécifique d'un récepteur ou d'une structure surexprimé dans un tissu pathologique nommé cible, ce ligand doit présenter une haute affinité et une haute spécificité pour sa cible.
- un **groupement chimique espaceur dit « linker ou spacer ».** Celui-ci permet d'éloigner le chélate et le radionucléide du ligand afin d'éviter un encombrement stérique empêchant la liaison du radiotraceur à sa cible biologique (J. C. Reubi, 2003). Il peut également moduler la cinétique d'excrétion du radiotraceur pour optimiser le rapport entre l'activité de la tumeur et celle du bruit de fond, en minimisant sa captation par des organes non cibles tels que ceux responsables de son élimination. Les peptides radiomarqués étant éliminés principalement par la voie rénale (hydrophilie de la molécule) ou par la voie hépatobiliaire (caractère lipophile de la molécule), la

voie d'excrétion des peptides peut être modifiée par l'introduction d'acides aminés à caractère hydrophile (comme un acide poly aspartique) pour favoriser la clairance rénale ou l'ajout d'un groupement polyéthylène glycol (PEG) pour diminuer la captation hépatique (ralentir l'extraction par les hépatocytes). Il a été rapporté que ces groupements « linkers » ont un impact significatif sur la biodistribution d'un radiotraceur ou son affinité pour sa cible (Amouroux *et al.*, 2015).

Chacune de ces constituants peut avoir un impact sur la charge, la solubilité et la taille de la molécule entière ainsi que sur sa liaison aux protéines plasmatiques et donc modifier la clairance et la distribution du radiotraceur dans l'organisme.

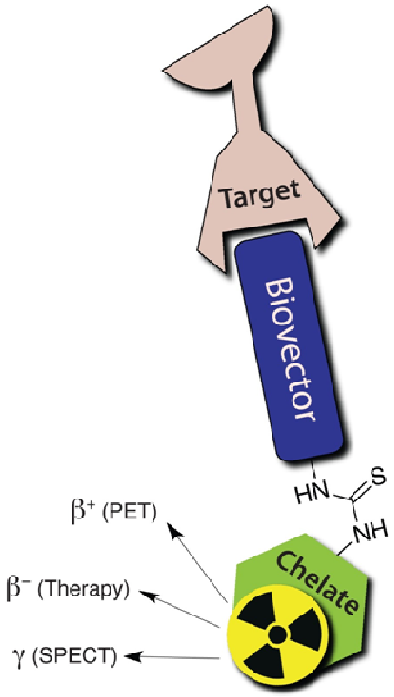


Figure 12 : Illustration d'un radiotraceur, basé sur un chélate bifonctionnel conjugué à une biomolécule vectrice d'intérêt (biovector), d'après https://research-groups.usask.ca/price/research.php

Dans ce contexte, le marquage par coordination de peptides pour l'imagerie des cancers s'est considérablement développé au cours de ces dernières années.

L'utilisation de peptides comme ligands présente plusieurs avantages. Il s'agit de molécules de petite taille et de faible poids moléculaire, ce qui leur confère une excellente perméabilité vasculaire. De plus, ayant des structures similaires à celle des peptides endogènes, ils présentent 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 faciles à synthétiser et à modifier.

La difficulté réside dans la dégradation rapide in vivo des ligands peptidiques de récepteurs. Il faut donc modifier la séquence du ligand naturel pour rendre le peptide résistant à la dégradation enzymatique, tout en conservant une structure suffisamment proche du ligand naturel pour conserver une bonne affinité pour leurs récepteurs.

Le radiotraceur peptidique idéal doit donc être facile et rapide à marquer, être stable et résistant à la dégradation *in vivo*, être spécifique pour éviter des résultats faussement positifs et avoir une bonne sélectivité tumorale, c'est-à-dire un rapport de la radioactivité entre tumeur et tissus sain élevé, avoir une très bonne affinité pour sa cible ainsi qu'une faible toxicité avant et après le marquage radioactif. Dans cette partie, nous exposerons principalement l'intérêt des agents d'imagerie peptidiques marqués par une chimie de coordination au gallium-68 et nous détaillerons principalement leurs intérêts et leurs avantages pour le diagnostic du cancer.

VI. Les radiotraceurs peptidiques marqués au gallium-68

VI.1. Propriétés chimiques et nucléaires du gallium-68

Le gallium-68 est un des radionucléides du gallium. Il est actuellement obtenu en pratique médicale grâce à un le générateur qui a obtenu une AMM, à partir du germanium-68 qui se désintègre par capture électronique en gallium-68 qui lui-même se désintègre par émission de positons (à plus de 89%) en zinc-68, un élément stable (Figure 13). Sa période physique est compatible avec les propriétés pharmacocinétiques des vecteurs avec lesquels il est associé : éléments de faible poids moléculaire tels que des peptides ou des fragments d'anticorps. De plus, la chimie de coordination du gallium sous forme de cation métallique trivalent $^{68}Ga^{3+}$ est simple et relativement bien connue, facilitant le radiomarquage.

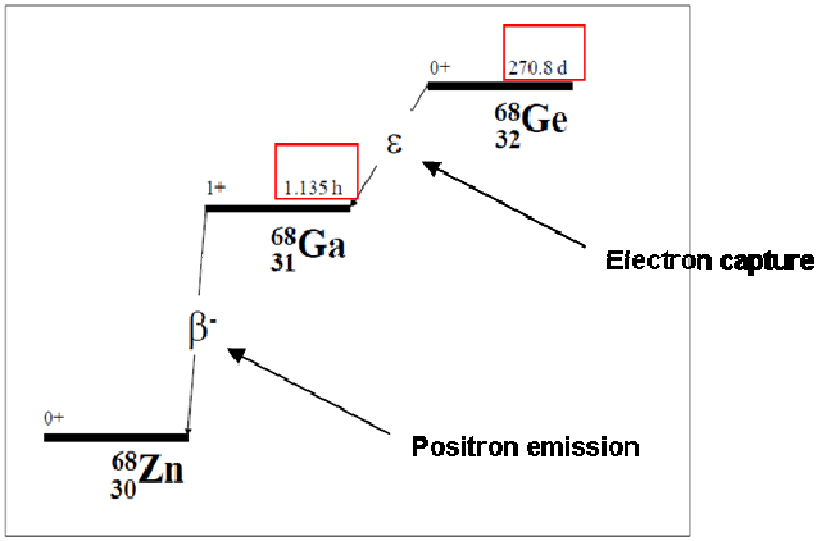


Figure 13 : Décroissance du gallium-68 et de son élément père le germanium-68, adapté de (Zimmerman et al.*, 2008)*

VI.2. Production du gallium-68

a. Système de générateur

Le générateur de $^{68}Ge/^{68}Ga$ désigne un dispositif contenant le radionucléide parent le germanium-68, de période physique longue (270 jours), qui se désintègre en son radionucléide de filiation, le gallium-68, de période plus courte (68 min). La période physique de l'élément père permet une utilisation prolongée du générateur, durant 12 mois à partir de la date de calibration, mais bien plus longtemps dans les laboratoires de recherche préclinique qui peuvent se contenter d'une activité éluée plus faible. Les deux radionucléides sont adsorbés sur une colonne échangeuse d'ion. Les générateurs utilisés au cours de nos travaux étaient composés d'une matrice inorganique métallique d'oxyde de titane TiO2 (IGG100 ^{68}Ga generator or Obninsk ^{68}Ga generator ; Eckert&Ziegler Europe). Une élution par une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 0,1 mol/L permet de recueillir le gallium-68 et fournit un éluat composé de gallium-68 sous forme ionique en solution aqueuse : le $^{68}Ga3+$. En pratique, un tel générateur peut être élué toutes les 3 heures et demie pour éluer presque une activité de ^{68}Ga presque égale (90%) à celle du ^{68}Ge encore présent (Figure 14).

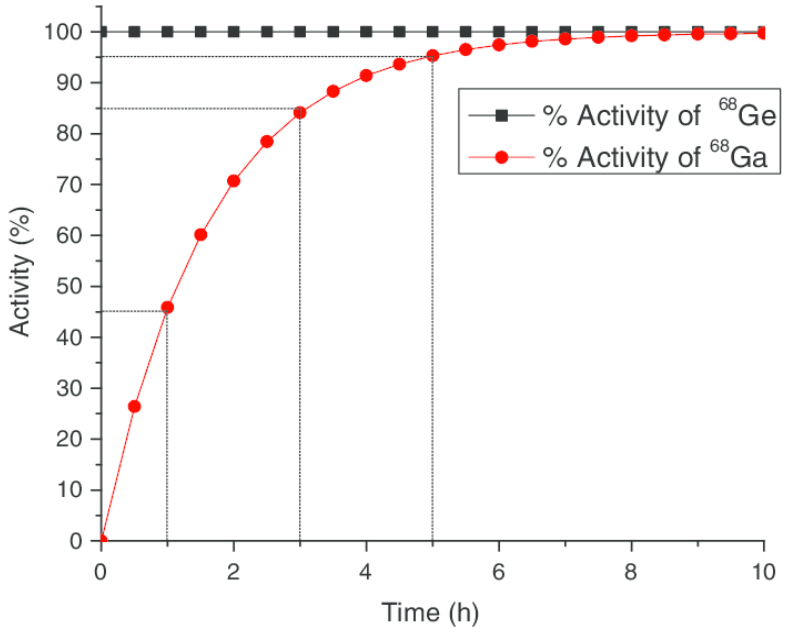


Figure 14 : Régénération d'un générateur de $^{68}Ge/^{68}Ga$ (Nanabala et al.*, 2016)*

L'éluat des générateurs est utilisé comme une matière première pour le radiomarquage au gallium-68des médicaments radiopharmaceutiques. Depuis 2013, la commission européenne de la pharmacopée lui a attribué une monographie appelée « solution de Gallium (^{68}Ga) (Chlorure de) pour radiomarquage » qui définit sa qualité.

b. Qualité du gallium-68

La première difficulté du marquage au gallium-68 est la présence dans l'éluat d'une concentration élevée en ions H^+ due à l'élution par une solution d'acide chlorhydrique. En effet, elle peut entrainer la protonation des groupements fonctionnels de l'agent chélatant, limitant sa liaison au gallium-68. La seconde difficulté est l'existence d'impuretés métalliques qui entrent en compétition avec le ^{68}Ga3+ pendant le radiomarquage, diminuant son rendement.

Deux objectifs sont ainsi fixés pour l'obtention de la meilleure qualité de gallium-68 :

- Diminuer la concentration en ions H +

L'élution est réalisée selon une méthode dite « de fractionnement », technique mécanique basée sur une élution du générateur mL par mL. Décrite en 2005 (Breeman *et al.*, 2005), cette méthode a été entièrement automatisée en 2007 (Decristoforo *et al.*, 2007). Ce principe repose sur une distribution gaussienne de la radioactivité dans le volume total d'élution (Figure 15). Les fractions centrales contenant l'activité volumique en gallium-68 la plus importante sont conservées, les autres éliminées. Cette technique permet de réduire au maximum le volume global de l'éluat (1,5 au lieu de 5mL), augmentant ainsi l'activité volumique.

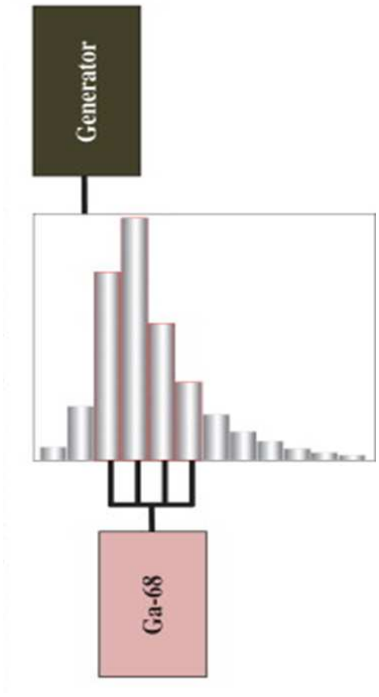


Figure 15 : Elution fractionnée, adaptée (Rösch, 2013)

- Présence de germanium-68 et d'impuretés métalliques

Les éluats des générateurs ^{68}Ge/^{68}Ga ne sont pas purs d'un point de vue chimique et radionucléidique et leur composition se dégrade au fur et à mesure des élutions, notamment du fait de l'irradiation permanente par l'élément père de la matrice où il est fixé. Cette détérioration

entraine le décrochage de germanium-68 et d'impuretés métalliques comme le fer ou le zinc. Ces éléments métalliques entrent alors en compétition avec le $^{68}Ga3+$ pendant le radiomarquage, diminuant son rendement. Différentes stratégies de pré-purification de l'éluat basées sur des chromatographies anioniques ou cationiques ont permis d'améliorer sa qualité par l'augmentation de son activité spécifique et la diminution de sa contamination en germanium-68 (Mueller *et al.*, 2012, Zhernosekov *et al.*, 2007). Cependant, avec le générateur GMP (GalliaPharm® de la société Eckert&Ziegler), possédant une AMM européenne depuis fin 2014, il est possible de procéder par élution fractionnée. Pour éliminer le zinc-68 au maximum et garantir un éluat de qualité reproductible, la meilleure méthode consiste à éluer le générateur lorsqu'il n'a pas été élué durant plusieurs jours et éliminer cet éluât (pré-élution la veille ou le matin).

c. Réglementation des radiopharmaceutiques TEP

Les médicaments radiopharmaceutiques marqués au gallium-68 qui n'ont pas encore d'AMM sont définis comme des médicaments expérimentaux radiopharmaceutiques stériles et des préparations hospitalières autorisées pour la conduite d'essais cliniques. Leur fabrication est sous la responsabilité du radiopharmacien après autorisation de l'essai par l'ANSM et l'accord du Comité de Protection des Personnes.

Le 1er traceur marqué au gallium-68 vient d'obtenir une AMM en France le 5 avril 2017. Il s'agit du ^{68}Ga-édotréotide (ou ^{68}Ga-DOTATOC) du laboratoire IASON GmbH, IASOTOC® a obtenu l'AMM pour le diagnostic TEP des tumeurs neuroendocrines et des méningiomes et se fixe spécifiquement aux récepteurs de la somatostatine. Plus récemment, une AMM a été octroyée au niveau européen à l'édotréotide radiomarqué au lutétium-177 produit par le laboratoire Advanced Accelerator Applications.

d. Automatisation des procédures de marquage

Les radiomarquages développés en recherche préclinique commencent souvent par une phase d'optimisation manuelle des conditions (Nalin *et al.*, 2014). Néanmoins afin d'améliorer la radioprotection du personnel et de faciliter un transfert vers l'utilisation clinique de routine, des modules de marquage automatiques ont été développés. Ils sont contrôlés par un logiciel qui permet de piloter à distance une séquence d'opérations nécessaires au marquage. Ils permettent une plus grande reproductibilité, notamment au niveau des étapes critiques du marquage comme l'élution du générateur ou les étapes de purification (Decristoforo *et al.*, 2007).

Les modules possèdent donc une partie mécanique (les pompes, les sondes, les tubulures, etc.) et une partie gérant les produits chimiques (les gaz de poussée, les solvants, etc.). Dans ces modules, tout le petit matériel est fixe et réutilisable, les tubulures sont accessibles et modifiables à souhait.

Les modules utilisés en recherche sont extrêmement flexibles, la modification à volonté des paramètres de séquence pour l'optimiser un marquage est possible. Parmi ces modules, on trouve le *Modular-lab Pharm Tracer* d'Eckert et Ziegler et le *Synchrom R&D* de Raytest, (Figure 16) qui a été utilisé durant toute notre étude pour l'optimisation des marquages au gallium-68.

Figure 16 : Module Synchrom R&D de Raytest, disponible au LIMP

Les modules destinés à un marquage régulier pour la routine clinique correspondent à un cahier des charges différent : tout le procédé de fabrication est fixé par avance, les paramètres sont contrôlés en permanence et les données de synthèse sont tracées et stockées. Les consommables sont stériles et jetables. Récemment, des modules à cassettes ont fait leur apparition sur le marché, ils s'utilisent avec des cassettes à usage unique jetables contenant tout le matériel nécessaire (Velikyan *et al.*, 2017) (Figure 17).

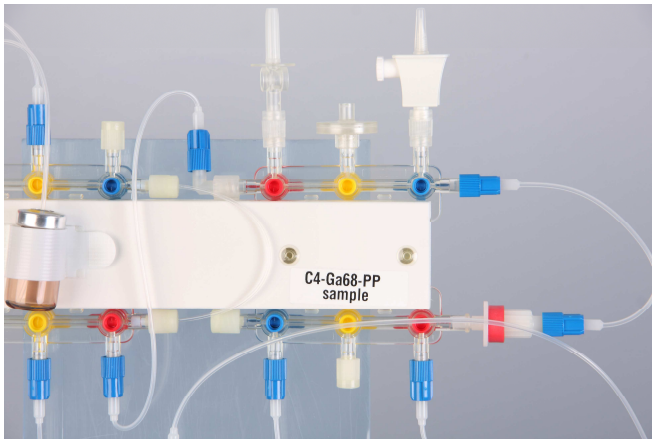


Figure 17 : Cassette à usage unique (Eckert & Ziegler)

VI.3. Les conditions de marquage

Compte tenu de la durée de vie courte du radionucléide (68 min), on cherche toujours à améliorer les conditions de préparation de l'agent radiomarqué, et en particulier à obtenir une complexation très rapide et simple.

Pour optimiser l'efficacité d'un radiomarquage, différents paramètres peuvent être ajustés :

a. La quantité de peptide

Un générateur utilisé en préclinique élue environ 100-300 MBq, équivalent approximativement à 1 à 3 pmol de ^{68}Ga3+ dans 1,5 mL de solution. Des chélateurs hautement efficaces sont nécessaires pour complexer de si faibles concentrations d'ions métalliques tout en utilisant de faibles concentrations de conjugué chélateur-peptide. Par exemple, le ^{68}Ga3+ et le DOTA se fixant dans un rapport 1 pour 1, la quantité de peptide utilisée et sa concentration dans la solution réactionnelle influencent le rendement de marquage. Pour la chélation au DOTA, plusieurs auteurs proposent une quantité minimum de 14 nmol de peptides. Pour des quantités inférieures, le phénomène d'adsorption des molécules sur le verre devient trop important (Asti *et al.*, 2008, Zhernosekov *et al.*, 2007). Dans ce cas, les rendements de marquages sont de 75-95 %.

b. Les tampons réactionnels

Une autre des difficultés du marquage est que le gallium ne se fixe que sous forme $^{68}Ga^{3+}$ et cette forme n'existe qu'à des pH acides. Au-delà de pH 3, on commence à observer des formes hydroxylées de gallium qui ne peuvent pas se fixer au niveau du chélatant. Le pH de la réaction de complexation est donc un paramètre crucial à contrôler. Il impacte le rendement de marquage et l'activité spécifique du produit.

Le chélate DOTA par exemple permet un marquage optimal du gallium à un pH compris entre 3,5 et 4. A un pH supérieur, le $^{68}Ga^{3+}$ a tendance à former des colloïdes oxo- et hydroxogallium empêchant la réaction de marquage, tandis qu'à un pH plus faible, le rendement de marquage est moindre (Meyer *et al.*, 2004). Des tampons sont donc utilisés pour conserver un pH constant lors d'un apport faible d'acide ou de base. L'acétate de sodium a été proposé pour sa parfaite innocuité chez l'Homme. Mais les ions sodium peuvent entrer en compétition avec le Ga3+ pour former des complexes avec le chélate DOTA, diminuant ainsi fortement le rendement de marquage.

c. Le chauffage

Un autre facteur limitant est le chauffage, indispensable pour catalyser la réaction de complexation entre le chélate et le Ga3+ et augmenter le rendement de marquage. Pour éviter la dénaturation du peptide, une température inférieure à 100°C est préconisée.

De manière intéressante, Velikyan et al. ont comparé des marquages (utilisant 1 mL d'éluât de

gallium-68 obtenu par fractionnement, 5 nmoles de peptide DOTATOC, à pH 4,6 avec de l'acétate de sodium) réalisés soit avec leur système de chauffage par micro-ondes à 90 ±5 °C en 1 min soit de façon classique avec un bloc chauffant à 95°C. Ils ont obtenu des rendement de marquage du peptide de plus de 98 % grâce à leur système de chauffage par micro-ondes, et ont montré une diminution du temps de marquage d'un facteur 10 (Velikyan *et al.*, 2004). Néanmoins certains peptides sont plus thermolabiles et dans ce cas, l'utilisation de certains chélates bifonctionnels permettant des marquages à température ambiante est préconisée (Tornesello *et al.*, 2017).

d. Les chélates bifonctionnels

Un chélatant bifonctionnel idéal doit tout d'abord :

- être compatible avec la nature du radiométal choisi. Historiquement (dans les années 1980), le premier complexe ^{68}Ga-chélate cliniquement pertinent a été dérivé d'un ligand bien établi pour la chimie de coordination des métaux trivalent, l'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique). Le ^{68}Ga-EDTA a été obtenu en éluant la première génération de générateurs de radionucléides ^{68}Ge / ^{68}Ga avec une solution aqueuse contenant de l'EDTA. L'éluat du générateur se trouvait ainsi sour la forme du complexe ^{68}Ga-EDTA, directement injecté par voie intraveineuse. Le but était de suivre la cinétique de perfusion sanguine dans divers organes, en particulier dans le cerveau (Mosskin *et al.*, 1986). Le DOTA, chélate utilisé ensuite pour la formation de complexes avec le ^{68}Ga n'est apparu que plusieurs décennies plus tard en 2002 (Froidevaux *et al.*, 2002).

- avoir une cinétique de complexation rapide, surtout pour les radionucléides à période courte tel que le gallium-68. L'efficacité du radiomarquage est un critère utilisé pour décrire la capacité d'un chélateur à réaliser un marquage avec un rendement élevé et une haute pureté radiochimique (>90%).

- former des chélates avec le radionucléide qui soient stables *in vivo,* pour prévenir leur dissociation entraînant une biodistribution non spécifique du radiotraceur. Plus le complexe est stable cinétiquement, plus on évite la transmétallation ou transchélation. En effet, le gallium et le fer (Fe) ont un comportement chimique similaire. La plupart des molécules chélatant le fer sont susceptibles de fixer également le gallium entrainant la liaison *in vivo* d'une partie du ^{68}Ga à la transferrine (Gunasekera *et al.*, 1972). En imagerie, cette affinité du gallium pour la transferrine explique la forte fixation de la radioactivité au niveau pulmonaire, hépatique et osseux. Sur la figure 18 on peut voir la différence de biodistribution d'un ^{68}Ga-chélate par rapport au ^{68}Ga libre, donnant des images TEP chez la souris complètement différentes.

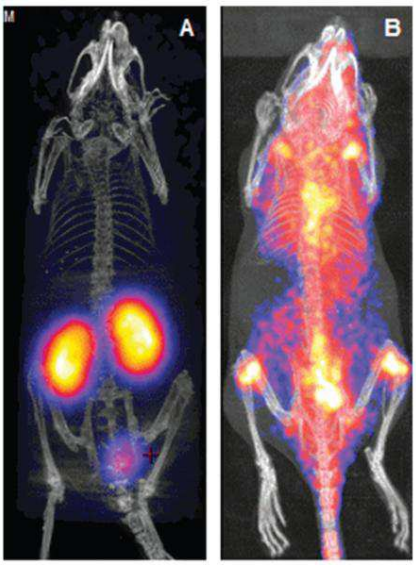


Figure 18 : ^{68}Ga-chélate (A) versus ^{68}Ga contre (B) chez la souris, image TEP/TDM réalisée 90 min après injection (Berry et al.*, 2011)*

- enfin, afin de pouvoir être vectorisé sur une molécule biologique, le chélate idéal doit pouvoir être lié de façon covalente à un peptide d'intérêt en utilisant une chimie de conjugaison facile. Les principales cibles des fonctions de greffage sont les fonctions réactives des acides aminés naturels disponibles. On cible donc majoritairement des amines primaires (NH_2) en N-terminal de la chaine polypeptidique ou des résidus lysine. La fonction thiol (SH) de la cystéine, le groupement phénol de la tyrosine, la fonction acide (COOH) sont également des sites permettant un couplage aisé (Figure 18) (Hermanson, 1996).

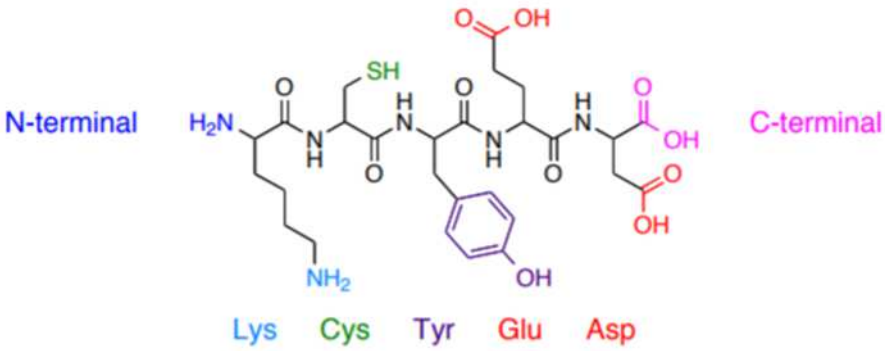


Figure 19 : Principaux acides aminés utilisés pour la bioconjugaison du chélate, d'après la thèse de Mathieu Moreau « Marquage de molécules biologiques par des complexes de radiométaux à base de polyamines macrocycliques »

Ainsi, une variété de chélateurs bifonctionnels ont été développés pour l'imagerie médicale ou la thérapie (Spang *et al.*, 2016). Ils sont essentiellement classés en deux grandes familles, l'une rassemble les chélatants acycliques polyaminopolycarboxyliques avec une structure en branche comme l'EDTA ou le DTPA (acide diéthylènetriaminepentaacétique), l'autre les chélatants de

structure macrocyclique comme le DOTA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-tétraaétique) ou le NOTA (acide 1,4,7-triazacyclononane-triacétique), (Figure 19)

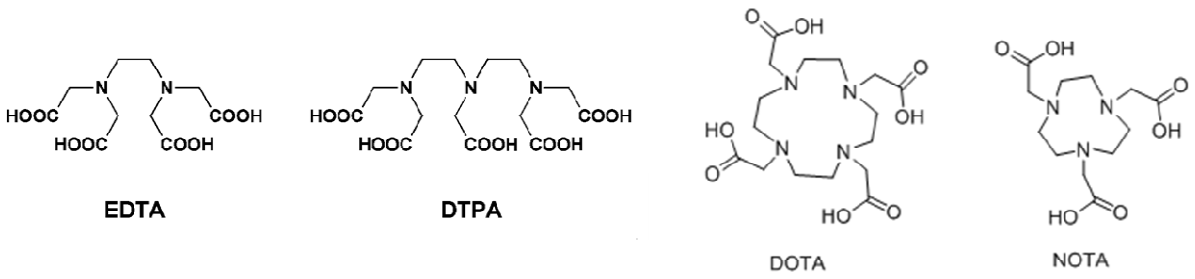


Figure 20 : Les agents chélatants les plus utilisés

Le DTPA forme des complexes stables et a une cinétique de marquage rapide ; il reste l'un des chélateurs bifonctionnels les plus utilisés dans le radiomarquage des peptides à l'indium-111 pour la TEMP. Cependant la stabilité du complexe DTPA gallium-68 est faible *in vivo* et peut conduire à des problèmes de transmétallation/transchélation (Koop *et al.*, 2007).

Le DOTA a une cinétique de marquage plus lente et est plus dépendant des conditions de radiomarquage, comme la concentration en conjugué peptide-DOTA, le pH, la température qui est nécessairement comprise entre 80 et 100°C, le temps de chauffage, le tampon réactionnel et sa concentration ; il est également plus sensible aux impuretés métalliques. Son utilisation est limitée à des molécules thermorésistantes, il est connu pour former des complexes très stables avec le ^{68}Ga et le ^{64}Cu (N. Wu *et al.*, 2016).

D'autres chélateurs sont en cours d'évaluation pour contourner cette dépendance aux conditions de radiomarquage.

Grâce à la taille de sa cavité macrocyclique plus petite que le DOTA, le NOTA permet un emprisonnement du gallium plus stable au cours du temps. Il permet des marquages au ^{68}Ga à température ambiante en 10 min à pH 3-5,5 (Velikyan *et al.*, 2008). Le complexe obtenu a une excellente stabilité dans le plasma à température ambiante et il est moins sensible aux conditions expérimentales que les dérivés DOTA (Tornesello *et al.*, 2017).

Un chélatant acyclique bifonctionnel dérivé de l'EDTA, l'HBED-CC (acide N,N'-bis[2-hydroxy-5-(carboxyéthyl)benzyl]éthylènediamine-N,N'-diacétique), utilisé depuis années 90 est un autre chélateur prometteur pour le ^{68}Ga. Il permet notamment le marquage d'anticorps, trop sensible à la chaleur pour l'utilisation du DOTA (Zoller *et al.*, 1992). Il est caractérisé par une réaction de complexation rapide avec un très bon rendement (Eder *et al.*, 2008). Il a récemment été comparé au NOTA (Eder *et al.*, 2010). Dans cette étude, le marquage au ^{68}Ga- a été réalisé à température ambiante avec un pH de 4,2. L'HBED complexe le Ga en 4 min avec un rendement de 98,7 % alors

que, pour le même temps, seulement 50 % du NOTA est marqué. Sa stabilité dans le sérum humain est comparable à celle du NOTA. Il parait donc être une alternative de choix aux chélatants macrocycliques pour le marquage de molécules thermolabiles.

D'autre part, les chélatants ne sont pas inertes. Ils modifient les caractéristiques chimiques du vecteur et donc ses paramètres pharmacodynamiques *in vivo*. Leur taille et leur charge peuvent modifier l'affinité d'un ligand pour son récepteur ; leur lipophilie peut entrainer l'élimination hépatobiliaire d'un radiopharmaceutique.

Un chélate doit aussi être hydrophile pour favoriser la clairance sanguine et l'excrétion rénale ainsi qu'être résistant à la radiolyse causée par de fortes doses de radiation. Il a été montré que la haute hydrophilie des bras acétates du DOTA favorise la clairance sanguine du peptide-DOTA non marqué par rapport au radiopharmaceutique et diminue ainsi la concurrence entre ces deux espèces chimiques au niveau du récepteur (Onthank *et al.*, 2004)

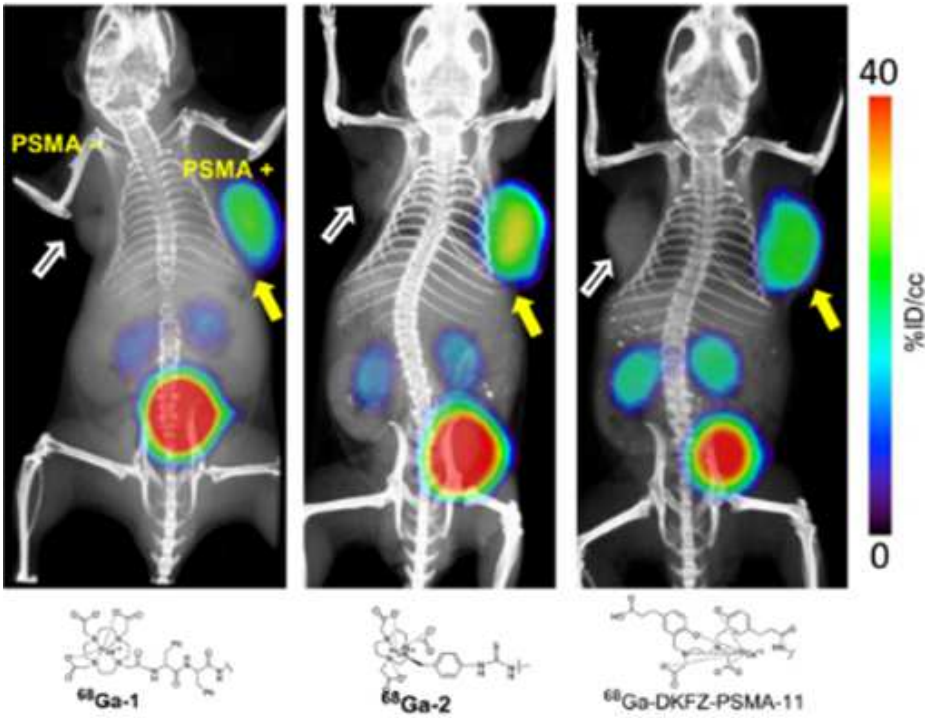


Figure 21 : Influence du chélate sur la biodistribution d'un même peptide.
Images TEP/TDM 1h après injection de ^{68}Ga-DOTA-PSMA (^{68}Ga-1); ^{68}Ga-NOTA-PSMA (^{68}Ga-2); ^{68}Ga-DKFZ-PSMA utilisant un chélate HBED-CC (Ray Banerjee et al.*, 2016)*

VI.4. Purification et contrôle de qualité

Après l'étape de radiomarquage, le milieu réactionnel est transféré sur une colonne de chromatographie d'extraction (colonne type Sep-Pak® C18) pour être purifié ; un rinçage permet l'élimination des formes ioniques de gallium-68, germanium-68 et les impuretés métalliques qui

n'ont pas réagi (Velikyan, 2013). Les peptides marqués, fixés sur la colonne, sont ensuite élués par de l'éthanol. Afin de diminuer au maximum la présence d'éthanol dans le produit final pour injection à l'animal, la solution est chauffée de nouveau et évaporée sous un flux d'argon avant d'être diluée dans un petit volume de NaCl 9 g/L permettant une activité volumique la plus élevée possible dans le plus petit volume possible, injectable en intraveineux (iv) à l'animal, soit 100 à 200µL pour une souris.

La mesure de la pureté radiochimique est réalisée par une chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à un détecteur de radioactivité.

VI.5. Mesure de l'efficacité du radiomarquage

Deux mesures importantes permettent de déterminer l'efficacité d'un radiomarquage :

- le rendement de marquage qui est égal au rapport de l'activité du produit marqué à l'activité totale mise en jeu.
- l'activité spécifique (AS) qui mesure la radioactivité d'une substance par unité de masse de l'ensemble de la substance radiomarquée ou non. Elle est exprimée en becquerels par mole (Bq/mol). L'activité spécifique décroit avec la période radioactive du radionucléide.

La détection d'une cible exprimée sur une tumeur dépend fortement de la densité de cette cible. Dans le cas des récepteurs peptidiques, bien que ceux-ci soient surexprimés par rapport aux tissus normaux, la densité n'est pas très élevée, de l'ordre de 10^4, par rapport à la densité des antigènes sur les cellules de l'ordre de 10^5 à 10^6 (Goldenberg *et al.*, 1989, Sung *et al.*, 1992). Par exemple, $6x10^4$ récepteurs de la somatostatine (type SSTR2) sont respectivement exprimés sur chaque cellule AR42J (lignée d'adénocarcinome pancréatique de rat) (Dude *et al.*, 2017).

L'activité en MBq d'un produit radioactif final n'est donc pas le seul paramètre à prendre en considération pour prédire son efficacité pour la détection d'une cible, l'activité spécifique du produit est également capitale. En effet, le radiomarquage ne permet pas à la fin de séparer le bioconjugué marqué du bioconjugué non marqué, on peut s'attendre à ce que le ligand froid entre en compétition avec le ligand radioactif pour sa liaison au récepteur, pouvant conduire à la saturation des récepteurs cibles *in vivo*..

L'activité spécifique du radiopharmaceutique doit donc être suffisamment élevée pour que le marquage tumoral soit suffisant pour l'imagerie et/ou la radiothérapie interne ciblée.

VII. Ciblage moléculaire et ligands d'intérêt

VII.1. Cibles potentielles pour l'imagerie fonctionnelle du cancer

Au cours des dernières années, de nombreux récepteurs membranaires ont été associés à l'imagerie fonctionnelle du cancer, on peut les classer en différentes catégories selon le type de récepteur membranaire :

- les récepteurs hormonaux tels que le récepteur des estrogènes (ER) ou celui de la progestérone (PR) par exemple dans le cancer du sein (Simone U. Dalm *et al.*, 2017b),
- les récepteurs membranaires de facteurs de croissance à activité tyrosine-kinase comme le récepteur du facteur de croissance épithélial (EGF) ou la surexpression de l'oncogène « human epidermal growth factor receptor 2 » (HER2) dans de nombreuses tumeurs épithéliales (Weiner *et al.*, 2002),
- les récepteurs d'adhésion cellulaire tels que les intégrines impliquées dans l'angiogénèse,
- ainsi que de nombreux récepteurs couplés aux protéines G : les récepteurs de la somatostatine (SST), de la cholécystokinine-2 (CCK-2), du peptide de la libération de la gastrine (GRP), de la neurotensine (NT), du peptide intestinal vasoactif (VIP), du neuropeptide Y (NPY), du peptide similaire au glucagon (GLP), de l'hormone stimulant l'alpha-mélanocyte (alpha-MSH) et de la neurokinine 1 (NK1) (Xiaolian Sun *et al.*, 2017). (Tableau 2)

Tableau 2 : Ligands de RCPG et leurs indications proposées en imagerie

Peptide	Récepteur	Indications
Bombesin/gastrin-releasing peptide	gastrin-releasing peptide receptor (GRPR/BB2)	prostate cancer de la prostate, cancer du sein, gliome
Cholecystokinin (CCK) and gastrin	gastrin/CCK-B receptor	cancer médullaire de la thyroide, cancers du pancréas et du poumon
Vasoactive intestinal peptide (VIP)	VIPAC1 and VIPAC2 receptor subtypes	Cancers du sein, de l'ovaire, de la prostate, du colon, de la vessie et méningiomes
Neurotensin (NT)	NTR1, NTR2, NTR3	progression tumorale (lung cancer du poumon, du sein, de la prostate)
Somatostatin	SSTR1, SSTR2, SSTR3,SSTR4, SSTR5	tumeurs neuroendocrines
α-Melanocyte-stimulating hormone (α-MSH)	melanocortin 1 receptor (MC1R)	mélanome
Subtance P	neurokinin 1 receptor (NK1R)	glioblastome
Neuropeptide NPY	NPY receptor (Y1, Y2, Y4, Y5)	cancer du sein
Exendin-4	glucagon-like peptide 1 (GLP-1)	insulinome

a. Affinité et stabilité des ligands peptidiques

La plupart des peptides naturels ont une forte affinité pour leurs récepteurs, mais du fait de leur dégradation rapide ne sont pas utilisables pour le ciblage en vue de l'imagerie. La stabilité du peptide a un impact majeur sur le ciblage tumoral, comme l'illustre le développement d'analogues de la somatostatine marqués résistants à la dégradation qui ont une demi-vie dans le plasma très supérieure à celle de la somatostatine. Cependant, les modifications de ces petites molécules pour permettre leur marquage et améliorer leur stabilité peuvent perturber fortement leur liaison au récepteur si des acides aminés essentiels à la liaison ont été modifiés ou si le couplage du chélatant

induit un phénomène d'encombrement stérique. Dans le cas des peptides, la difficulté réside donc dans l'obtention de molécules présentant une certaine stabilité *in vivo,* tout en conservant une affinité suffisante pour les cellules cancéreuses. La concentration inhibitrice à 50% (IC50) est le paramètre de quantification expérimentale de l'affinité d'un ligand. Dans les études d'affinité (liaison spécifique ou binding) par méthode de déplacement d'un ligand marqué par un ligand froid, l'IC50 du ligand froid correspond à sa concentration nécessaire pour déplacer 50 % du ligand marqué, plus elle est faible meilleure est l'affinité du ligand. Le Kd est la constante de dissociation à l'équilibre, elle représente la concentration de ligand qui occupe à l'équilibre 50 % des sites récepteurs, elle permet de calculer le Bmax c'est à dire le nombre total de sites de liaison.

b. Expression des récepteurs des ligands peptidiques

Comme les récepteurs des peptides sont souvent exprimés par des tissus normaux, les ligands peptidiques peuvent entrainer des effets physiologiques. A doses pharmacologiques, c'est-à-dire à des concentrations nanomolaires, ces peptides radiopharmaceutiques (marqués ou « froids ») peuvent donc entraîner des effets secondaires in vivo,
En revanche, aux faibles doses de peptide radiomarqué utilisées pour l'imagerie, à des concentrations picomolaires, ces effets sont en général négligeables (Fani *et al.*, 2012, Mankoff *et al.*, 2008) d'où l'importance d'une bonne activité spécifique en fin de marquage permettant d'injecter le moins possible de ligand. Le succès de l'utilisation d'un peptide pour le ciblage en imagerie nucléaire ne dépend pas seulement du taux d'expression des récepteurs cibles sur les tumeurs, mais aussi de leur faible expression dans les tissus sains (J. C. Reubi, 2003).
Le choix du récepteur cible est guidé par son expression par les cancers chez un pourcentage élevé de patients, et par son exposition sur la membrane cellulaire pour qu'il soit accessible au ligand injecté par voie systémique. Il faut s'assurer de l'expression du récepteur fonctionnel sur les cellules tumorales. En effet, le niveau d'expression des ARNm d'un récepteur ne reflète pas toujours son expression fonctionnelle sur la membrane cellulaire. De plus, l'expression par les lignées cellulaires peut être très différente de celle observée dans les tumeurs, la sélection d'un récepteur cible doit donc se faire avec des modèles appropriés : en préclinique avec des modèles animaux ou en clinique sur des échantillons histologiques de préférence en autoradiographie lorsque cela est possible (Boonstra *et al.*, 2016).

c. Ligands agonistes ou antagonistes ?

La plupart des peptides mentionnés dans le tableau 2 peuvent provoquer des effets physiologiques lors de leur liaison au récepteur et sont appelés "agonistes". Inversement, les peptides qui se lient aux récepteurs sans effets physiologiques sont appelés «antagonistes». On pensait à l'origine que les

agonistes seraient internalisés et retenus sur la cellule, donc plus appropriés que les antagonistes à l'imagerie et à la radiothérapie ciblée. Cependant, de plus en plus d'études ont montré les avantages de l'antagoniste pour l'imagerie *in vivo* et pour la radiothérapie ciblée.

Ginj et al. (Ginj *et al.*, 2006) ont développé un antagoniste de SSTR2 radiomarqué à l'indium-111 et ont comparé ses propriétés de ciblage tumoral in vivo avec un agoniste SSTR2 radiomarqué lui aussi à l'indium-111. Bien que l'antagoniste ait une affinité pour le récepteur plus faible que l'agoniste, la rétention tumorale *in vivo* de l'antagoniste mesurée en biodistribution était presque deux fois celle de l'agoniste. En effet, un antagoniste utilise davantage de sites de liaisons à la surface des cellules cibles sa fixation est indépendante de l'état d'activation du récepteur (phosphorylation des protéines G) alors que les agonistes ne ciblent que les récepteurs activés (Ginj *et al.*, 2006).

d. Accumulation rénale des ligands peptidiques

Une forte activité rénale est observée lors de l'administration de peptides radiomarqués, particulièrement avec des radionucléides métalliques. A forte activité injectée, celle-ci est à l'origine d'une néphrotoxicité, qui est le facteur limitant de la radiothérapie ciblée à l'aide de peptides (de Jong *et al.*, 2005). Pour l'imagerie, cette accumulation peut nuire au contraste des images pour la détection des organes ou structures à proximité des reins ou de la vessie (Gotthardt *et al.*, 2006, Schottelius *et al.*, 2009, Wild *et al.*, 2006).

Il est généralement admis que l'accumulation rénale de la radioactivité liée au peptide est due à la réabsorption au niveau du tubule proximal, après filtration glomérulaire, suivie de la dégradation des peptides radiomarqués dans les lysosomes de la cellule tubulaire rénale (Akizawa *et al.*, 2001, Akizawa *et al.*, 1998, Duncan *et al.*, 1997, Duncan *et al.*, 1993). La réabsorption des analogues marqués de la somatostatine se produit par deux mécanismes : l'endocytose médiée par le complexe mégaline/cubiline responsable de 70-80 % de la réabsorption (Christensen *et al.*, 1998, de Jong *et al.*, 2005, Melis *et al.*, 2005, Mogensen *et al.*, 1977) et l'endocytose fluide (Barone *et al.*, 2005).

Différentes stratégies ont été développées pour diminuer la toxicité rénale. La mégaline est un récepteur multiligand, chargé négativement, qui sert à la réabsorption tubulaire de protéines et de peptides particulièrement polybasiques (Moestrup *et al.*, 1995). La co-injection d'acides aminés basiques (Lys, Arg) réduit l'accumulation rénale d'analogues marqués de la somatostatine (Hammond *et al.*, 1993) en saturant les sites de liaisons de la mégaline (Gotthardt *et al.*, 2007). Cependant, cette méthode ne supprime pas complètement la toxicité rénale des peptides marqués, particulièrement à long terme (Bodei *et al.*, 2008). L'administration de gélofusine ainsi que de fragments d'albumine est également efficace pour diminuer l'accumulation rénale de l'^{111}In-DTPA-octréotide (Vegt *et al.*, 2006).

Une autre démarche a consisté à tenter d'identifier les caractères structuraux influant sur l'accumulation rénale. Une charge positive augmente en général la fixation rénale (Akizawa *et al.*, 2001, Antunes *et al.*, 2007, Froidevaux *et al.*, 2005) mais, après introduction d'une charge négative, elle peut être diminuée (Akizawa *et al.*, 2001, Akizawa *et al.*, 2007, Behe *et al.*, 2003, Schottelius *et al.*, 2005) ou inchangée (Froidevaux *et al.*, 2005) ou augmentée (Schottelius *et al.*, 2005), selon la distribution des charges. L'hydrophilie peut également modifier l'accumulation rénale (Nock *et al.*, 2006, Schottelius *et al.*, 2002).

VII.2. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

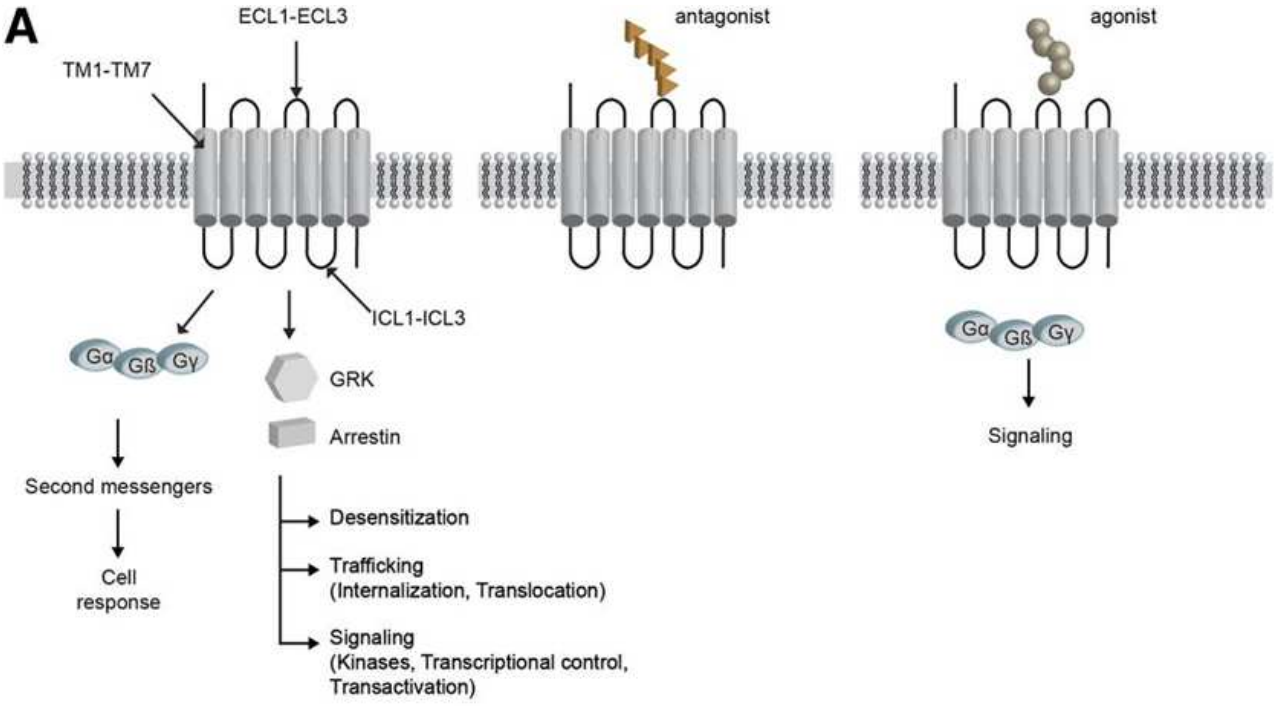


Figure 22 : Structure d'un RCPG et cascade cellulaire, d'après (Morgat et al.*, 2014)*

Les RCPG sont des protéines membranaires ayant une structure à sept domaines transmembranaires (TM). Les 7 TM sont des hélices α reliées par trois boucles intracellulaires (ICL1 à ICL3) et trois boucles extracellulaires (ECL1 à ECL3) (Figure 22). L'activation d'un récepteur couplé aux protéines-G, par son ligand, entraîne un remaniement de la structure du récepteur, qui devient capable d'activer des protéines-G intracellulaires (sous-unités Gα, Gβ et Gγ). Ces protéines-G activent à leur tour toute une série d'effecteurs intracellulaires (enzymes, canaux ioniques, transporteurs...), membranaires ou bien cytosoliques. Ces effecteurs permettent, la plupart du temps, la modulation de la concentration intracellulaire de messagers secondaires (second messagers) tels que l'AMPc, l'IP3, le calcium, les diacyl-glycérols (DAG). La famille des RCPG comprend plus

d'un millier de membres dont les séquences codantes représentent plus de 1 % du génome. Malgré leur similitude de structure, ils peuvent être classés en différentes familles en fonction de leur séquence primaire (Bockaert *et al.*, 1999). Il existe, à ce jour, cinq familles dont la première est divisée en trois sous-groupes (Figure 23).

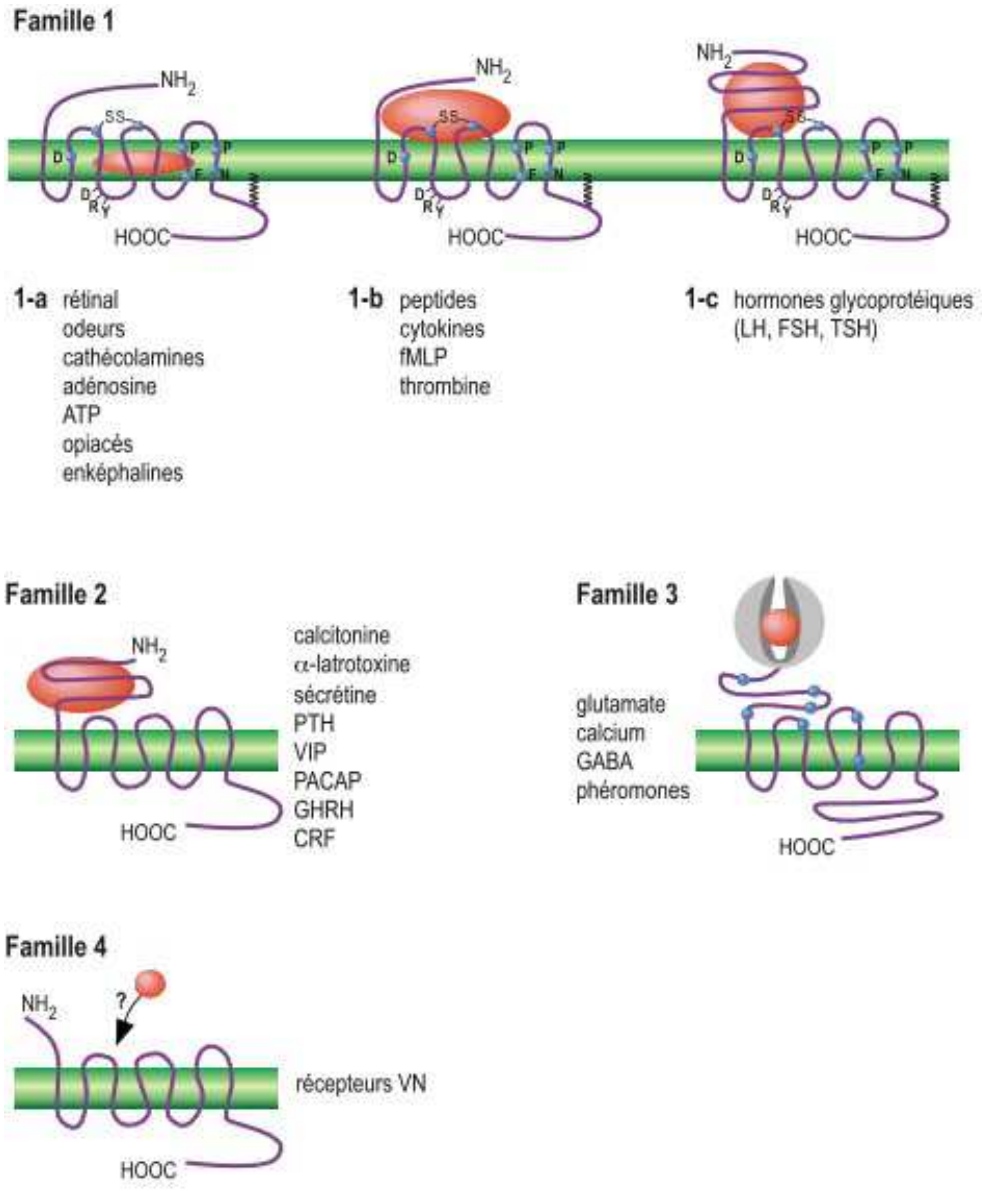


Figure 23 : Classification des récepteurs couplés aux protéines G. D'après (Bockaert et al.*, 1999)*

La famille 1-b regroupe principalement les récepteurs de neuropeptides tels que la somatostatine, la bombésine et la neurotensine, objets de notre étude. Le site de liaison de ces ligands comprend l'extrémité amino-terminale du récepteur mais aussi des portions des boucles extracellulaires E1 et E2 (Trumpp-Kallmeyer *et al.*, 1995).

VII.3. Exemple de la somatostatine (SST) et du ciblage de ses récepteurs

La somatostatine est un neuropeptide sécrété naturellement par le système neuroendocrinien. Elle

possède un rôle inhibiteur dans la régulation de plusieurs systèmes de l'organisme (hormone de croissance, insuline, glucagon, gastrine, sécrétion exocrine pancréatique) et une activité antitumorale (Guillermet-Guibert *et al.*). Ses récepteurs, mis en évidence dans la plupart des tumeurs neuroendocrines (TNE), sont composés de 5 sous-types (SSTR 1 à 5) (J. C. Reubi *et al.*, 2001).

Ces dernières années, l'imagerie TEP avec des analogues de la somatostatine radiomarqués au gallium-68 a démontré sa supériorité par rapport à la scintigraphie à l'^{111}In-pentétréotide (Octréoscan®) en TEMP/TDM. Elle offre d'excellentes performances en termes de sensibilité (~ 95 %), spécificité (~ 92 %), exactitude (~ 96 %), d'acceptabilité et de confort pour le patient (acquisition unique de courte durée) et de coût (Buchmann *et al.*, 2007, Schreiter *et al.*, 2012, Wild *et al.*, 2005).

Elle a montré d'excellents résultats pour la recherche et la localisation des TNE bien différenciées gastro-entéro-pancréatiques mais aussi dans les phéochromocytomes et les paragangliomes (Mojtahedi *et al.*, 2014). L'imagerie des SSTR permet de sélectionner les patients éligibles à une thérapie par radionucléides des TNE surexprimant ces récepteurs peptidiques, que l'on nomme approche théranostique. Un peptide agoniste des récepteurs de la somatostatine radiomarqué au ^{177}Lu, le ^{177}Lu oxodotreotide (DOTATATE ou Lutathera®) (Cives *et al.*, 2017) a démontré une amélioration statistiquement et cliniquement significative de la survie sans progression et du taux de réponse objective dans le traitement de patients atteints de tumeurs neuroendocrines et a ainsi obtenu en juillet 2017 une AMM dans cette indication.

VIII. Bombésine (GRP) et récepteurs du GRP

VIII.1. La bombésine ou « gastrin-releasing peptide »

La bombésine (BN) est un peptide neuroendocrine de 14 acides aminés isolé en 1971 chez les amphibiens de la peau de la grenouille Bombina Bombina (Anastasi *et al.*, 1971). L'équivalent de la bombésine chez les mammifères a été isolé de l'estomac de porc. Il a été nommé peptide libérant de la gastrine ou « gastrin-releasing peptide" (GRP) puisqu'il permet une libération abondante de la gastrine dans ce tissu (McDonald *et al.*, 1979). Un second peptide analogue de la bombésine, la neuromédine B (NMB), a été identifié en 1983 au niveau de la moelle épinière porcine (Minamino *et al.*, 1983).

Le GRP humain est un peptide de 27 acides aminés, sa partie carboxy-terminale de 10 acides aminés (GRP 18-27) est nommée neuromédine C et présente une analogie presque complète avec la bombésine (Figure 24).

Le GRP est présent dans la paroi du tube digestif des mammifères, en particulier au niveau du côlon et de l'estomac et dans le système nerveux central. La NMB est retrouvée dans tout le tube digestif,

mais en quantité généralement inférieure au GRP. Diverses études ont montré que le GRP exerce des effets variés chez l'homme et chez l'animal : il peut réguler la satiété, la thermorégulation, les sécrétions endocrines digestives (gastrine, cholécystokinine, entéroglucagon), la sécrétion exocrine pancréatique, et la motricité digestive (R. T. Jensen *et al.*, 2008, Robert T. Jensen *et al.*, 2013).

GRP 1-27 :	Val-Pro-Val-Ser-Val-Gly-Gly-Gly-Thr-Val-Leu-Ala-Lys-Met-Tyr-Pro-Arg-**Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met**-$CONH_2$
GRP 18-27 :	**Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met**-$CONH_2$
Bombésine :	pGlu-Gln-Arg-Leu-**Gly-Asn**-Gln-**Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met**-$CONH_2$
Neuromédine B :	**Gly-Asn**-Leu-**Trp-Ala**-Thr-**Gly-His**-Phe-**Met**-$CONH_2$

Figure 24 : Séquences primaires du GRP 1-27 humain, du GRP 18-27 (Neuromedine C) de la bombésine et de la neuromédine B.

VIII.2. Les récepteurs du « gastrin-releasing peptide »

Les récepteurs de la famille de la bombésine se divisent en quatre sous-types : BB1, BB2, BB3 et BB4 (Nagalla *et al.*, 1995). Chez l'homme 3 sous-types ont été découverts jusqu'à ce jour :

- le récepteur de la neuromédine B (NMBR) ou BB1 humain se retrouve dans la muqueuse musculaire de l'oesophage
- le récepteur du « gastrin-releasing peptide » (GRPR) ou BB2 humain. C'est un récepteur de 384 acides aminés liant sélectivement le peptide de libération de la gastrine (GRP). Le GRP et la bombésine ont les mêmes sept derniers acides aminés N terminaux; cette séquence est responsable de la liaison de haute affinité du GRP sur ce récepteur GRPR. L'expression du GRPR dans l'organisme sain est élevée au niveau du pancréas, moyenne dans le tube digestif, de l'oesophage au rectum, et relativement faible dans le système nerveux central et les glandes surrénales.
- le récepteur de type 3 humain de la bombésine (BB3) qui est présent dans les cellules pulmonaires et dans les testicules

Ils appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés aux protéines G hétérotrimériques, essentiellement du type Gαq/11 (Gonzalez *et al.*, 2008).

VIII.3. Interactions entre le GRP et son récepteur BB2 humain

Le récepteur BB2/GRPR a été 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).

Les GRPR sont exprimés de façon normale par les cellules exocrines du pancréas (Hajri *et al.*, 1996), dans le sein à haute densité mais avec une distribution hétérogène dans les lobules ou les

canaux suggérant un rôle du GRP dans la physiologie du sein (Gugger *et al.*, 1999) par les cellules neuroendocrines du tractus gastro-intestinal, du poumon et de la prostate (Sunday, 1988) mais n'est normalement pas exprimé par les cellules épithéliales présentes dans le côlon (Ferris *et al.*, 1997), le poumon (Stahlman *et al.*, 1985) et la prostate (Bartholdi *et al.*, 1998).

Dans les tissus normaux et les cellules tumorales, la densité de GRPR peut varier de 6000 fois. Lorsqu'elle est exprimée de manière aberrante en tant que protéine fonctionnelle dans les cellules cancéreuses, l'activation du GRPR régule la morphologie, la différenciation et la prolifération des cellules tumorales.

VIII.4. Bombésine et cancer

a. Implications du GRPR

Le GRP et la neuromédine B (NMB) sont retrouvés dans un grand nombre de tumeurs voire sont secrétés par la tumeur elle-même et donc fonctionnent, dans de nombreux cas, comme des facteurs de croissance autocrine, interagissant avec leurs propres récepteurs sur la tumeur (R. T. Jensen *et al.*, 2008). Par exemple, les carcinomes dits « à petites cellules » (Small Cell Lung Carcinoma, SCLC) expriment à la fois du GRP et son récepteur le GRPR activant une boucle autocrine qui augmente la prolifération et la survie des cellules tumorales (Figure 25). La positivité pour cette paire ligand / récepteur est considérée comme un marqueur de l'agressivité tumorale de ces cancers (Laukkanen *et al.*, 2015).

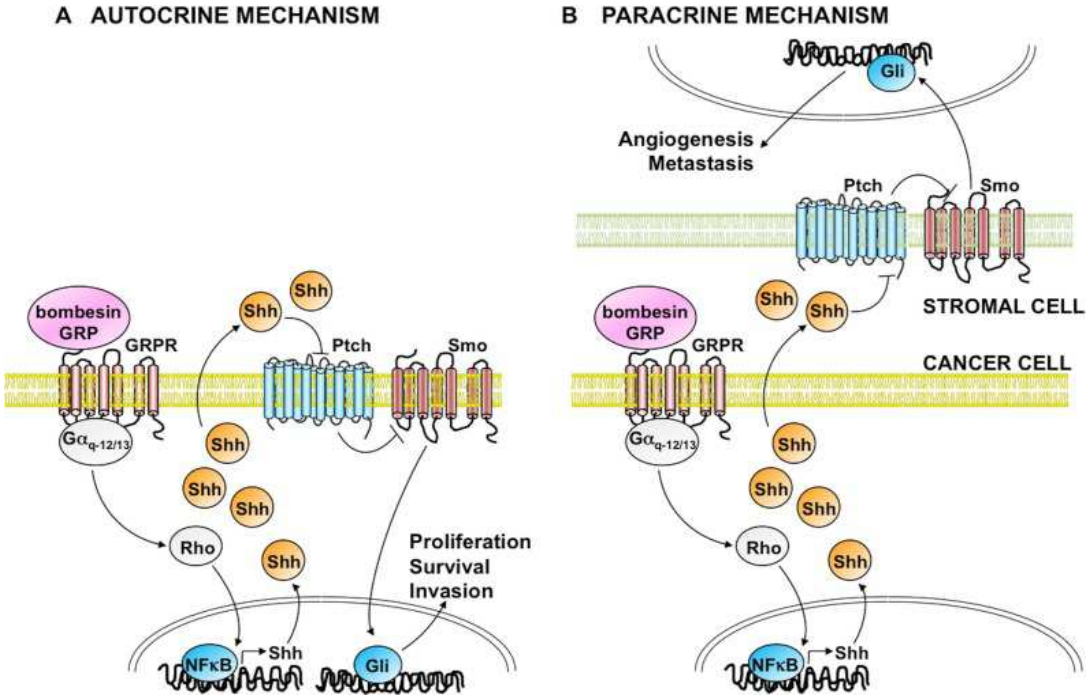


Figure 25 : Mécanisme de régulation autocrine et paracrine du GRP impliquant la voie de transduction du signal hedgehog (Shh) dans les SCLC (Laukkanen et al., 2015).

Les récepteurs de la famille de la bombésine sont surexprimés dans une grande variété de cancers (J. C. Reubi *et al.*, 2002b). Le GRPR est particulièrement surexprimé dans les cancers de la prostate ; une étude d'autoradiographie réalisée par Markwalder et Reubi en 1999 a révélé que le GRPR était détecté dans tous les types de cancer de la prostate, même à un stade précoce de la carcinogénèse, alors qu'il n'était pas détecté dans le tissu sain adjacent (Markwalder *et al.*, 1999).

Entre autres, dans le cas du cancer de la prostate, l'expression du GRPR a été associée à la transformation néoplasique (Albrecht *et al.*, 2004), la migration cellulaire (Aprikian *et al.*, 1997) la prolifération (Bologna *et al.*, 1989) ainsi qu'à la capacité d'invasion de ces cellules (Festuccia *et al.*, 2002).

Le GRPR est aussi surexprimé dans les cancers du sein, du côlon, cancers du poumon incluant les carcinomes dits « non-à petites cellules » (non-small cell lung carcinomas, NSCLC) et les carcinomes dits « à petites cellules » (small cell lung carcinoma SCLC), dans les tumeurs cérébrales (gliomes, méningiomes), dans les tumeurs de la tête et du cou, dans les cancers du pancréas et dans les neuroblastomes (R. T. Jensen *et al.*, 2008, Moody *et al.*, 2003, Moody *et al.*, 2015, J. C. Reubi *et al.*, 2002b).

b. GRPR et cancer du sein

La présence des récepteurs du GRP a d'abord été mise en évidence par des techniques de liaison utilisant la 125I- [Tyr4] bombésine dans les lignées cellulaires du carcinome du sein et sur des homogénats tissulaires (Giacchetti *et al.*, 1990, Halmos *et al.*, 1995) démontrant une incidence de 33% des carcinomes mammaires positifs pour les récepteurs GRP. Puis, quelques années plus tard, ces récepteurs ont été mis en évidence par des expériences d'autoradiographies utilisant ce même ligand sur coupes de tissus de différents carcinomes mammaires et présentaient une incidence significativement plus élevée de cas positifs pour les récepteurs GRP.

Le GRPR était surexprimé dans 65% des cas de carcinome canalaire non-invasif et 63 à 68% des cas de carcinome canalaire invasif. De plus, le GRPR était également surexprimé dans 100% des métastases issues des carcinomes mammaires qui surexprimaient le GRPR (Gugger *et al.*, 1999) (C. Reubi *et al.*, 2002a). Comme bien souvent, dans les études de liaison, c'est la ^{125}I- [Tyr4] bombésine qui a été est utilisée et ce ligand possède une grande affinité pour NMBR et GRPR, ce qui rend plus difficile la distinction des sous-types mais les auteurs ont confirmés par des études de compétition qu'il s'agissait bien de l'expression spécifique du GRPR.

Par la suite, Dalm et al. ont montré, sur 684 échantillons de tumeurs mammaires congelées, qu'un corrélation significative était retrouvée entre les niveaux d'expression de l'ARNm du GRPR et les tumeurs de petite taille tumorale (P = 0,0014), avec un statut ER+ (P <0,001) et PR+ (P <0,001), et

un statut HER2 négatif (P <0,001). Ils ont également montré que la surexpression de l'ARNm du GRPR était prédictive de l'efficacité du tamoxifène chez des patientes traitées en première intention pour une maladie métastatique ou une récidive tumorale (S. U. Dalm *et al.*, 2015).

Les mêmes auteurs ont confirmé en 2015 l'expression du GRPR par autoradiographie à l'aide d'un agoniste du GRPR marqué à l'indium-111 sur des échantillons cliniques de tous types de cancers du sein. Ils ont constaté que 96% des tumeurs (48/50) exprimaient le GRPR, ce qui était supérieur aux 65% rapportés par Reubi et al. (C. Reubi *et al.*, 2002a), de plus ils ont trouvé une très forte corrélation entre le statut ER+ et l'expression du GRPR.

Dans une étude plus récente réalisée par Morgat et al. (Morgat *et al.*, 2017), l'analyse de tissue-micro-array de 1432 tumeurs du sein a révélée qu'environ 90% des tumeurs sont positives pour le GRPR avec 76% qui présentaient une surexpression, très souvent associée à la positivité des récepteurs aux œstrogènes (83% des tumeurs ER+ étaient GRPR+). Lorsque les sous-types moléculaires du cancer du sein étaient considérés, le GRPR était surexprimé dans 86% des tumeurs de type luminal A, 71% des luminales B HER2 négatives, 83% de luminal B HER2+, 21% des tumeurs HER2 ++ et 8% des tumeurs triple-négatives.

À la lumière de ces études, le GRPR est une cible de choix pour la détection du cancer du sein et de la prostate. Pour cibler ce récepteur in vivo, des radiotraceurs peptidiques ciblant le GRPR ont été développés afin de permettre l'imagerie de ces cancers ou le suivi de thérapeutique.

VIII.5. Les radiotraceurs peptidiques analogues de la bombésine BN

Depuis plusieurs années, des radiotraceurs peptidiques ciblant le GRPR ont été développés afin de permettre l'imagerie ou le traitement des cancers surexprimant le GRPR. D'abord pour la TEMP, marqués au ^{99m}Tc ou à l'indium-111 (R. P. J. Schroeder *et al.*, 2009), certains traceurs sont parvenus jusqu'à des études clinique, majoritairement pour la détection du cancer de la prostate (Tableau 3). Ces radiotraceurs testés pour l'imagerie ont été bien tolérés par les patients mais ont souvent démontré *in vivo* une faible stabilité et un faible marquage tumoral.

Tableau 3 : Analogues de la bombésine marqués au ^{99m}Tc pour l'imagerie TEMP

Auteurs	**Analogue de la BN**	**Type de cancer**	**Année**
(R. T. Jensen *et al.*, 2008)	Native BN		2008
(Van de Wiele *et al.*, 2000)	RP527	Cancer du sein	2000
(De Vincentis *et al.*, 2004, De Vincentis *et al.*, 2002)	[Leu13]BN	Cancer de la prostate et du sein	2002, 2004
(Ananias *et al.*, 2013)	HABBN	Cancer de la prostate	2013
(Mather *et al.*, 2014)	Demobesin 4	Cancer de la prostate	2014

La TEP offrant de nombreux avantages par rapport à la TEMP, des analogues de la bombésine ont été développés pour l'imagerie TEP ainsi que pour la radiothérapie ciblée.

La possibilité de ciblage de ces récepteurs par des analogues peptidiques du GRP radiomarqués au gallium-68 a fait l'objet de nombreuses études ces dix dernières années. La première catégorie d'analogues de la bombésine qui a été explorée est celle des agonistes du GRPR, compte tenu de leur capacité connue à être internalisés dans les cellules. Comme déjà mentionné, 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 la fixation *in vivo*. La majorité de ces analogues BN contient les huit résidus d'acides aminés C-terminaux, nommés BN (7-14). L'élimination des six résidus d'acides aminés (N-terminaux) de la BN augmente la stabilité et maintient l'affinité peptidique pour le site de liaison sur le récepteur (de Aguiar Ferreira *et al.*, 2017).

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 GRPR, comme la lignée PC3. Cette lignée n'exprime pas le récepteur des androgènes et croit indépendamment de ceux-ci. (Zhang *et al.*, 2007) (Cagnolini *et al.*, 2010) (Dam *et al.*, 2016) (Tableau 4)

Tableau 4 : Analogues de la bombésine marqués au gallium-68 et utilisés en TEP

DOTA-PESIN	(Zhang *et al.*, 2007)	cancer prostate PC3	agoniste
DOTA-AMBA	(Cagnolini *et al.*, 2010)	cancer prostate PC3	agoniste
NODAGA-AR	(Abiraj *et al.*, 2011)	cancer prostate PC3	antagoniste
DOTA-RM2	(Mansi *et al.*, 2011)	PC-3 and LNCaP prostate cancer	antagoniste
NOTA-PEG-BBN(6-14)	(Fournier *et al.*, 2012)	T47D breast and PC3 prostate cancer	agoniste
NOTA-PEG2- RM26	(Varasteh *et al.*, 2013)	cancer prostate PC3	antagoniste
NOTA-MATBBN	(D. Pan *et al.*, 2014)	cancer prostate PC3	antagoniste
NODAGA-MJ9	(Gourni *et al.*, 2014)	cancer prostate PC3	antagoniste
NOTA-AMBA	(Dam *et al.*, 2016)	cancer prostate PC3	agoniste
NOTA-BB2	(Richter *et al.*, 2016)	cancers prostate PC3 et LnCaP	antagoniste
NODAGA-SCH1 and NODAGA-JMV594	(Yao Sun *et al.*, 2016)	cancer prostate PC3	antagoniste
DOTA-SB3	(Maina *et al.*, 2016)	cancer prostate PC3	antagoniste
DOTA-NeoBOMB1	(Nock *et al.*, 2017) (S. U. Dalm *et al.*, 2017a)	cancer prostate PC3	antagoniste

Le ^{68}Ga-AMBA est un puissant agoniste du GRPR marqué au gallium-68 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 cible, si ce n'est une captation pancréatique élevée due à la présence des GRPR sur cet organe, limitant l'imagerie de la région intestinale. Mais marqué au ^{177}Lu pour une utilisation en radiothérapie ciblée, il a causé des effets secondaires aigus (crampes abdominales, vomissements, diarrhées) lorsqu'il a été administré à des doses plus élevées, nécessaires au traitement par radionucléide. Bodei L *et al*. *EJNMMI*. 2007;34 (Suppl 2):S221

L'avènement de nombreux nouveaux antagonistes du GRPR, qui montrent des propriétés similaires sinon meilleures que les agonistes, y compris l'absence d'effets secondaires et d'activité mitogène, a mis en sommeil les recherches sur les agonistes du GRPR et, depuis 2012, l'intérêt pour l'imagerie du GRPR avec les antagonistes est grandissante (Sonni *et al.*, 2017).

Parmi ceux développés récemment, le NeoBOMB1 semble prometteur. La société Advanced Accelerator Applications (AAA) a annoncé en juin 2016 l'expansion de son portefeuille de produits théranostiques avec NeoBOMB1, un peptide portant le DOTA comme chélatant, afin de l'utiliser marqué au ^{68}Ga pour l'imagerie TEP et au ^{177}Lu pour la radiothérapie ciblée dans les cancers exprimant le GRPR.

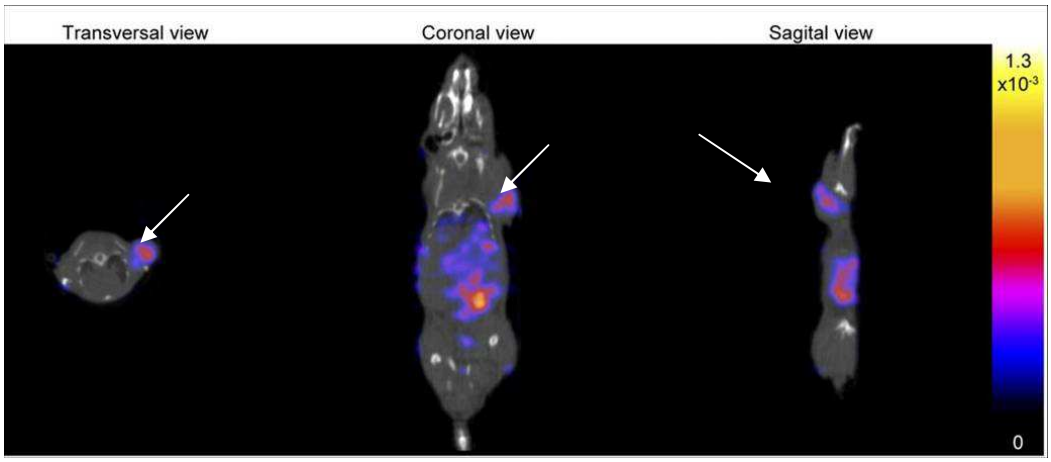


Figure 26 : Image TEP/TDM d'une souris injectée avec du ^{68}Ga-NeoBOMB1

Acquisition de l'image 60 min après injection de 11,5 MBq/230 pmol. Une flèche indique la localisation de la tumeur PC3 sur l'épaule, d'après Dalm et al. 2017 (S. U. Dalm et al., 2017a).

Peu d'études ont démontré l'accumulation d'un radiotraceur spécifique du GRPR dans des cancers du sein. La première preuve de faisabilité a été réalisée en 2000 par Van de Wiele et al., à l'aide du RP527 marqué au technétium-99m (Van de Wiele *et al.*, 2000) chez des patientes atteintes de tumeur du sein évoquant un carcinome mammaire. Une captation spécifique du traceur a été notée dans des cancers du sein primitifs (8/9) ainsi que dans les ganglions lymphatiques axillaires associés. Cette équipe a par la suite démontré que le rapport de fixation tumeur/tissu sain était significativement corrélé à l'expression du GRPR. Il est intéressant de noter qu'aucune captation

n'a été notée chez les 5 patientes atteintes de tumeurs mammaires avec des métastases osseuses résistantes au tamoxifène (Van de Wiele *et al.*, 2008)

Les données disponibles jusqu'en 2015 pour l'utilisation d'analogues de la bombésine en tant que traceurs TEP étaient principalement précliniques. Des tests de liaison réalisée à l'aide de la bombésine [Tyr4]-BBN marquée à l'iode-125 (ligand spécifique du GRPR) ont permis de vérifier l'expression du GRPR dans diverses lignées humaines de cancer du sein (Zhaofei Liu *et al.*, 2009). Les résultats de cette étude ont démontré que les lignées de cancer du sein ER+ (T47D, BT474, MCF-7) surexpriment le GRPR, alors que les lignées ER- (MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB468, BT20) l'expriment peu ou pas.

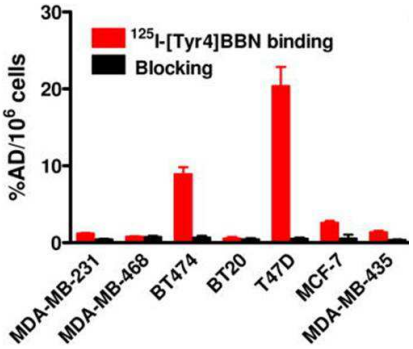


Figure 27 : Etude de liaison de la ^{125}I-[Tyr4]BBN à différentes lignées de cancer du sein, d'après (Zhaofei Liu et al., 2009)

Deux équipes, ayant utilisé des agonistes de la bombésine marqués au cuivre-64 et ont démontré une accumulation du radioisotope dans des xénogreffes de cancer du sein humain T47D mais aussi une fixation non spécifique importante dans les organes non cibles (foie, intestins) et une fixation spécifique attendue dans le pancréas (Parry *et al.*, 2007) (Prasanphanich *et al.*, 2009). De la même manière, l'équipe de Fournier et al. (Fournier *et al.*, 2012) a comparé la biodistribution et les images TEP d'un agoniste de la BBN marqué au gallium 68 ou au cuivre 64, ^{68}Ga ou ^{64}Cu/NOTA-PEG-BBN (6−14), dans des modèles de souris immunodéficientes porteuses de ces mêmes xénogreffes tumorales T47D.

IX. Neurotensine et récepteurs de la neurotensine

IX.1. La neurotensine

a. Structure, propriétés clivage et localisation

La neurotensine (NT) a été purifiée à partir d'hypothalami bovins en 1973, par Carraway et Leeman puis mise en évidence en périphérie dans des extraits intestinaux bovins (P. Kitabgi *et al.*, 1976) puis humains (Hammer *et al.*, 1980). Le terme « neurotensine » est inspiré de sa localisation

neuronale initialement décrite et de sa capacité à induire une hypotension aigue chez le rat anesthésié (NT > 200 pmol/kg, en injection intraveineuse (iv) (R. Carraway *et al.*, 1973).

La NT est un peptide composé de 13 acides aminés (R. Carraway *et al.*, 1975) classé dans la famille des neuropeptides, de séquence primaire :

$$pGlu^{1}\text{-}Leu^{2}\text{-}Tyr^{3}\text{-}Glu^{4}\text{-}Asn^{5}\text{-}Lys^{6}\text{-}Pro^{7}\text{-}\mathbf{Arg^{8}\text{-}Arg^{9}\text{-}Pro^{10}\text{-}Tyr^{11}\text{-}Ile^{12}\text{-}Leu^{13}}\text{-}COOH$$

La partie carboxy-terminale (8-13) de la NT porte l'essentiel des propriétés biologiques et pharmacologiques du peptide entier (P. Kitabgi *et al.*, 1985) et présente une structure très conservée chez la plupart des vertébrés (Rostene *et al.*, 1997). La NT est présente dans le système nerveux central (SNC) au niveau des corps cellulaires et/ou des terminaisons nerveuses des neurones et n'est jamais retrouvée dans les cellules gliales (Uhl *et al.*, 1977). La NT agit comme un neuromodulateur de la transmission dopaminergique et de la sécrétion des hormones de l'hypophyse antérieure (Geisler *et al.*, 2006).

En périphérie, la NT est présente principalement au niveau du tractus gastro-intestinal (GI), au niveau du jéjunum et de l'iléon (Helmstaedter *et al.*, 1977) mais également dans l'ensemble du système cardiovasculaire (Reinecke, 1985).

In vivo la NT a une demi-vie très courte (2-6 minutes chez les chiens, 1 minute chez le rat et 4 minutes chez l'Homme). Après sa libération, elle est rapidement clivée par de nombreuses peptidases, principalement des métalloprotéases, ce qui met rapidement fin à son action. Elle est clivée au niveau des liaisons Arg^{8}-Arg^{9} par l'EP 24.15 (thimet oligopeptidase), Pro^{10}-Tyr^{11} par l'EP 24.11 (neutral endopeptidase, NEP) et l'EP24.16 (neurolysin) et Tyr^{11}-Ile^{12} par l'EP24.11. D'autres peptidases interviennent également dans le clivage des fragments libérés (Figure 28).

Le fragment (1-10), produit par les EP 24-11 et 24-16, est dégradé en NT(1-8) par « l' angiotensin converting enzyme » (ACE), le fragment 9-13, résultant du clivage par L'EP24.15, est hydrolysé par la post-proline dipeptidyl aminopeptidase en donnant le fragment 11-13, lui-même dégradé par une aminopeptidase (P. Kitabgi, 2006c).

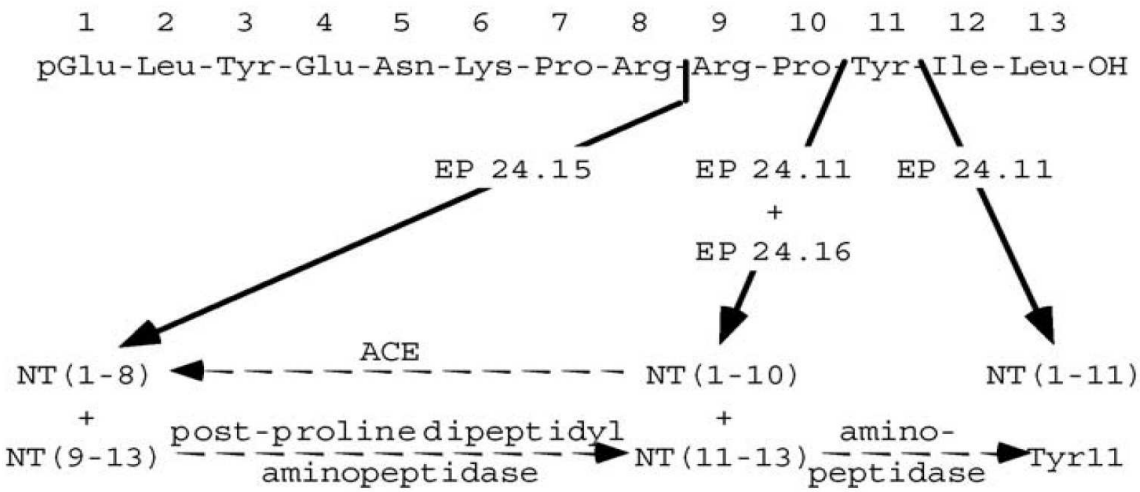


Figure 28 : Sites de clivage de la NT avec les métallopeptidases, d'après (P. Kitabgi, 2006c)

b. Effets pharmacologiques et biologiques de la neurotensine

La neurotensine agit à la fois comme un neurotransmetteur ou comme un neuromodulateur au niveau du système nerveux central (SNC) ou comme une hormone locale au niveau périphérique (J. P. Vincent *et al.*, 1999). Elle exerce de puissants effets analgésiques et hypothermiques lorsqu'elle est injectée dans le cerveau (Popp *et al.*, 2007). La neurotensine semble également être fortement impliquée dans certaines pathologies neurologiques telles la maladie de Parkinson ou encore la schizophrénie (St-Gelais *et al.*, 2006). En périphérie, où 90% de la concentration de NT est détectée, elle est principalement impliquée dans la régulation des systèmes gastro-intestinal et cardiovasculaire. Au niveau cardiovasculaire, la NT provoque une augmentation de la perméabilité vasculaire (Rostene *et al.*, 1997). Au niveau du tractus gastro-intestinal, elle est localisée au niveau des cellules endocrines (cellules N) du jéjunum et de l'iléum (Polak *et al.*, 1977). La NT est libérée en réponse à une augmentation des graisses intraluminales. La neurotensine est libérée dans la circulation sanguine peu après un repas et persiste pendant au moins 10 heures, augmentant sa concentration sanguine basale de 10 à 20 pmol / L jusqu'à plus de 230 pmol/L (Gullo *et al.*, 1998). Elle a de nombreuses fonctions physiologiques : stimulation de la sécrétion pancréatique et biliaire (Wood *et al.*, 1988), facilitation de la translocation des acides gras à partir de la lumière intestinale (Robert P. Thomas *et al.*, 2003), effets sur la motilité du tractus gastro-intestinal (Hellstrom *et al.*, 1982). De plus, l'injection intraveineuse de NT entraîne l'augmentation des taux plasmatiques de prolactine (PRL), d'hormone lutéinisante (LH), de thyréostimuline (TSH) et d'hormone de croissance (GH). Elle stimule donc la croissance de divers tissus dans le GI ainsi que la glande surrénale, les hépatocytes et les fibroblastes (Mark Evers, 2006).

La NT est présente dans le pancréas (Fernstrom *et al.*, 1981), elle régule de façon paracrine la sécrétion d'hormones par les cellules β des îlots de Langherans entrainant la libération d'insuline et de glucagon (Dolais-Kitabgi *et al.*, 1979). L'expression des trois récepteurs de la NT (récepteur 1

(NTR1) ; récepteur 2 (NTR2 ; récepteur 3 (NTR3) a été détectée par RT-PCR dans le pancréas endocrine normal (Coppola *et al.*, 2008). Mazella et al. décrivent par la suite que c'est la liaison de la NT au complexe NTR2 / NTR3 qui conduit à la stimulation de la phospholipase C qui augmente la concentration intracellulaire de calcium responsable de la sécrétion d'insuline. Elle active également la PI3 kinase, entrainant la phosphorylation d'Akt pour protéger les cellules β de l'apoptose induite par des agents cytotoxiques externes. Les auteurs décrivent aussi que malgré l'expression de NTR1 dans les cellules β, l'absence du récepteur à la membrane plasmique pourrait expliquer son absence d'interaction avec la NT (Beraud-Dufour *et al.*, 2009, Jean Mazella *et al.*, 2012) (Figure 29).

En revanche, les trois récepteurs de la NT ne sont pas exprimés dans le pancréas exocrine normal, leur expression étant liée au développement de tumeurs (P. Kitabgi, 2002, Myers *et al.*, 2009).

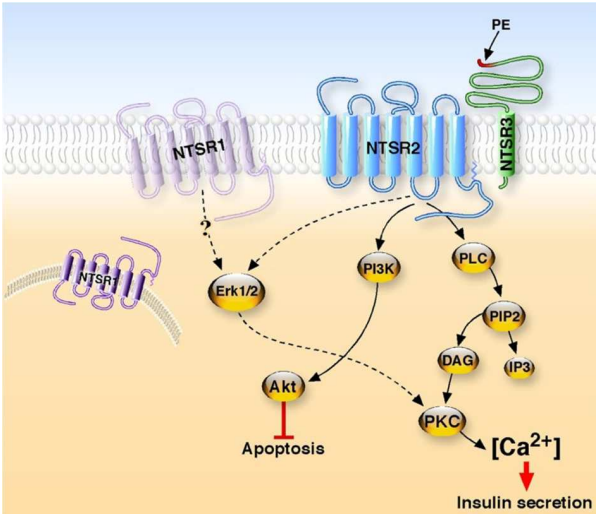


Figure 29 : Signalisation cellulaire des récepteurs de la NT dans les cellules β. D'après (Jean Mazella et al.*, 2012).*

Les arguments en faveur d'un rôle important de la NT dans la prolifération ou la progression tumorale seront développés dans le paragraphe concernant les relations entre la neurotensine et ses récepteurs et les tumeurs.

IX.2. Les récepteurs de la neurotensine

La neurotensine exerce ses effets principalement par le biais de deux récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG): le NTR1, un récepteur de haute affinité pour la NT (Kd: 0,1-0.3 nM) et le NTR2 qui possède une affinité plus faible pour ce peptide (Kd: 3-5 nM) (Chalon *et al.*, 1996, Pelaprat, 2006, J. P. Vincent *et al.*, 1999, Vita *et al.*, 1998). Le NTR3 ou Sortiline est un récepteur transmembranaire simple (Zherui Wu *et al.*, 2012) .

Le NTR1 humain a été cloné à partir d'une lignée de cellules d'adénocarcinome de côlon humain,

les cellules HT29 (Vita *et al.*, 1993). Il a été montré par Northern-blot que le mRNA du NTR1 est exprimé dans le cerveau, dans l'iléon et le jéjunum et également dans le pancréas, les reins et le système cardiovasculaire, chez le rat (Tanaka *et al.*, 1990) et chez l'homme.

Le récepteur NTR2 a été cloné à partir de cerveau de rat (Chalon *et al.*, 1996), de souris (J. Mazella *et al.*, 1996) et d'homme (Vita *et al.*, 1998), en utilisant une stratégie de recherche d'homologues du récepteur NTR1.

Le récepteur NTR2 est une protéine de 410 acides aminés, qui partage 64% d'homologie avec le NTR1 (Chalon *et al.*, 1996). Le NTR2 a une partie extracellulaire N-terminal plus courte, et sa troisième boucle intracytoplasmique est plus longue que celle du NTR1 (J. P. Vincent *et al.*, 1999).

Le NTR2 est exprimé dans le cerveau (Chalon *et al.*, 1996, Vita *et al.*, 1998), non seulement dans les neurones, mais aussi dans les cellules gliales et épendymales (Walker *et al.*, 1998). L'expression du NTR2 a été rapportée dans le cancer de la prostate (Swift *et al.*, 2010), dans les lymphocytes B de la leucémie lymphoïde chronique (CLL) (Saada *et al.*, 2012) et dans des gliomes (Ayala-Sarmiento *et al.*, 2015).

Le récepteur NTR3 est unique parmi les NTR puisque c'est un récepteur à domaine transmembranaire simple qui appartient à la famille des protéines VPS10 (vascular carboxy peptidase sorting recepteur-10) et n'est pas spécifique de la NT. Il reconnaît d'autres ligands comme des pro-neurotrophines, la protéine RAP (*receptor associated protein*), une protéine se liant aux récepteurs des lipoprotéines de faible densité (*Low density lipoprotein Receptor-related Protein ou LRP*) (Nielsen *et al.*, 1999) ou encore la protéine activatrice de sphingolipide SAP (*Sphingolipid Activator Protein*) (Lefrancois *et al.*, 2003).

IX.3. Interactions entre NT et NTR1

Les premières études, réalisées sur des membranes synaptiques de cerveau de rat (Granier *et al.*, 1982, P. Kitabgi *et al.*, 1977, P. Kitabgi *et al.*, 1980) et une lignée de tumeur colique humaine, la lignée HT29 (Granier *et al.*, 1982, P. Kitabgi *et al.*, 1980), ont montré que l'hexapeptide C-terminal (NT(8-13)) était le plus petit fragment permettant de conserver à la fois une bonne affinité et une bonne activité. Ces études ont également montré l'importance de plusieurs résidus de la NT (8-13), comme la Tyr^{11}, l'Ile^{12} ou la Leu^{13}. Cependant, ces premiers travaux ont été réalisés en l'absence d'inhibiteurs de peptidases. L'interprétation des résultats restait donc difficile, ces modifications pouvant affecter non seulement la liaison, mais aussi la stabilité du peptide.

Les résultats des études réalisées en présence d'inhibiteurs ont confirmé la meilleure affinité de la NT (8-13) (0.2 nM) pour son récepteur NTR1, 10 à 20 fois meilleure que la NT, et l'importance des résidus Tyr^{11}, Ile^{12} ou Leu^{13} (P. Kitabgi, 2006a, Myers *et al.*, 2009).

Par la suite, en combinant des données obtenues par mutagenèse, études d'inhibition et modélisation moléculaire (Barroso *et al.*, 2000, Botto *et al.*, 1997, P. Kitabgi, 2006a, Patrick Kitabgi, 2006b, Labbe-Jullie *et al.*, 1995, Pang *et al.*, 1996, J. P. Vincent *et al.*, 1999) (Labbe-Jullie *et al.*, 1998), un modèle de liaison de la NT au NTR1 a été proposé (Myers *et al.*, 2009) (Barroso *et al.*, 2000, Harterich *et al.*, 2008, Pang *et al.*, 1996). Ainsi, le site de liaison de la NT au NTR1 (Figure 30) se trouve sur le haut de la poche hydrophobe, dans la région délimitée par la troisième boucle extracellulaire (en gras) et par les sixièmes et septièmes domaines transmembranaires du récepteur (TM6 et TM7). Les acides aminés Met^{208}, Arg^{327}, et Phe^{331}du récepteur sont impliqués dans la liaison de la NT. La Tyr^{347} dans la troisième boucle extracellulaire (E3) est également essentielle à la liaison de la NT. Le modèle met l'accent sur plusieurs caractéristiques requises pour la liaison de la NT: l'acide aminé Arg^{327} crée de fortes interactions ioniques avec l'acide carboxylique C-terminal de la NT; la Tyr 347 crée de fortes interactions avec la Tyr11 de la NT; L phenylalanine Phe344 et le tryptophane Trp339 ont de faibles interactions néanmoins importantes avec la Tyr11; Phe331 et la méthionine Met M208 ont des interactions hydrophobes avec Ile12 et Leu13, respectivement; et enfin, Phe331 interagit avec l'Arg9 de la NT.

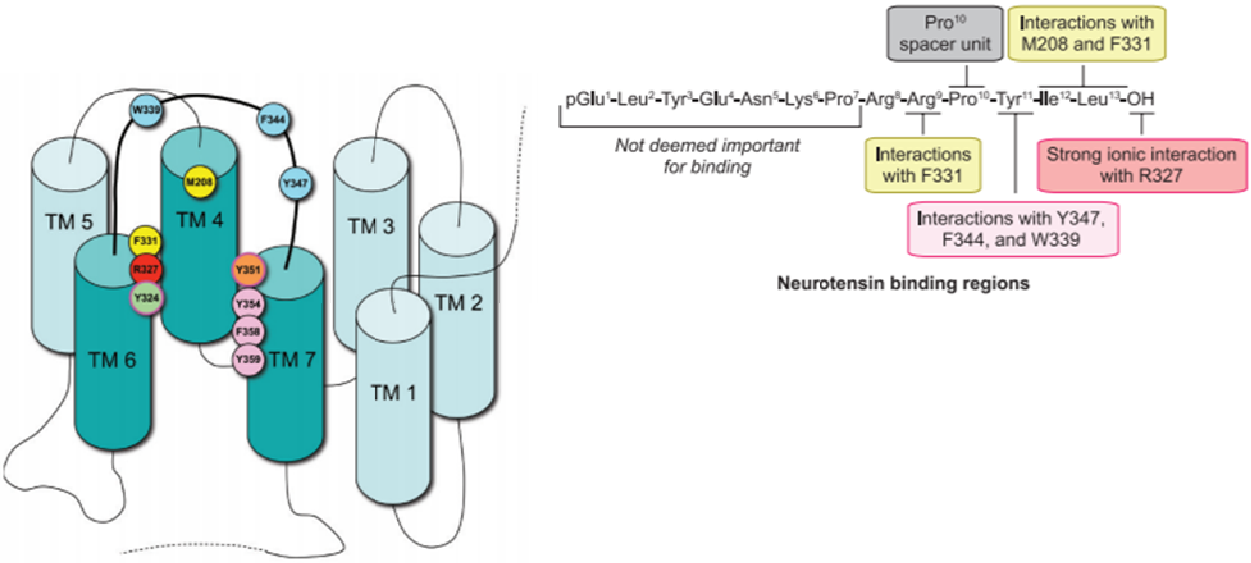


Figure 30 : Liaison de la NT 8-13 au récepteur NTR1 d'après (P. Kitabgi, 2006a, Myers et al.*, 2009)*

En 2012, la structure cristallographique du NTR1 de rat (*Rattus norvegicus)* lié à la partie C-terminal (NT 8-13) de la NT, a été publiée dans Nature par l'équipe de White et al. (White *et al.*, 2012). La séquence du NTR1 de rat (Tanaka *et al.*, 1990) est à 84% identique à celle du NTR1 de l'Homme (Vita *et al.*, 1993).

Le NTR1 de type sauvage étant instable en solution détergente, il était donc une cible difficile pour les études structurales, en particulier lorsqu'il est lié à son agoniste. Il a donc été thermostabilisé par six modifications conformationnelles pour aboutir au NTR1-GW5 puis modifié pour faciliter l'obtention de cristaux diffractants pour aboutir au NTR1-GW5-T4L (Figure 31). La caractérisation pharmacologique du NTR1-GW5 a montré que son affinité pour la NT était similaire à celle du récepteur de type sauvage NTR1 et a permis de valider ce modèle cristallographique. Il s'agissait de la 1ère structure cristallographique d'un RCPG couplé à son agoniste. Cette structure a permis de bien mieux comprendre les interactions de l'hexapeptide (NT 8-13) et du NTR1 et pourra permettre de favoriser le développement de ligands non peptidiques par des méthodes de modélisation moléculaire.

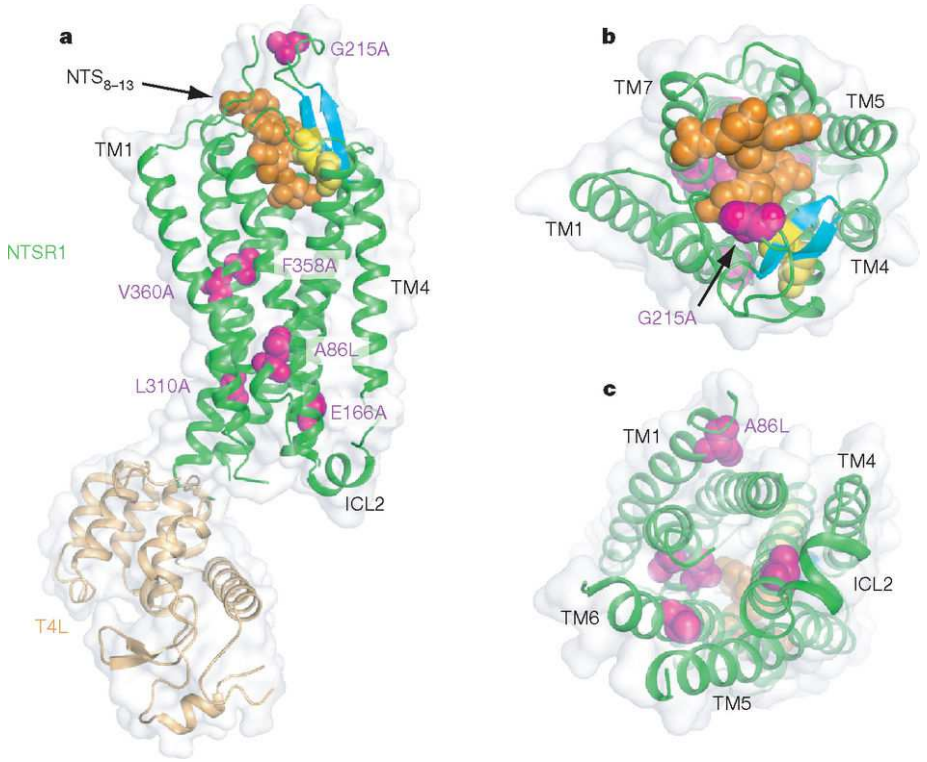


Figure 31 : Représentation du NTR1-GW5-T4L

Vue de côté (a), vue de la partie extracellulaire (b), vue de la partie intracellulaire (c). L'agoniste NT8–13 est représenté en orange, les modifications thermo stabilisantes en rose.

IX.4. Signalisation intracellulaire induite par la fixation de la NT sur NTR1

L'interaction de la NT avec le récepteur NTR1 contribue à la progression du cancer en induisant plusieurs voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, la survie, la migration et les processus d'invasion (Sandra Dupouy *et al.*, 2011a). On peut différencier trois voies majeures simplifiées sur la figure 32: la voie bleue concerne l'activation des petites GTPases, qui sont principalement impliquées dans l'organisation et la mobilité du cytosquelette cellulaire; la voie mauve concerne la mobilisation des stocks de calcium intracellulaires qui est impliquée dans de

nombreuses régulations génétiques et la voie rouge / jaune qui conduit via l'activation de la Phospholipase C (PLC) puis de la protéine kinase C (PKC) à l'activation en cascade d'ERK conduisant à la survie et à la prolifération cellulaire. La NT peut également stimuler la transcription du gène de l'EGF (Epidermal Growth Factor), conduisant ainsi à une transactivation des récepteurs EGFR pouvant conduire à une prolifération et une invasion tumorale via les MMP (en vert). En cancérologie, l'activation/phosphorylation du récepteur de l'EGF (EGFR) a été particulièrement étudiée. La transactivation de l'EGFR par des récepteurs de la famille des RCPG a été démontrée dans plusieurs modèles (George *et al.*, 2013). Dupouy et al. ont démontré dans des modèles de cancer du sein (S. Dupouy *et al.*, 2014) et Younes et al. (Younes *et al.*, 2014) dans des modèles de cancer du poumon que la transactivation de l'EGFR par NTR1 favorise la croissance et l'agressivité tumorale.

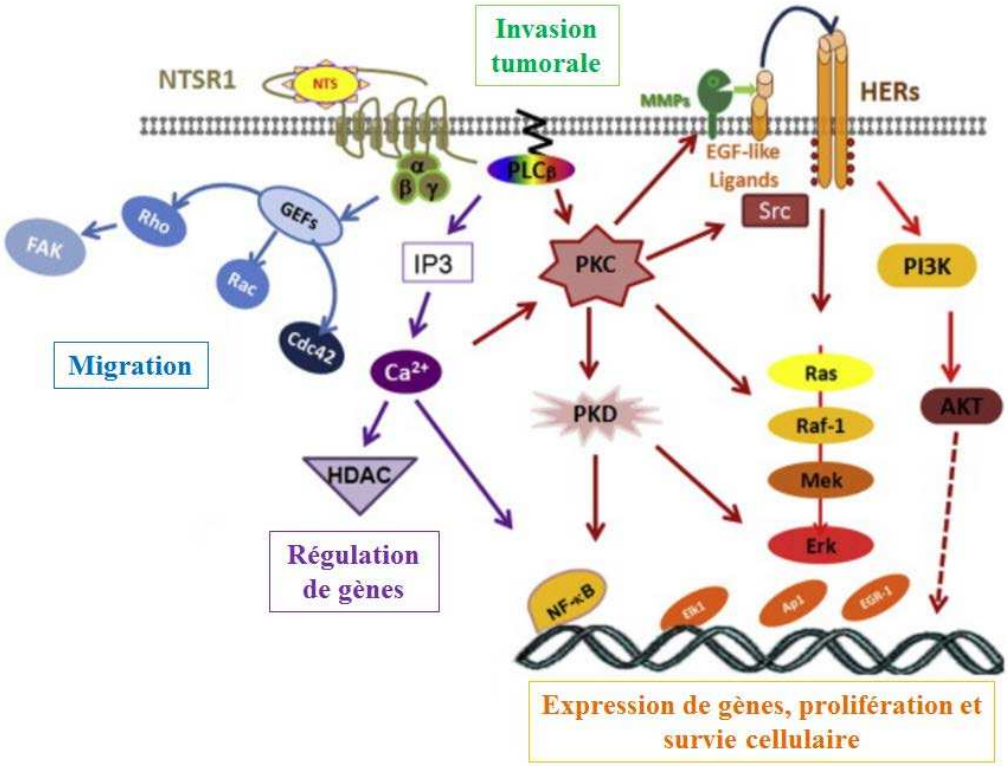


Figure 32 : Schéma simplifié de la signalisation intracellulaire induite par la fixation de la NT sur le NTR1 associée à la cancérogenèse (Sandra Dupouy et al., 2011a).

IX.5. Internalisation et régulation autocrine du complexe NT/NTR1

La NT qui se lie au NTR1 forme avec lui un complexe qui sera intemalisé. Dans les cellules HT29, l'effet intervient rapidement, mais n'atteint sa valeur maximale qu'au bout de 45 minutes (Turner *et al.*, 1990). L'internalisation du NTR1 est bloquée par l'inhibiteur de NTR1, le SR48692/Meclinertant® (Chabry *et al.*, 1994).

Une fois au niveau intracellulaire, le complexe se dissocie. La NT est transportée par les endosomes tardifs et/ou de recyclage vers l'appareil de Golgi (Vandenbulcke *et al.*, 2000). L'endocytose du NTR1 a lieu dans des vésicules endosomales. Celles-ci migrent à l'intérieur de la cellule puis fusionnent avec une vésicule de lysosome qui en dégrade le contenu (Turner *et al.*, 1990). Ces deux phénomènes sont cruciaux dans la régulation de l'expression et la signalisation du récepteur NTR1 (Law *et al.*, 2012). La resensibilisation cellulaire se produit à partir de la synthèse *de novo* du récepteur quelques heures après l'élimination de l'agoniste (Law *et al.*, 2012, Souaze *et al.*, 2006b). Les études conduites par Souazé et al, en 2006 sur le trafic intracellulaire du récepteur NTR1 ont permis de décrire un modèle d'adaptation de la cellule avec une régulation différente du NTR1 lorsque celui-ci est soumis à des conditions d'expositions chroniques et permanentes à son propre ligand. Dans ce cas, au lieu d'être dégradé dans le lysosome, le NTR1 s'accumule transitoirement avec la NT dans le compartiment de recyclage périnucléaire où il est recyclé vers la membrane plasmique. Ainsi, la stimulation chronique par la NT induit une adaptation cellulaire en modifiant le processus de dégradation du NTR1.

Ce phénomène conduit à la sensibilisation permanente des cellules au signal neurotensinergique. La mise en œuvre de ce mécanisme pourrait conduire à la dérégulation de plusieurs voies de signalisation impliquées dans la progression du cancer. Hashimoto et al. ont affiné ces données en démontrant, sur des lignées cellulaires de cancer de la prostate, que l'expression du NTR1 est directement régulée par la concentration en peptide neurotensine sécrété par les cellules neuro-endocrines prostatique (Hashimoto *et al.*, 2015).

IX.6. Neurotensine et cancer

L'action oncogénique de la NT a été décrite dans différents types de cancers comme ayant des effets à chaque étape de progression de la croissance tumorale (prolifération cellulaire et effets anti-apoptotiques), à la propagation métastatique (croissance indépendante de l'ancrage et effets pro-migratoire et pro-invasifs) (R. E. Carraway *et al.*, 2006). Le NTR1 a été le plus étudié des récepteurs, il a été décrit comme étant impliqué dès les premiers stades de progression tumorale et établi comme marqueur diagnostique et de mauvais pronostic dans divers cancers (S. Dupouy *et al.*, 2011b). La contribution du complexe NT/NTR1 dans la stimulation de la croissance tumorale a été rapportée dans plusieurs études, notamment grâce à l'utilisation des antagonistes spécifiques du récepteur NTR1, le SR48692 (Gully *et al.*, 1993), mais aussi par l'antagoniste des NTRs, le SR142948A (Gully *et al.*, 1997) dans des lignées de xénogreffes de cancer colique.

Ainsi, une diminution d'au moins 50% du volume de la tumeur a été observée dans des xénogreffes de cellules d'adénocarcinomes coliques (lignée SW480) (Maoret *et al.*, 1999) et de cancer du poumon à petites cellules exprimant le NTR1, lorsque les animaux ont été traités tous les jours avec

un antagoniste du NTR1 (Moody *et al.*, 2001). Le récepteur NTR2, de par son statut de récepteur de faible affinité à la NT, a fait l'objet de très peu d'études dans le domaine de la cancérologie. Contrairement au récepteur NTR1, son expression reste faible dans les modèles et les lignées cellulaires cancéreuses (Swift *et al.*, 2010).

Dans le cancer du sein, le récepteur NTR3 agit comme un corécepteur pour participer à la signalisation NT/NTR1 (Martin *et al.*, 2002) ou comme un récepteur fonctionnel impliqué dans la migration lorsqu'il est exprimé seul (Roselli *et al.*, 2015). Les mécanismes sous-jacents à la progression du cancer induite par le NTR3 dépendent, en partie, du NTR3 soluble (sNTR3), qui est libéré par le clivage du domaine extracellulaire du NTR3; le NTR3 soluble augmente alors les concentrations de calcium intracellulaire et induit l'activation de la kinase d'adhérence focale (FAK) / Src dépendante de l'activation de la voie de l'inositol1,4,5-trisphosphate (IP3) kinase dans les cellules épithéliales de l'adénocarcinome colique HT29 (Massa *et al.*, 2013).

a. Adénocarcinome colique

La NT induit la prolifération de lignées cellulaires de cancer du côlon humain et la croissance tumorale en stimulant la signalisation MAPK / ERK (Bakirtzi *et al.*, 2011, Massa *et al.*, 2011).

Le récepteur NTR1 est détecté de manière intense en immunohistochimie dans 76% des adénocarcinomes coliques humains mais n'est pas détecté dans l'épithélium du côlon normal (Gui *et al.*, 2008). L'expression accrue de NTR1 est un événement précoce au cours de la tumorigenèse colique, contribuant à la progression tumorale et au comportement tumoral agressif des adénocarcinomes coliques.

b. Cancer de la prostate

L'activation du NTR1 dans la lignée PC3 conduit à la prolifération cellulaire, cet effet étant bloqué par l'inhibiteur de NTR1, le SR48692 (Amorino *et al.*, 2007, Baxendale *et al.*, 2013). Il a également été démontré dans cette même lignée qu'une privation en androgènes conduit à une surexpression de NTR1 et de la NT ce qui permettrait d'assurer leur survie autocrine (Sehgal *et al.*, 1994). Par ailleurs, l'expression de NTR1 varie selon le stade de différenciation tumorale, cette expression étant plus importante dans les adénocarcinomes qu'au sein des adénomes prostatiques (Swift *et al.*, 2010).

c. Cancer canalaire du sein

Le complexe NT/NTR1 est associé à la croissance, la survie et la progression tumorale des lignées de cancer du sein (S. Dupouy *et al.*, 2009, Somai *et al.*, 2002, Souaze *et al.*, 2006a). Chez les patientes présentant un cancer canalaire du sein invasif (CCI) 91% des tumeurs expriment le NTR1 alors qu'il n'est que peu ou pas exprimé par le tissu normal et dans 30 à 35% des cas, la neurotensine

est aussi détectée (S. Dupouy *et al.*, 2009, Elek *et al.*, 2000, Souaze *et al.*, 2006a). Le NTR1 est exprimé dès les stades précoces de CCI. Le dégré d'expression du NTR1 est associé, de façon significative, au stade, à la taille de la tumeur, au nombre de ganglions métastatiques ainsi qu'au décès des patients. Les auteurs suggèrent que la neurotensine est impliquée dans la progression de ce cancer et souligne le potentiel de molécules ciblant le NTR1. De manière intéressante, l'expression du récepteur ER alpha, caractérisée comme un marqueur de meilleur pronostic était inversement corrélée à l'expression du NTR1 (S. Dupouy *et al.*, 2009).
Plus récemment, la même équipe a démontré que l'activation du système neurotensine / NTR1 provoque la surexpression des récepteurs HER1, HER2 et HER3 (S. Dupouy *et al.*, 2014).

d. Cancer du poumon non à petites cellules

Il y a deux catégories de cancer du poumon : le cancer du poumon à petites cellules (SCLC) et le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) ou cancer bronchopulmonaire. Le NSCLC est habituellement divisé en trois types histologiques principaux : le carcinome pulmonaire à grandes cellules, le carcinome épidermoïde et l'adénocarcinome. Ce dernier représente de nos jours le type histologique le plus fréquent dans les pays occidentaux. Les patients atteints de cancer du poumon opérable (stade I-IIIa) ont un taux de survie global à 5 ans d'environ 40%. Le taux de survie à 5 ans chez les personnes atteintes de la maladie de stade I est seulement de 60% à 70%; chez un quart de ces patients, la récidive est locale, alors que pour les autres, la maladie présente une dissémination métastatique. Le défi actuel consiste à identifier les facteurs qui pourraient prédire une récidive tumorale malgré un traitement curatif.
Des concentrations élevées de NT et de NTR1 sont présentes dans le cancer du poumon NSCLC et le cancer du poumon SCLC par rapport au tissu sain (Ocejo-Garcia *et al.*, 2001).

L'expression du récepteur NTR1 et de son ligand la NT, étudiée chez des patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire de stade 1, a été mise en évidence par immunohistochimie dans près de 60% des cas (Alifano *et al.*, 2010b). Ces résultats ont conduit Alifano et son équipe à étudier l'implication de la NT dans la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe d'adénocarcinome chez la souris. Ainsi, la stimulation de l'axe NT/NTR1 augmente la croissance de la tumeur primitive et favorise l'extension des métastases ganglionnaires (Alifano *et al.*, 2010b).
Parallèlement, seules les xénogreffes exprimant NT et NTR1 ont une réponse thérapeutique à l'erlotinib (un inhibiteur de l'EGFR utilisé en thérapeutique humaine), alors que les tumeurs n'exprimant pas NTR1 n'ont pas de réponse. L'expression du NTR1 et de son ligand au niveau de la tumeur peut ainsi être considérée comme un biomarqueur de la progression tumorale et est fortement associée à un facteur de mauvais pronostic (S. Dupouy *et al.*, 2011b, Younes *et al.*, 2014).

e. Adénocarcinome pancréatique

De nombreuses études ont montré que la NT stimule les voies de signalisation mitogéniques et la synthèse de l'ADN dans les lignées cellulaires du cancer du pancréas humain, comme PANC-1 et MIA PaCa-2 (Guha *et al.*, 2002, Herzig *et al.*, 1999). Ces effets de croissance sont médiés par la stimulation du NTR1 (Iwase *et al.*, 1997). Cependant, une autre étude a conclu que la migration des cellules pancréatiques d'adénocarcinome canalaire in vitro induite par la NT se produit via les voies NTR3 / sortilin (Mijatovic *et al.*, 2007).

Il est maintenant bien établi que les récepteurs de la NT sont exprimés dans les tumeurs pancréatiques exocrines alors que ces récepteurs ne sont pas retrouvés dans les tissus pancréatiques exocrines normaux ni dans les pancréatites (Ehlers *et al.*, 2000, J. C. Reubi *et al.*, 1998). Le récepteur NTR1 est d'ailleurs co-détecté avec la NT dans la majorité des PDAC étudiés en immunohistochimie (Ji-Gang Wang *et al.*, 2011). Une étude récente de Körner et al. en 2015 a même permis de démontrer que le NTR1 est surexprimé dans les lésions PanIn de haut grade et dans les métastases hépatiques (Korner *et al.*, 2015).

IX.7. Les radiotraceurs peptidiques analogues de la neurotensine NT

La NT native a une demi-vie très courte (1,5 min) dans le plasma humain et n'est pas donc pas utilisable pour réaliser de l'imagerie spécifique des NTR. Des études précédents ont montré que le peptide NT (8-13) a une affinité similaire à la NT et une demi-vie plasmatique plus longue (10 min). Ce peptide est néanmoins trop rapidement dégradé *in vivo* pour être détectable et s'accumuler de façon sélective dans une tumeur NTR positive (Bergmann *et al.*, 2002). Cette instabilité est attribuée au clivage rapide des liaisons amide Arg(8)-Arg(9), Pro(10)-Tyr(11) et Tyr(11)-Ile(12) de la NT par des enzymes protéolytiques (détails chapitre IX.1).

Pour contourner ce problème, de nombreuses stratégies de stabilisation de cette séquence (8-13) ont été rapportées. Heyl et al. (Heyl *et al.*, 1994) ont modifié la NT(8–13) par la N-méthylation de l'Arg8 et le remplacement de l'Arg9 par une Lys et celui de l'Ile12 par une Tle (leucine tertiaire). Des dérivés modifiés de la NT(8–13) ont ainsi été marqués avec succès par de l'iode-125 (Bouwmeester *et al.*, 2003), par de l'indium-111 (Achilefu *et al.*, 2003) et par du technétium-99m (Alberto *et al.*, 1998), ainsi que par du fluor-18 (Bergmann *et al.*, 2002) puis plus récemment par du gallium-68 (Maschauer *et al.*, 2010) et utilisés en imagerie.

Certaines séries d'analogues de la NT développés ci-dessous ont montré des résultats intéressants en préclinique : par rapport à la NT native, une stabilité plasmatique améliorée et uneaffinité de liaison conservée et ont même été testés en phase I chez le patient.

a. Les analogues de la NT marqués au ^{99m}Tc

De nombreux analogues radiomarqués de la neurotensine ont été développés principalement par l'équipe du Pr. D. Tourwe. Ces molécules dérivées de la NT(8-13) comportaient une N-alpha-acétyl-histidine pour la chélation du technétium ^{99m}Tc et des modifications de séquence (substitutions d'acides aminés par des analogues non naturels ou modifications des liaisons peptidiques).

Tableau 5 : Caractéristiques d'analogues (Nα-His)Ac-NT$_{8-13}$ non complexés ou complexés avec le ^{99m}Tc.

Peptide	**Séquence**	**IC50**	**Kd**	**% ID/g, 5h après l'injection**			**t1/2**	**t1/2**
		nM	**nM**	T	R	F	***in vitro***	***in vivo***
NT	pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH		1,6					
NT8-13	Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH	0,9	1					
NT II	**(Nα-His)Ac**-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH	16,4						
[^{99m}Tc]NT II	**[^{99m}Tc(CO)3](Nα-His)Ac**-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH		**0,3**	0,4	2,8	4,4	5,6min	<1min
NT XI	**(Nα-His)Ac-Lys-ψ(CH$_2$-NH)-**Arg-Pro-Tyr-**Tle**-Leu-OH	158						
[^{99m}Tc] NT XI	**[^{99m}Tc(CO)3](Nα-His)Ac-Lys-ψ(CH$_2$-NH)-**Arg-Pro-Tyr-**Tle**-Leu-OH		**0,5**	1,7	10,1	1,2	**21 j**	
NT XII	**(Nα-His)Ac**-Arg-**N(Me)Arg**-Pro-Tyr-**Tle**-Leu-OH							
[^{99m}Tc]NT XII	**[^{99m}Tc(CO)3] (Nα-His)Ac**-Arg-**N(Me)Arg**-Pro-Tyr-**Tle**-Leu-OH		2	4,5	5,5	2,4	**21 j**	**0,75 h**
NT XIX	**(Nα-His)Ac**-Arg-**N(Me)Arg**-Pro-**Dmt-Tle**-Leu-OH							
[^{99m}Tc]NT XIX	**[^{99m}Tc(CO)3] (Nα-His)Ac**-Arg-**N(Me)Arg**-Pro-**Dmt-Tle**-Leu-OH		**15**	**5,2**	**2,7**	1,2	**28 j**	1,4h

(IC50: Expériences de compétitions entre la liaison de la ^{125}I NT à des cellules HT29 entières et des concentrations croissantes de l'analogue. Kd: saturation effectuée avec l'analogue radiomarqué, biodistribution dans des souris nude greffées avec ces cellules HT29, stabilité in vitro dans du plasma humain (37°C) ou in vivo chez la souris après injection i.v. (T : tumeur, R : reins, F : foie, ND : non déterminé, Dmt: diméthyl-tyrosine) d'après (Bruehlmeier *et al.*, 2002, Buchegger *et al.*, 2003, Garcia-Garayoa *et al.*, 2001, Garcia-Garayoa *et al.*, 2006).

On peut constater dans ce tableau que l'affinité d'un dérivé non marqué (NT II) est plus faible que celle de la NT(8-13). Mais, après marquage au ^{99m}Tc, le Kd du composé est du même ordre de grandeur. Ces résultats soulignent l'importance d'étudier les affinités des analogues marqués avec un radionucléide pour le développement d'un radiopharmaceutique (Buchegger *et al.*, 2003, Garcia-Garayoa *et al.*, 2001, Garcia-Garayoa *et al.*, 2006).

Les deux modifications de séquence simultanées, c'est-à-dire la substitution de l'Arg^{8} par une Lys modifiée (Lys-ψ(CH_2-NH) (composé [^{99m}Tc]NT XII) ou la N-méthylation des liaisons 9-10 ([^{99m}Tc]NT XII) associée à l'introduction de Tle, ont abouti à une molécule présentant une grande stabilité *in vitro* avec une demi-vie de plus de 20 jours. Ensuite, la stabilisation de la molécule en remplacant la Tyr^{11} par une Dmt dans la séquence de [^{99m}Tc]NT XII a abouti au composé [^{99m}Tc]NT XIX. Cet analogue présentait une stabilité élevée particulièrement *in vivo*. Ce dernier dérivé procure le plus fort marquage tumoral obtenu avec les analogues de cette série (5.2 % ID/g 5h après injection) avec la plus faible accumulation rénale (2.7% ID/g) avec pourtant une diminution de l'affinité du composé (Tableau 5) (Garcia-Garayoa *et al.*, 2009).

Le dérivé NTXI marqué au ^{99m}Tc a été évalué en 2003 dans une étude clinique de scintigraphie d'adénocarcinome pancréatique chez quatre patients. Pour deux patients, les tumeurs n'exprimaient pas de récepteurs de la neurotensine ; pour un patient, la tumeur ne présentait qu'une très faible expression du récepteur. Pour le quatrième patient, la tumeur, qui présentait une forte expression de récepteur de la neurotensine, a été visualisé sur les scintigraphies. L'injection de la ^{99m}Tc-NT-XI a été bien tolérée avec une accumulation rénale moyenne (Buchegger *et al.*, 2003).

Une série d'analogues Gly-NT(8-13), étendus d'un acide aminé (Gly) en N-terminal et portant un chélatant tétraamine acyclique (N_4) pour la chélation du technétium, a été décrite par la même équipe. Des stabilités plasmatiques satisfaisantes, supérieures à 1h, ont été obtenues avec les ^{99m}Tc-Demotensin 3 et 4. Ces composés ont été testés in vivo dans des modèles de tumeurs d'adénocarcinomes coliques humains HT29 et WiDr exprimant les NTR1. Tous deux ont permis une captation tumorale élevée de l'ordre de 4%D/g en 1h p.i. ainsi qu'une clairance rénale rapide. La ^{99m}Tc-Demotensin 4 a donné de meilleurs résultats en terme de biodistribution du traceur avec une élimination rénale plus rapide et un rapport tumeur/sang de 6,8 à 7,4 en fonction du modèle tumoral utilisé (HT29 et WiDr respectivement) (Maina *et al.*, 2002, Nock *et al.*, 2006).
Cette équipe a poursuivi ses travaux en proposant d'autres modifications pour aboutir à deux nouveaux composés les ^{99m}Tc-Demotensin 5 et 6, plus facilement synthétisables que les composés 3 et 4 de leur précédente série.
Les ^{99m}Tc-Demotensin 5 et 6 ont montré une haute stabilité dans le plasma murin et une haute affinité pour le récepteur NTR1 sur des cellules WiDr (IC50=0,03 nmol/L et 0,08nmol/L respectivement). In vitro, la ^{99m}Tc-Demotensin 6 est restée intacte à 90% pendant plus de 2h alors que la ^{99m}Tc-Demotensin 5 a été rapidement dégradée (t1/2 de 15min). Cette différence de stabilité s'est vérifiée *in vivo*, chez des souris porteuses de cancers humains coliques WiDr : la ^{99m}Tc-Demotensin 5 a obtenu une captation tumorale faible (1,7 % ID/g à 1 h p.i. et seulement 0,8 % ID/g

à 4 h p.i.) la ^{99m}Tc-Demotensin 6 a montré une captation tumorale élevée et spécifique (plus de 4,3% ID/g à 1 h p.i. et 2,31% ID/g à 4 h p.i.) ainsi qu'une clairance rénale rapide (Maina *et al.*, 2007).

Il est cependant difficile de comparer ces composés à ceux des autres séries car ils ont été évalués dans un modèle cellulaire différent. Cependant le marquage tumoral obtenu avec la démotensine 6 (Tableau 6) reste plus faible que celui de la NTXIX (Tableau 5) et l'activité rénale est plus élevée.

Tableau 6: Caractéristiques de liaison, stabilité, biodistribution des démotensines 5 et 6

Demotensine	**Séquence**	**% ID/g, 1h**			**% ID/g, 4h**			**t1/2** *in vitro*
		T	**R**	**T/Bl**	**T**	**R**	**T/Bl**	
NT8-13	Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH							
[^{99m}Tc] 5	**[^{99m}Tc] N4-(β)Ala** -Arg**- Dab**-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH	1,7	13,5	3,0	0,8	19,7	16,6	15 min
[^{99m}Tc] 6	**[^{99m}Tc] N4-(β)Ala** -Arg**- Dab**-Pro-Tyr-**Tle**-Leu-OH	4,3	5,0	7,8	2,3	7,8	57,8	>2h

Liaison sur membranes de cellules WiDr. Stabilité in vitro à 37°C dans le plasma humain. Biodistribution chez la souris nude greffée avec des cellules WiDr. (β)Ala: béta-alanine; Dab: acide diaminobutyrique d'après (Maina *et al.*, 2002, Nock *et al.*, 2006).

La démotensine 6 marquée au ^{99m}Tc a été évaluée en TEMP chez 14 patients (2 femmes et 12 hommes) avec des stades tumoraux avancés dont quatre adénocarcinomes pancréatiques, quatre cancers du poumon à petites cellules (SCLC), quatre cancers du poumon non à petites cellules (NSCLC) et deux carcinomes du côlon. La ^{99m}Tc -démotensin 6 a été bien tolérée par les patients et a montré une pharmacocinétique favorable. Cependant, la détection des tumeurs s'est limitée aux métastases cérébrales. Les auteurs ont conclu que des études supplémentaires étaient nécessaires pour comprendre les problèmes de stabilité et mieux caractériser les récepteurs pour lesquels leur ligand avait une affinité (M. Gabriel *et al.*, 2011).

b. Les analogues de la NT marqués à l'^{111}In

Une série d'analogues de la neurotensine a été synthétisée par Achilefu et al. du groupe de J. Erion, de la société Mallinckrodt (Achilefu *et al.*, 2003) (Tableau 7). Ces dérivés sont principalement des analogues de la NT(6-13) avec des dérivés modifiés de la lysine en position 6 et de l'arginine en position 8 pour améliorer la stabilité. Ils portent le DTPA sur la fonction NH_2.

Le groupe de M. de Jong (de Visser *et al.*, 2003) a ensuite publié une étude plus complète des caractéristiques de ces composés, couplés soit au DTPA soit au DOTA. Par la suite, plusieurs publications ont complété ces premières études (Janssen *et al.*, 2007, Melis *et al.*, 2007)

In vitro, les modifications dans la séquence peptidique et la fixation des agents chélatants n'ont pas perturbé l'affinité de liaison au NTR1 de ces analogues de la NT marqués à l'^{111}In. In vitro, la stabilité dans le sérum humain à 37°C a même été améliorée puisque l'analogue 2530 est resté intact à 96% dans le plasma pendant 4h.

Tableau 7 : Une série d'analogues de la neurotensine marqué à l'^{111}In

No.	**Sequence**	**IC_{50}±SEM (nM)**
Neurotensin		1,3±0,27
2530	DTPA-(Pip)Gly-Pro-(PipArn)Gly-Arg-Pro-Tyr-tBuGly-Leu-OH	4,4±0,20
2656	DOTA-(Pip)Gly-Pro-(PipAm)Gly-Arg-Pro-Tyr-tBuGly-Leu-OH	3,4±0,40

Abréviations des acides aminés: Gly(PipAm), 4-pipéridinyl-(N-amidino)-S-glycine; tBuGly, tert-butyl-S-glycine; Gly(Pip), 4-pipéridinyl-S-glycine; *Ala(Pip),4-piperidinyl-L-alanine;*

In vivo ces 2 analogues marqués à l'indium-111 (^{111}In-MP2530) et son homologue DOTA conjugué, ^{111}In-MP2656 ont donné les marquages tumoraux les plus élevés, respectivement 1,1±0,64 et 1,59±0,56 %ID/g (4h après injection), ainsi qu'une élimination rapide du bruit de fond sanguin et avec des marquages rénaux relativement élevés entrainant des rapports d'activité tumeur/rein d'environ 0,2. La rétention relativement élevée par les reins n'a pas pu être réduite par la co-administration de lysine, ce qui est probablement dû à l'absence de résidus de lysine dans la séquence peptidique de ces analogues NT.

Bien qu'en préclinique ces analogues NT aient semblé prometteurs, les études initiales des patients réalisées dans leur institut ont suggéré le contraire. Sur les sept patients atteints d'adénocarcinome du pancréas prouvé, aucune fixation pathologique n'a pu être montrée sur les images scintigraphiques à l'^{111}In-MP2530 (Froberg, A. *et al. EJNMMI* 2004; 31, suppl 2: S392). En autoradiographie *in vitro* des tissus tumoraux après la chirurgie (cinq patients) ont montré une faible expression des NTR1 dans une seule tumeur modérément différenciée. Cette faible incidence est en contraste avec les conclusions de Reubi et al., montrant que les récepteurs NT étaient surexprimés dans 75% des adénocarcinomes pancréatiques.

Les résultats de leur étude pouvaient cependant être influencés par le fait que les patients avaient des tumeurs faiblement à modérément différenciées, alors que Reubi et al. ont trouvé des récepteurs de la NT plus souvent dans des tumeurs différenciées que dans des tumeurs peu différenciées (J. C. Reubi *et al.*, 1998). L'absence de fixation de l'^{111}In-MP2530 dans la seule tumeur du pancréas positive pour les récepteurs peut être attribuée à la dégradation rapide du composé qui a été observée chez les patients de l'étude.

L'équipe d'A. Gruaz-Guyon a développé une série de dérivés de la NT (6-13) couplés au chélate DTPA permettant le marquage à l'indium-111 (Hillairet De Boisferon *et al.*, 2002) (Alshoukr *et al.*, 2009). Les caractéristiques de ces composés ont été étudiées dans un modèle de souris greffées en sous cutané par la lignée HT29 et les résultats de ces études seront détaillés dans la partie (XI.1.) introductive de l'article 2.

c. Les analogues de la NT marqués au ^{18}F ou au ^{68}Ga

Un des analogues de la NT (8-13), le ^{18}FB-Arg$^{8}\psi(CH_2NH)$ Arg^{9}-Pro^{10}-Tyr^{11}-Tle^{12}-Leu^{13}-OH a été doublement stabilisé et marqué au fluor-18 par Bergmann et al. en 2002 (Bergmann *et al.*, 2002). Ce fut le premier radiotraceur utilisable en imagerie TEP. Dans cette étude, malgré une affinité de liaison élevée pour le NTR1 (IC50=4,1 pour le composé non radiomarqué) et une double stabilisation contre la dégradation enzymatique, les résultats en TEP ont démontré une accumulation tumorale très faible et une accumulation prédominante du radiotraceur au niveau du foie et des reins une stabilité du dérivé marqué trop faible *in vivo* et peut-être une déshalogénation du composé *in vivo*.

Maschauer et al. ont été les premiers a synthétiser un analogue de la NT porteur d'un chélate DOTA marqué au gallium 68 et donc adapté à l'imagerie TEP du récepteur NTR1 (Maschauer *et al.*, 2010). Ce composé est basé sur les premières modifications de la séquence NT(8-13) (Heyl *et al.*, 1994) à savoir la Leu^{12} remplacée par une Tleu^{12} et le remplacement en plus des Arg^{8}-Arg^{9} par un résidu peptidoïde *N*-(4-aminobutyl)Gly-Lys annoté (NLys-Lys). Cet analogue testé *in vivo* dans un modèle de tumeur HT29 a montré un marquage tumoral spécifique avec une valeur de SUVmax faible d'environ 0,16. Les biodistributions *ex vivo* ont révélé une rétention au niveau des reins de 8,1%ID/g 65min après injection, une captation tumorale de 1,2% ID/g 30 min après injection diminuant rapidement à 0,7% ID/g 65 min après injection mais avec un rapport tumeur/sang augmentant de 1,1 à 5,4 entre 10 et 65 min après injection, indiquant que ce radiotraceur pouvait être utilisé dans des temps d'imageries très courts après injection donc compatibles avec le gallium-68 même si l'accumulation tumorale était très faible.

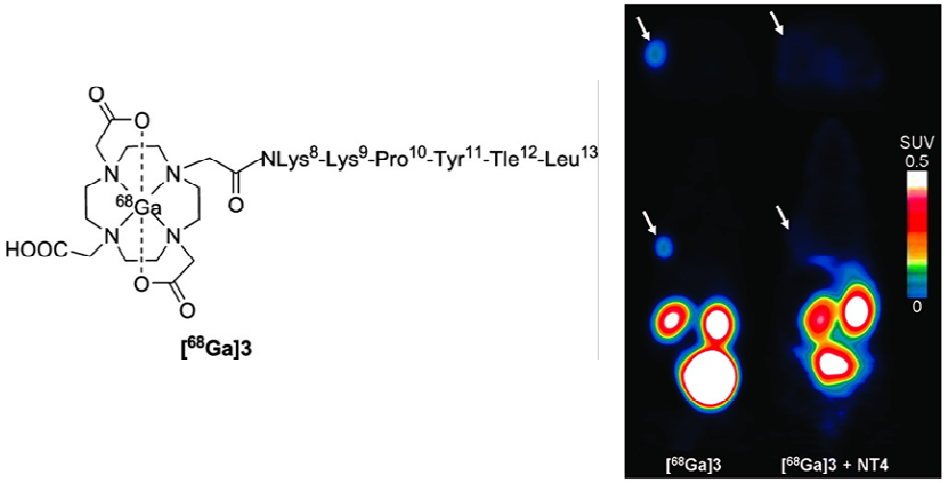


Figure 33 : Structure du [68Ga]3 et images TEP d'une souris porteuse d'une tumeur HT29.

45–65 min après injection de [68Ga]3 à gauche ou de [68Ga]3 coinjecté avec du peptide non marqué à droite, la flèche du bas indique la tumeur, la flèche du haut le point d'injection (Maschauer *et al.*, 2010).

Dans cette étude, ils avaient aussi tenter de coupler cet analogue à un sucre marqué au fluor-18 pour aboutir au [^{18}F]FGlc-NT4 mais ce composé a démontré *in vivo* une forte absorption rénale et une mauvaise clairance sanguine. Cette même équipe a poursuivi ses travaux et a proposé de manière intéressante de remplacer la séquence modifié de la NT (8-13) par l'antagoniste du NTR1, le SR142948A (Gully *et al.*, 1997), ils développèrent ainsi le premier radiotraceur non peptidique pour l'imagerie TEP du NTR1 (Lang *et al.*, 2013).

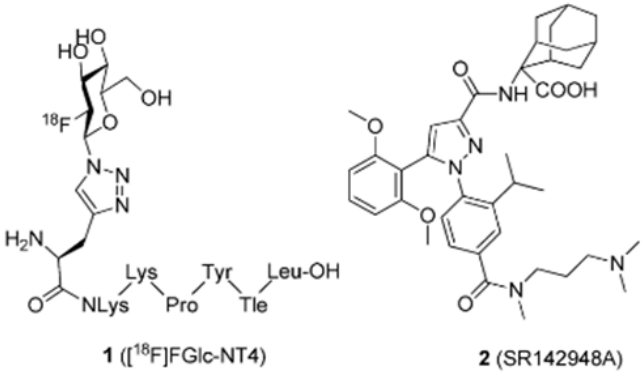


Figure 34 : Structure du ^{18}F-FGlc-NT4 et de l'antagoniste SR142948A, d'après (Gully et al.*, 1997)*

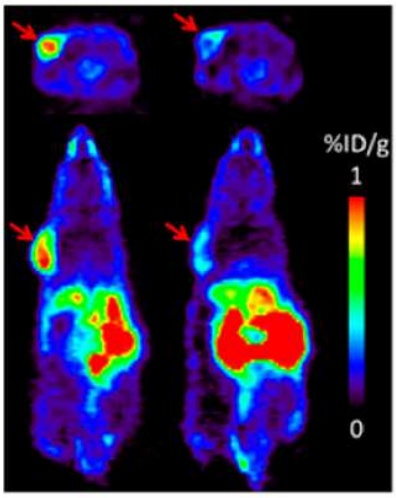


Figure 35 : Image TEP du radiotraceur ^{18}F-8 injecté à une souris porteuse d'une tumeur HT29 à gauche, image contrôle à gauche avec co-injection de peptide antagoniste, d'après (Lang et al.*, 2013)*

En résumé, la stabilisation contre la dégradation *in vivo* des analogues de la NT a pu améliorer le potentiel scintigraphique des peptides pour l'imagerie des tumeurs exprimant NTR1, certains analogues ont montré une pharmacocinétique favorable, d'autres une accumulation tumorale faible et une accumulation prédominante du radiotraceur au niveau du foie et des reins suggérant une résistance à la dégradation enzymatique encore trop faible, notamment pour les premiers radiotraceurs développés pour la TEP. D'autre part, les études cliniques réalisées ont montré que la fréquence et la densité des récepteurs NT sur les tumeurs pancréatiques exocrines pourrait être inférieure à ce qui était prévu. Finalement le seul radiotraceur qui a permis de visualiser un PDAC en scintigraphie dans une étude clinique est le dérivé NTXI marqué au ^{99m}Tc évalué en 2003. Cette tumeur présentait une forte expression du NTR1. Ce qui suggère qu'il est important de déterminer le pourcentage réel de patients atteints de PDAC surexprimant le NTR1 pour mieux guider les objectifs d'une étude clinique d'imagerie diagnostique utilisant un radiotraceur analogue de la neurotensine. Une prévalence forte de l'expression du récepteur permettrait la caractérisation des anomalies du pancréas, une des limites du ^{18}F-FDG. Une prévalence plus faible ferait limiter l'indication à la stadification et au suivi des PDAC une fois démontrée la surexpression du NTR1.

Résultats

X. L'AMBA, un analogue de la bombésine portant le DOTA

X.1. Introduction

Les récepteurs NMBR et particulièrement le GRPR sont exprimés par divers tissus tumoraux, y compris les tumeurs primaires et les métastases de l'adénocarcinome de la prostate (Constantinides *et al.*, 2003, Gugger *et al.*, 1999, Markwalder *et al.*, 1999, Scopinaro *et al.*, 2003), les cancers du sein (Gugger *et al.*, 1999, Halmos *et al.*, 1995, C. Reubi *et al.*, 2002a, Scopinaro *et al.*, 2002, Soluri *et al.*, 2003) et du côlon (Scopinaro *et al.*, 2004). Ces découvertes ont stimulé la recherche d'analogues peptidiques synthétiques de la bombésine ou du GRP qui pourraient être utilisés comme radiotraceurs diagnostiques et / ou thérapeutiques pour le ciblage des tumeurs surexprimant le GRPR.

L'AMBA (DOTA-CH2CO-Gly-[4-aminobenzoyl]-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH2) est un peptide de 8 acides aminés portant un chélate DOTA lié par l'intermédiaire d'un groupement espaceur. C'est un analogue de la bombésine de la bombésine (pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH2), agoniste du GRPR, développé par la société Bracco Imaging. Ce peptide marqué au lutétium-177 a présenté une bonne affinité pour le GRPR dans un modèle de cancer de la prostate, la lignée PC3 qui surexprime ce récepteur ($IC_{50} = 4.75 \pm 0.25$). Le Lu-AMBA marqué par le métal non radioactif présente une affinité encore meilleure ($IC_{50} = 2.5 \pm 0.5$), à peine moins bonne que la bombésine native BBN ($IC_{50} = 1.97 \pm 0.93$) (Reile *et al.*, 1994).

Les études *in vitro* ont démontré une expression d'environ $2,5 \times 10^5$ GRPR par cellule PC3, une très bonne stabilité du ^{177}Lu-AMBA dans le plasma humain ($t_{1/2} = 38,8$ h) meilleure que dans le plasma murin ($t_{1/2} = 3,1$ h), une internalisation très rapide des récepteurs de l'ordre de quelques minutes, ainsi qu'une réexpression de 90% des GRPR à la surface de la membrane cellulaire en à peine 1 heure (Lantry *et al.*, 2006).

Des expériences d'autoradiographie ont démontré une affinité du ^{177}Lu-AMBA pour le GRPR et pour le récepteur de la neuromédine B (NMBR) humain. *In vivo*, l'excrétion du ^{177}Lu-AMBA a été majoritairement rénale et la captation tumorale a atteint un pourcentage de dose injectée par gramme de tumeur égal à 6,4 %. Une forte fixation pancréatique de ^{177}Lu-AMBA a été constatée chez les souris, comme attendu, car le sous-type de récepteur prédominant dans le pancréas des rongeurs possède une forte affinité pour le peptide permettant la libération de la gastrine. Cette première étude a poussé l'équipe de Bracco à poursuivre ses travaux en optimisant le marquage du ^{177}Lu-AMBA et en stabilisant sa formulation par ajout de sélénométhionine pour réduire l'oxydation des résidus de méthionine et par l'ajout d'acide ascorbique pour protéger le composé de la radiolyse (J. Chen *et al.*, 2008), pour pouvoir l'utiliser lors d'un essai clinique.

Pour mieux sélectionner les types de tumeurs appropriées pour l'étude clinique, Bracco a complété les études déjà disponibles concernant l'expression des récepteurs GRPR et NMBR par une étude d'autoradiographie avec le ^{177}Lu-AMBA sur différents types de tumeurs de la prostate et du sein. Une surexpression et une densité élevées des sites de liaison du ^{177}Lu-AMBA ont été observées dans 82% (14/17) des carcinomes prostatiques invasifs primitifs et dans 46% (6/13) des tumeurs primitives du sein, indépendamment du sous-type de carcinome, cette liaison impliquant en majorité le GRPR (Regi Thomas *et al.*, 2008).

En 2007 Chen et al. ont montré que le ^{67}Ga-AMBA (le gallium-67 est un émetteur gamma utilisé comme substitut de ^{68}Ga-AMBA) et le ^{177}Lu-AMBA ont *in vitro* des affinités élevées et comparables pour le GRPR dans la lignée cellulaire de cancer de la prostate humaine PC-3 (Kd = 0,46 ± 0,07; 0,44 ± 0,08 nmol/L respectivement) (Jianqing Chen *et al.*, 2007).

Fox et al. ont montré, dans des expériences de biodistribution chez des souris mâles immunodéficientes porteuses de tumeurs PC-3, que les captations tumorales ainsi que les biodistributions de ^{177}Lu-AMBA, ^{111}In-AMBA, ^{67}Ga-AMBA étaient comparables (Fox *et al.*, 2007).

En parallèle, Baum et al. ont présenté la première utilisation clinique de l'AMBA marqué au gallium-68 chez 10 patients (Richard Baum *et al.*, 2007) atteints de divers cancers, y compris 2 cas de cancer de la prostate. Le radiopharmaceutique a montré une absence de fixation significative dans les organes non cibles et il a été bien toléré par les patients, avec seulement des effets indésirables mineurs. Le ^{68}Ga-AMBA a même identifié un patient atteint de cancer de la prostate métastatique, ce qui a permis ensuite de le traiter avec le même analogue radiomarqué au ^{177}Lu (^{177}Lu-AMBA). Cependant, cette radiothérapie ciblée avec cet agoniste de GRPR a causé des effets secondaires aigus (crampes abdominales, vomissements, diarrhées) lorsqu'il a été administré à des doses plus élevées, nécessaires au traitement par le lutétium-177. Bodei L, *et al*. *EJNMMI.* 2007;34(Suppl 2):S221

Devant les effets secondaires du ^{177}Lu-AMBA aux doses thérapeutiques, la société Bracco a décidé d'utiliser en priorité l'AMBA pour le diagnostic des cancers de la prostate et du sein.

La synthèse du radiotraceur ^{68}Ga-AMBA, entièrement automatisée et d'une durée de 20 min, a été développée par Cagnolini et al. (Cagnolini *et al.*, 2010). Sa biodistribution a été comparé à celle du ^{111}In-AMBA et du ^{177}Lu-AMBA ; Leurs biodistributions et leurs captations dans les tissus cibles et non cibles étaient similaires. La fixation tumorale à 1 h après injection était favorable (4,85±2,17 % ID/g pour le ^{68}Ga-AMBA). La voie d'excrétion était majoritairement rénale (~ 50-60% en 1h).

Au début de nos travaux, une grande variété de lignées cellulaires de cancer du sein avaient été utilisées dans des études *in vitro* pour démontrer la surexpression des récepteurs de la bombésine

comme MCF7, MDA-MB-231, T-47D, BT474 (Zhaofei Liu *et al.*, 2009). Mais lors des études précliniques *in vivo,* seul le modèle de xénogreffes de cancer du sein humain T47D avait été utilisé (Parry *et al.*, 2007) (Prasanphanich *et al.*, 2009) (Fournier *et al.*, 2012), et aucune étude n'avait été faite avec la lignée ZR75-1, décrite comme étant de phénotype luminal dépendant des œstrogènes (Al-Bader *et al.*, 2011, Ford *et al.*, 2011).

Des études de liaison in vitro, réalisées par Bracco avec du ^{177}Lu-AMBA, ont montré que la lignée de cancer du sein ZR75-1 avait une capacité de liaison maximale de 12,7 $\pm$ 7.8 fmol par million de cellules (Bmax), soit une expression d'environ 2 x 10^3 sites de liaison par cellule. Un tel niveau d'expression du GRPR est comparable à ceux que d'autres ont pu observer dans la lignée de cancer de la prostate LnCap (Maddalena *et al.*, 2009). Environ 70% des cancers du sein humains sont ER + et, par conséquent, potentiellement sensibles aux thérapies hormonales.

Nous avons proposé de comparer dans une étude préclinique le ^{68}Ga-AMBA au ^{18}F-FDG afin d'évaluer le potentiel de ces deux radiotraceurs pour le suivi d'un traitement par hormonothérapie au tamoxifène (Cameron *et al.*, 1997, Kristensen *et al.*, 1999).

De nombreuses nouvelles approches thérapeutiques sont proposées dans le cancer du sein, pour remplacer ou compléter les thérapies existantes. Les études précliniques sur des modèles animaux sont des étapes importantes pour évaluer l'efficacité de ces nouvelles modalités thérapeutiques, telles que le trastuzumab (Smith *et al.*, 2013) ou des inhibiteurs de l'AKT (Maynard *et al.*, 2013) et de leur association avec des agents anti-hormones ou cytolytiques. La TEP au ^{18}F-FDG a été proposée dans ce but, car elle permet de suivre la réponse métabolique à la thérapie sur une longue période par imagerie répétée sans sacrifier les animaux.

X.2. Article 1: ^{68}Ga-AMBA et ^{18}F-FDG pour l'imagerie TEP préclinique du cancer du sein. Effet d'un traitement au tamoxifène sur la captation tumorale des radiotraceurs.

Prignon A, Nataf V, Provost C, et al. (68)Ga-AMBA and (18)F-FDG for preclinical PET imaging of breast cancer: effect of tamoxifen treatment on tracer uptake by tumor. *Nucl Med Biol.* 2015;42:92-98.

Nuclear Medicine and Biology 42 (2015) 92–98

Contents lists available at ScienceDirect

Nuclear Medicine and Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/nucmedbio

^{68}Ga-AMBA and ^{18}F-FDG for preclinical PET imaging of breast cancer: effect of tamoxifen treatment on tracer uptake by tumor

A. Prignon [a,*], V. Nataf [a,c], C. Provost [a], A. Cagnolini [b], F. Montravers [a,c], A. Gruaz-Guyon [d], LE. Lantry [b], JN. Talbot [a,c], AD. Nunn [b]

[a] Plateforme LIMP, UMS28 Phénotypage du petit animal, UPMC, Paris, France
[b] Bracco Research USA, Princeton USA
[c] APHP, Hôpital Tenon, Médecine nucléaire, Paris, France
[d] Inserm, U773, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 24 July 2014
Received in revised form 22 September 2014
Accepted 1 October 2014

Keywords:
Gastrin releasing peptide receptor
^{68}Ga
^{18}F-FDG
Breast cancer
PET
Estrogen

ABSTRACT

Introduction: AMBA is a bombesin analogue that binds to GRPr. In a mouse model of estrogen-dependent human breast cancer, we tested whether ^{68}Ga-AMBA can be used for PET detection of GRPr-expressing tumors and could be more accurate than ^{18}F-FDG to monitor tumor response to hormone therapy.
Methods: The radiolabeling of ^{68}Ga-AMBA was automated using a R&D Synchrom module. ZR75-1, a breast cancer cell line, was xenografted in nude mice. ^{68}Ga-AMBA tumor uptake was compared with that of ^{18}F-FDG before and after treatment with tamoxifen.
Results: AMBA was ^{68}Ga-radiolabelled in 30 min with 95.3% yield and purity ≥ 98%. Prior to treatment, ^{68}Ga-AMBA was highly concentrated into tumors (tumor to non-tumor ratio = 2.4 vs. 1.3 with ^{18}F-FDG). With tamoxifen treatment (n = 6) ^{68}Ga-AMBA uptake plateaued after 1 week and decreased after 2 weeks, with a significant reduction compared to controls (n = 4). In contrast the effect of tamoxifen treatment could not be appreciated using ^{18}F-FDG.
Conclusions: ^{68}Ga-AMBA appeared better than ^{18}F-FDG to visualize and monitor the response to hormone treatment in this breast cancer model.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Peptide-based molecular imaging probes targeting over-expressed receptors on cancer cells are particularly interesting due to their fast clearance in blood, their excellent tissue penetration and their low immunogenicity [1]. Bombesin is a 14-amino acid peptide isolated from the frog Bombina bombina's skin. The mammalian homologue of this peptide is the gastrin-releasing peptide (GRP), which is able to induce hyperthermia, bradycardia, gastric emptying inhibition and food intake inhibition, by activating G protein-coupled receptor called gastrin releasing peptide receptor (GRPr) [2].

GRPr is over-expressed in many human cancer types, such as prostate cancer [3,4], breast cancer [5,6], small cell lung cancer [7] and gastrointestinal stromal tumors [8]. For this reason the interest to use GRPr as a molecular target for imaging has increased in the last few years.

Single photon emission computed tomography (SPECT) with bombesin analogues labeled with ^{111}In has been used in mouse models of prostate cancer; AMBA (Do3A-Ch2Co-G-(4-aminobenzoyl)-QWAVGHLM-NH2) was one of the three analogues of bombesin that showed sufficient stability *in vivo* as well as high tumor uptake and retention [9,10].

In the past ten years, PET became the main technique for molecular imaging, because it allows a better image resolution and a more reproducible quantification as compared to SPECT. Parry et al. have demonstrated in mice bearing T-47D xenografts, the possibility to use ^{64}Cu-labeled bombesin analogues to detect breast cancers expressing GRPr [11]. AMBA labeled with ^{68}Ga has been designed for *in vivo* PET imaging of GRPr expressing tumors and has been tested in prostate cancer tumor-bearing male nude mice [12]. Compared with ^{64}Cu, ^{68}Ga has several advantages: daily availability thanks to a commercially available ^{68}Ge/^{68}Ga generator which lasts for one year, a shorter half-life (68 minutes) which simplifies the disposal of wastes of the laboratory, and no β^- emission which may interfere by reducing the tumor growth [13].

The first objective of our study was to assess the possibility to use ^{68}Ga-AMBA as a tracer in a mouse model for the detection of breast cancer expressing GRPr with PET.

2-[^{18}F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose (^{18}F-FDG) is the reference tracer for clinical PET. It is used in humans for imaging various malignancies and mainly for staging advanced breast cancer, monitoring treatment response and restaging recurrence.

* Corresponding author at: Plateforme LIMP, UMS28 Phénotypage du petit animal, UPMC, Paris, France. Tel.:/fax: +33 156017298.
E-mail address: aurelie.prignon@upmc.fr (A. Prignon).

http://dx.doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2014.10.003
0969-8051/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Many new therapeutic approaches are currently developed for the management of breast cancer, which may replace or complement anti-hormone and/or cytolytic agents. Preclinical studies in animal models are important steps to preliminarily assess the efficacy of new therapeutic solutions (e.g. trastuzumab [14] or AKT inhibitors [15]) or their association with existing treatments (anti-hormone or cytolytic agents). ^{18}F-FDG PET allows monitoring the response to a treatment during a long period of time through repeated imaging with no need to sacrifice animals. ^{18}F-FDG PET is consequently a good candidate to assess new treatment efficacy in preclinical studies.

The second objective of this study was to assess the possibility to use ^{68}Ga-AMBA with PET to monitor the time of response of breast cancer cells to hormone therapy as compared to ^{18}F-FDG. For this study a model of hormone-sensitive human breast cancer xenografted in mice was used.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

ZR75-1, an estrogen-receptor expressing cell line derived from a human breast ductal carcinoma, was purchased from ATCC. Cells were cultured in RPMI 1640 with L-Glutamine (Sigma-Aldrich) supplemented with penicillin/streptomycin antibiotics (10 000 U/mL penicillin, 10 000 U/mL streptomycin; P4083 Sigma-Aldrich) and with 10% fetal calf serum (F4135 Sigma-Aldrich). Cells were grown in 175-cm^2 flasks (CellBind Flask, Sigma-Aldrich) at 37 °C in humidified 5% CO_2 atmosphere.

2.2. Animals

Female nude mice (S/SOPF swiss Nu/Nu, Charles River) aged of 5 to 6 weeks were implanted subcutaneously into the neck with pellets of 17β-estradiol (E2) (1.7 mg, 90-day release, Innovative Research of America). Human ZR75-1 cells were grafted in nude mice by subcutaneous inoculation. ZR75-1 cells (8×10^6 cells) in a 1:1 mixture of matrigel (BD Biosciences) and PBS were injected subcutaneously into the right flank, 10 days after pellets implantation. Tumor volume (cm^3) was assessed twice a week using caliper according to the formula: $V = ab^2\pi/6$, where a is the longest and b the shortest of two perpendicular diameters.

2.3. Study design

Comparative initial PET imaging on same mice (^{18}F-FDG #1 n = 10 and ^{68}Ga-AMBA #1 n = 10) was performed on day 11 or 12 after xenograft, at the beginning of tumor growth to verify engraftment.

Pre-treatment PET imaging (^{68}Ga-AMBA #2) was performed on day 25, just before the first injection of tamoxifen or vehicle.

When tumors volume had reached a size of about 0.3 cm^3, animals were randomly assigned to 2 groups, and treatment with tamoxifen was initiated (about 25 days after inoculation of ZR75-1 cells). Animals of the control group (n = 4) received the vehicle alone p.o., consisting of 4% ethanol, 4% polyethylene glycol 600 (Sigma), 0.5% gelatin in normal saline (9 mg/mL NaCl), whereas the animals of the treated group (n = 6) received daily doses of 150 μg tamoxifen citrate (Sigma), using the same vehicle.

^{68}Ga-AMBA #3 PET was performed after one week of treatment. A final comparative PET imaging (^{18}F-FDG #2 and ^{68}Ga-AMBA #4) was performed on days 41 and 42, about 2 weeks after beginning tamoxifen treatment. After the last ^{68}Ga-AMBA imaging, the animals were sacrificed. The general design of the treatment and of PET imaging studies is summarized in Fig. 1.

2.4. Radiolabeling

All chemicals were obtained from chemical sources and used without further purification.

Sodium acetate 2 mol/L was from Hospira (Lake Forest, USA), trace select hydrochloric acid and trace select water were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Trifluoroacetic acid (TFA) was from Supelco (Bellefont, USA). Absolute ethanol was from Prolabo (Briare, France).

AMBA peptide (Mw = 1,503 g/mol) was provided by BRACCO society and was synthesized as previously reported [16]. Frozen vials of AMBA formulation contained 120 μg of anhydrous AMBA and 1 mg of L-selenomethionine (Sabinsa Corp.) in 1 mL of 0.2 mol/L sodium acetate buffer (pH = 4.8).

The radiolabeling of ^{68}Ga-AMBA, previously described by Cagnolini et al. [12], was automated using a R&D Synchrom module (Raytest, Germany). This computer-controlled module has a second reactor, permitting evaporation of the ethanol residue, in order to increase volumic activity which is critical for injection to small animals as mice.

AMBA formulation (120 μg/mL, 8 nmol) buffered with 240 μL of 0.8 mol/L sodium acetate was introduced into the first reactor. ^{68}Ga was available from a ^{68}Ge/^{68}Ga-generator-system, where ^{68}Ge ($t_{1/2}$ 270.8 d) was attached to a column of an inorganic matrix based on titanium dioxide (Eckert & Ziegler, Germany). The ^{68}Ga was eluted with 5 mL of 0.1 mol/L hydrochloric acid by fractionated method. The first fraction of 200 μl was discarded, and the next 1.9 mL containing over 75% of the total radioactivity was collected into the reactor (around 120 MBq).

The reaction mixture (pH = 3) was incubated at 95 °C under agitation for 8 min and then loaded onto a C18 Sep-Pack cartridge (Waters Milford, USA) previously conditioned with 1 mL of ethanol and 2 mL of water. To increase recovery and to remove free ^{68}Ga, both the reactor and the C18 were subsequently rinsed with 2 mL of H_2O. The final product ^{68}Ga-AMBA was eluted into the second reactor using 600 μL of 80% ethanol, which was subsequently evaporated at 60 °C under argon flow then the final product was diluted with 9 mg/mL NaCl.

2.5. Quality control

High-performance liquid chromatography (HPLC) quality control was performed using a Waters breeze system with a 1525 binary pump. Radioactivity was detected with a Berthold radio-HPLC detector. The HPLC mobile phase was a mixture of H_2O 0.1% TFA (A) and acetonitrile 0.1% TFA (B). The HPLC Reverse Phase C18 column (Zorbax bonus, Agilent)

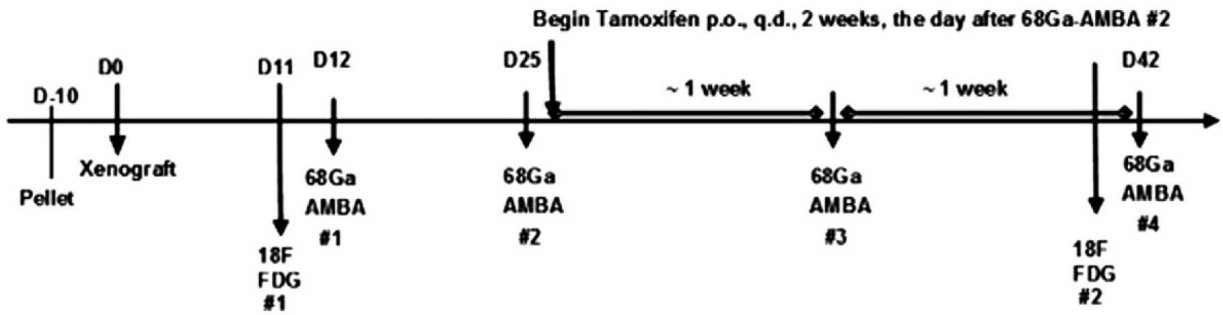


Fig. 1. Design of the study.

was equilibrated at a flow rate of 3 mL/min with 83% A and 17% B; the HPLC gradient was as follows: 0–20 min 60% A, 40% B, (flow 1 mL/min).

2.6. Small-animal PET imaging

All *in vivo* experiments were performed in compliance with the French guidelines for experimental animal studies.

Mice were anesthetized with a mixture of 1.5% isoflurane and oxygen. PET acquisitions were performed with the mosaic animal PET machine (Philips Medical systems, Cleveland, OH, USA).

For ^{18}F-FDG (CisBio, France) PET, after a fasting period of 12 hours, mice were injected i.v. in the retro-orbital sinus with mean activity ± SD of 5.8 ± 1.8 MBq and were imaged one hour later.

For ^{68}Ga-AMBA PET, animals were injected with 2.1 ± 1.6 MBq of ^{68}Ga-AMBA (corresponding peptide quantity ranging from 400 to 710 pmol). Dynamic acquisitions were performed independently on separate animals during one hour in order to define optimal tumor uptake.

Static acquisitions were performed 45 min after injection with an exposure time of 10 minutes.

Images were reconstructed, and data were analyzed using PETView and Syntegra–Philips software (PETView; Philips Medical Systems). Tracer uptake was quantified using maximum standardized uptake value (SUVmax, in g/mL). SUVmax = maximal volumic activity in the tumor (Bq/mL) × body weight (g)/injected activity (Bq).

Data are expressed as mean tumor to non-tumor uptake ratios ± SD; "non-tumor" represents background close to the tumor area.

2.7. Ex vivo biodistribution studies

After the final PET imaging with ^{68}Ga-AMBA, mice were sacrificed by cervical dislocation one hour after injection for determining *ex vivo* biodistribution. Blood and different organs were collected and weighted, and radioactivity uptake was measured in a gamma well-counter (1480 Wizard 3, Perkin Elmer). Tissue radioactivity was corrected for the decay of the radionuclide. Tumor and normal tissue uptakes were expressed as mean ± SEM percentage injected dose/gram (% ID/g). Tumor to blood and tumor to kidney ratios were calculated.

2.8. Statistical analysis

Comparisons of the tumor volume and uptake of ^{18}F-FDG and ^{68}Ga-AMBA were performed using t test for independent or for paired samples, accordingly. Level of significance was $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Radiolabeling of ^{68}Ga-AMBA

AMBA radiolabeling was performed before each series of PET imaging (^{68}Ga-AMBA#1; ^{68}Ga-AMBA#2; ^{68}Ga-AMBA#3; ^{68}Ga-AMBA#4). The overall decay-corrected radiochemical yield was 95.3 ± 0.8%. The mean time of the entire labeling procedure was approximately 30 min including the evaporation step. Using analytical HPLC, the radiochemical purity after purification of the reaction mixture was ≥ 98%. Retention times were 8.7 min for AMBA and 8.9 min for ^{68}Ga-AMBA. A specific activity of 9.3 ± 1.5 MBq/nmol peptide was achieved (n = 4 radiolabeling procedures), calculated from the decay-corrected added activity of ^{68}Ga divided by the amount of AMBA ligand.

3.2. Comparative PET imaging of initial tumor growth

From an initial sample of 15 mice, we eliminated 5 mice from the study, because they did not develop tumor, due to a technical failure with implantation of estrogen. When ^{18}F-FDG #1 and ^{68}Ga-AMBA #1 initial PET imaging was performed, the average tumor volume reached 140 ± 80 mm^3.

Dynamic PET acquisition has clearly shown that the optimal tumor uptake of ^{68}Ga-AMBA was around 45 minutes post injection.

All ZR75-1 tumors were clearly visualized on ^{68}Ga-AMBA PET static acquisitions. Significant uptake was visualized in tumors as well as both in GRPr-positive pancreas tissue and in organs responsible for elimination (kidneys and bladder), while it was low in other organs.

These small sized tumors were hardly visible with ^{18}F-FDG, with a SUVmax in tumors only slightly higher than SUVmax in the background (0.9 ± 0.2 vs. 0.7 ± 0.1 respectively).

Uptake ratio of ^{68}Ga-AMBA in ZR75-1 tumor was twice higher than that of ^{18}F-FDG (2.4 ± 0.5 vs. 1.3 ± 0.3 respectively; $p < 0.001$; Fig. 2).

3.3. Effect of tamoxifen treatment on tumor volume

No mouse receiving tamoxifen treatment presented adverse effects that precluded the continuation of the study.

Tamoxifen treatment began 26 days after xenograft, when tumor volume was about 0.3 ± 0.1 cm^3. After one week, average tumor volume was smaller in the tamoxifen treated group (n = 6) than in the control group (n = 4) (0.4 ± 0.2 cm^3 vs. 0.7 ± 0.3 cm^3 respectively), the difference becoming statistically significant after 2 weeks (0.3 ± 0.2 cm^3 vs. 0.8 ± 0.3 cm^3, $^*p < 0.05$, Fig. 3). In addition, when comparing the day-26 tumor volume to 2-weeks tumor volume, there was a significant increase in the control group, whereas no significant variation was noted in treated mice. (+ $p < 0.01$, Fig. 3).

3.4. Effect of tamoxifen treatment on tumor uptake of ^{68}Ga-AMBA

The response to tamoxifen treatment in ZR75-1 breast tumor-bearing nude mice was assessed by serial imaging using ^{68}Ga-AMBA. ^{68}Ga-AMBA#2 was performed on the day before starting the treatment and corresponded to pre-treatment reference. Tumor to non-tumor ratio was 5.4 ± 2.1 cm^3 in the group scheduled for tamoxifen treatment (n = 6), not different from 5.9 ± 3.2 cm^3 in the control group (n = 4). ^{68}Ga-AMBA#3 was performed after one week of treatment. A statistically significant difference was observed between tamoxifen treated and control mice, with tumor to non-tumor ratio of 4.8 ± 1.9 and 7.5 ± 0.6 respectively ($p = 0.02$). This difference between mean values was increased on ^{68}Ga-AMBA#4 imaging, after 2 weeks of treatment with a tumor to non-tumor ratio of 4.4 ± 2.1 for the treated group compared to 9.6 ± 3.3 in the control group ($p = 0.04$, Fig. 4).

3.5. Comparison of ^{18}F-FDG and ^{68}Ga-AMBA PET at the end of treatment

After 2 weeks of tamoxifen treatment, ^{18}F-FDG #2 was performed to monitor tumor metabolic response to hormone therapy, in comparison with ^{68}Ga-AMBA#4 which was performed on the next day.

On ^{18}F-FDG #2 PET, very low uptake was observed in the tumor with poor contrast to the background (as on the initial ^{18}F-FDG #1). There was no difference between the two groups with ^{18}F-FDG tumor to non-tumor ratio of 1.2 ± 0.3 in tamoxifen treated mice vs. 1.4 ± 0.3 in control group.

In contrast, the effect of the treatment on tumor uptake of ^{68}Ga-AMBA was striking, as mentioned above and illustrated on Fig. 5.

3.6. Ex vivo biodistribution of ^{68}Ga-AMBA in ZR75-1 human breast cancer xenograft models

Table 1 and Fig. 6 show the *ex vivo* biodistribution of ^{68}Ga-AMBA 60 min after injection in tamoxifen-treated or in control nude mice.

^{68}Ga-AMBA was accumulated by the ZR75-1 xenografts. Average ZR75-1 uptake of ^{68}Ga-AMBA in control mice was 12 ± 2.8% ID/g whereas it was 6 ± 1.2% ID/g in tamoxifen treated mice ($p = 0.12$). As it was expected using GRPr-based tracers, the uptake of ^{68}Ga-AMBA was high in the pancreas (23.9 ± 3.8 and 17.3 ± 2.7% ID/g in control and tamoxifen-treated group respectively) consistent with findings

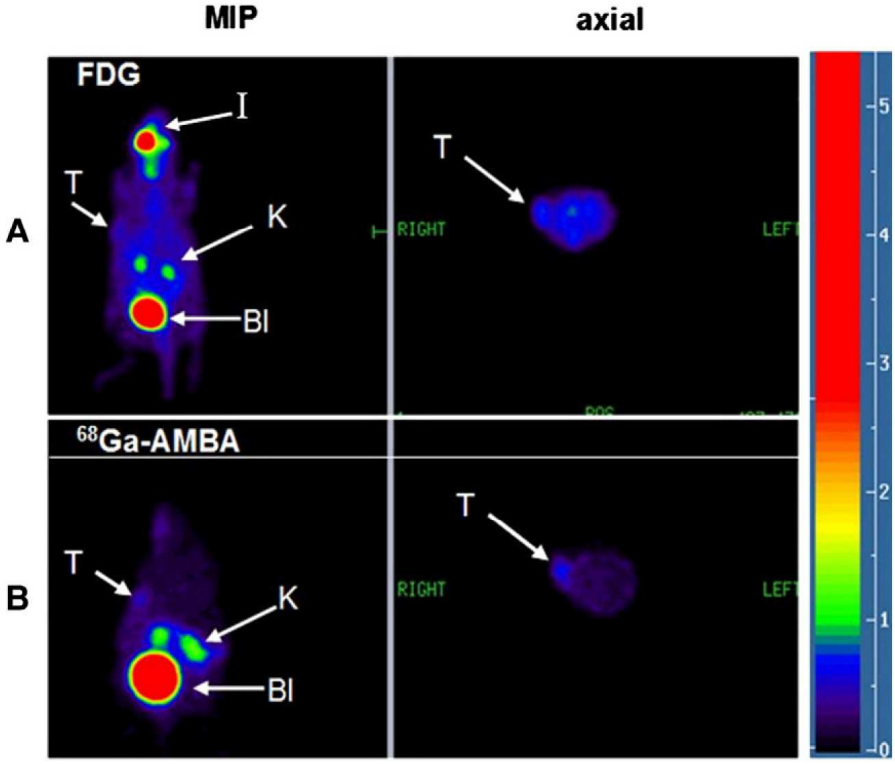


Fig. 2. Initial imaging, comparison of ^{18}F-FDG#1 and ^{68}Ga-AMBA#1. Typical PET imaging (maximum intensity pixel (MIP) and axial slices) of the same female nude mouse, grafted with ZR75-1 cells in the right flank, injected with 6 MBq of ^{18}F-FDG (A) or 24 h later with 5.4 MBq of ^{68}Ga-AMBA (B). Imaging was performed 10 (A) or 11 (B) days after cell grafting. Tumor volume was 0.15 cm^3. The acquisition started 45 min post injection for ^{68}Ga-AMBA or 60 min for ^{18}F-FDG and lasted 10 min. Bl: bladder. K: kidney. T: tumor. I: injection.

on PET imaging. The kidneys also accumulated ^{68}Ga-AMBA but to a lesser extent (3.8 ± 0.6 and 3.6 ± 0.6 in control group and tamoxifen-treated group respectively) (Table 1).

4. Discussion

The imaging of estrogen-dependant human breast cancer using ^{68}Ga-labeled bombesin or ^{64}Cu-labeled bombesin derivates with PET has been described in different studies [11,17,18]. These studies reported high quality small-animal PET imaging of GRPr-positive breast cancer xenografted tumors in mice with an *ex vivo* uptake by the tumor at 1 h post-injection ranging between 2.27 and 4.6% ID/g.

As ^{68}Ga has several advantages compared to ^{64}Cu, the first objective of the study was to assess if AMBA, one of bombesin analogs, could be easily labeled with ^{68}Ga and used as a tracer for PET detection of GRPr-expressing breast cancer in mouse model. The use of ^{68}Ga-AMBA has been previously reported only in mice bearing human prostate cancer models, PC3 or VCaP [12,19].

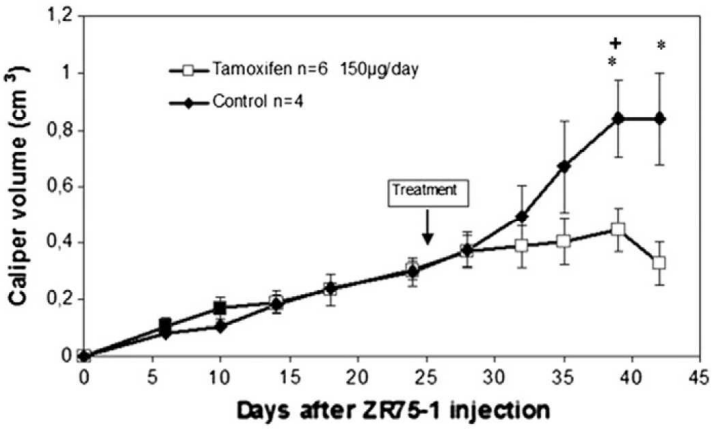


Fig. 3. Tumor growth. ZR75-1 tumor volume measured every 3–4 days by caliper before and after tamoxifen treatment. *$p < 0.05$, +$p < 0.01$.

AMBA was radiolabeled with ^{68}Ga in our laboratory with the automatic Raytest module with good decay-corrected yields, up to 95%, and high radiochemical purity > 98%. Cagnolini et al. obtained a similar purity level with the automated radiolabeling of ^{68}Ga-AMBA using a Tracerlab synthesizer (GE Healthcare). AMBA labeling and purification proved to be versatile, leading to satisfying results in different laboratories with different labeling systems.

In this study, we used a model of estrogen-dependant human breast cancer, ZR75-1, which grows slowly and requires the implantation of estrogen pellets. This model is based on a human cell line, so it could

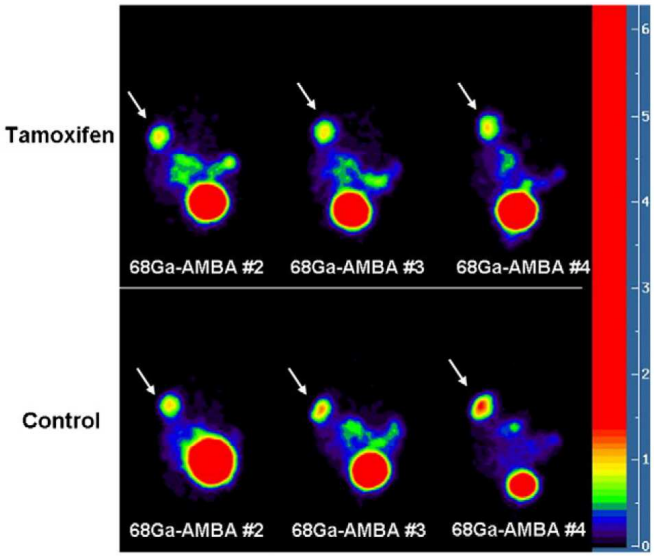


Fig. 4. Response of ZR75-1 breast tumor to tamoxifen treatment reflected by serial imaging using ^{68}Ga-AMBA. Whole-body coronal ^{68}Ga-AMBA microPET images of two nude mice bearing ZR75-1 breast cancer, one control mouse and one tamoxifen treated mouse, obtained 45 min after intravenous injection (2–2.5 MBq per mouse). ^{68}Ga-AMBA #2: before tamoxifen treatment; ^{68}Ga-AMBA #3: after one week of tamoxifen treatment; ^{68}Ga-AMBA #4: after two weeks of tamoxifen treatment. Arrows are pointing to the tumors.

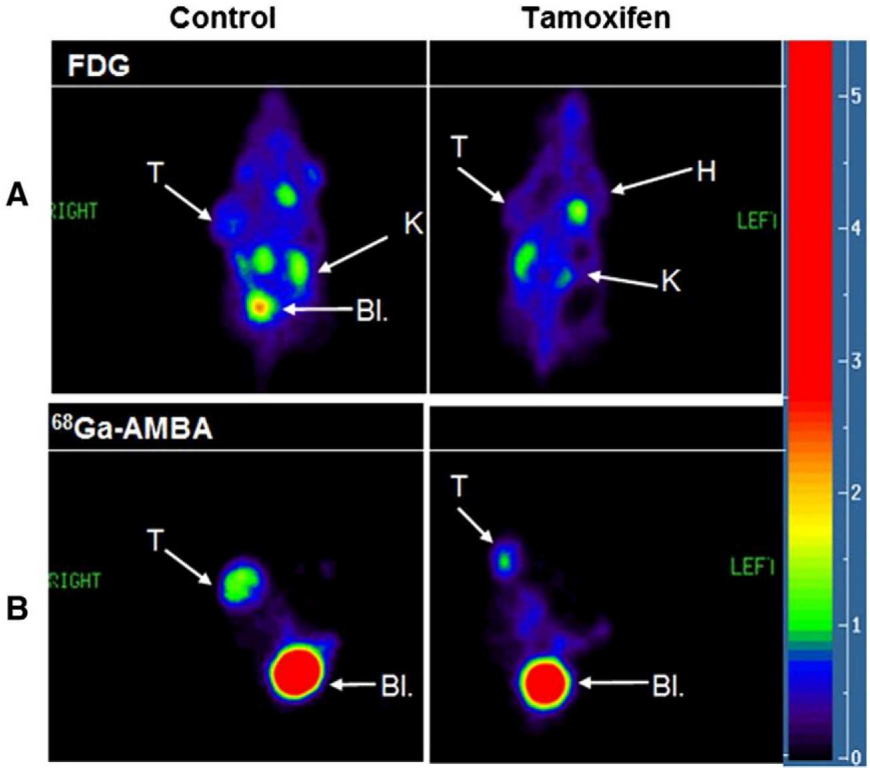


Fig. 5. Comparison of tracer uptake at the end of tamoxifen treatment. Comparative PET imaging of the same control mouse and of the same tamoxifen treated mouse, injected with 5–5.5 MBq ^{18}F-FDG (A) or with 2.2–2.5 MBq of ^{68}Ga-AMBA (B) on the next day. Imaging was performed 1 month after cell grafting. Tumor volumes were 0.95 cm^3 and 0.55 cm^3 for the control mouse and for the treated mouse respectively. Coronal slices Bl: bladder. H: heart. K: kidney. T: tumor.

be considered as closer to human hormone-dependent cancers compared to other models based on mice cell lines [20,21]. Today, 70% of all human breast cancers are estrogen receptor (ER) positive and, thus, potentially sensitive to hormone therapies, this makes relevant the choice of a hormone-dependent model. This tumor model had already been used to study the antitumor effect of antiestrogen drugs [22]. There are very few data available reporting the use of PET with ^{18}F-FDG to visualize ZR75-1 tumor. Lin et al. observed really low uptake by the tumor [23], as in our present study. In contrast, in our model, visualization of the tumor was clearly achieved with ^{68}Ga-AMBA PET imaging 45 min after injection while the average tumor mass was as low as 0.15 cm^3. This demonstrates that ^{68}Ga-AMBA was more effective than ^{18}F-FDG to reflect tumor viability.

The pattern of organ uptake of ^{68}Ga-AMBA (Table 1) was similar in our study to previously published results [12,19]. The highest accumulation of ^{68}Ga-AMBA was observed in the pancreas in accordance with the high expression of GRP receptors (GRPrs) in this organ. Thus, the accumulation of ^{68}Ga-AMBA in the pancreas directly reflects the efficacy of the radiolabeled bombesin analogue to target cell-surface-expressed GRPrs *in vivo*. In the present study, ^{68}Ga-AMBA uptake was 12% ID/g in the ZR75-1 tumor, whereas it was less intense in PC3 tumors with 4.85% ID/g [12] and in VCaP 9.5% ID/g [19].

Table 1
Ex vivo biodistribution data of ^{68}Ga-AMBA.

Tissue	Control		Tamoxifen	
N° subjects	4		6	
Average uptake ± SEM (% injected dose/g)	% ID/g	±SEM	% ID/g	±SEM
Blood	0.73	0.17	0.73	0.23
Heart	0.50	0.16	0.40	0.07
Lung	0.48	0.18	0.39	0.07
Liver	0.72	0.23	0.60	0.12
Spleen	0.78	0.12	1.18	0.59
Kidneys	3.80	0.63	3.61	0.61
Tumor	12.00	2.85	6.01	1.22
Pancreas	23.96	3.85	17.29	2.73
Stomach	0.87	0.19	0.86	0.36
Intestine	1.61	0.41	2.25	0.94
Tumor/Blood	17.36	2.78	10.83	2.56
Tumor/Kidneys	3.28	0.40	1.76	0.29

The second objective of this study was to assess the possibility to use ^{68}Ga-AMBA with PET imaging to monitor the time of response of breast cancer cells to hormone therapy with tamoxifen in a model of hormone-sensitive human breast cancer xenografted in mice and to compare to ^{18}F-FDG.

^{18}F-FDG is the most widely used tumor PET tracer in clinical oncology for therapy efficacy monitoring. However, in preclinical PET imaging, ^{18}F-FDG has some limits, including physiological uptake in some organs (brain, heart and brown fat), relative low tumor uptake and contrast as compared to non-tumor background, even prior the treatment. With ^{18}F-FDG, we observed in the ZR75-1 model, a mean uptake ratio of only 1.3 prior to treatment and 1.2 in the treated group compared to 1.4 in the control group at the end of the treatment. Thus, it was not possible to assess the therapy efficacy with ^{18}F-FDG, which is in accordance with Lin et al results [23]. In their study, ^{18}F-FDG imaging was not able to demonstrate the inhibition of ZR75-1 tumor growth by ganciclovir therapy, because the uptake of ^{18}F-FDG by the tumor after the therapy was not different from the one observed before the therapy initiation.

Aliaga et al. [24] also investigated the feasibility of using small-animal PET to analyse tumor metabolism and response to chemo- or hormone therapies in a mouse ER positive breast cancer model. They observed that the uptake of FDG can vary significantly within the first two weeks after the initiation of the therapy, with a fairly systematic transient increase observed after seven days.

In contrast in our study, serial PET imaging using ^{68}Ga-AMBA brought into evidence a statistically significant reduction of uptake in response to tamoxifen treatment in ZR75-1 breast tumor-bearing nude mice, after only one week of treatment. ^{68}Ga-AMBA uptake seems to be used as an early predictive marker of the decrease of the tumor volume when treated with hormone therapy. To our knowledge,

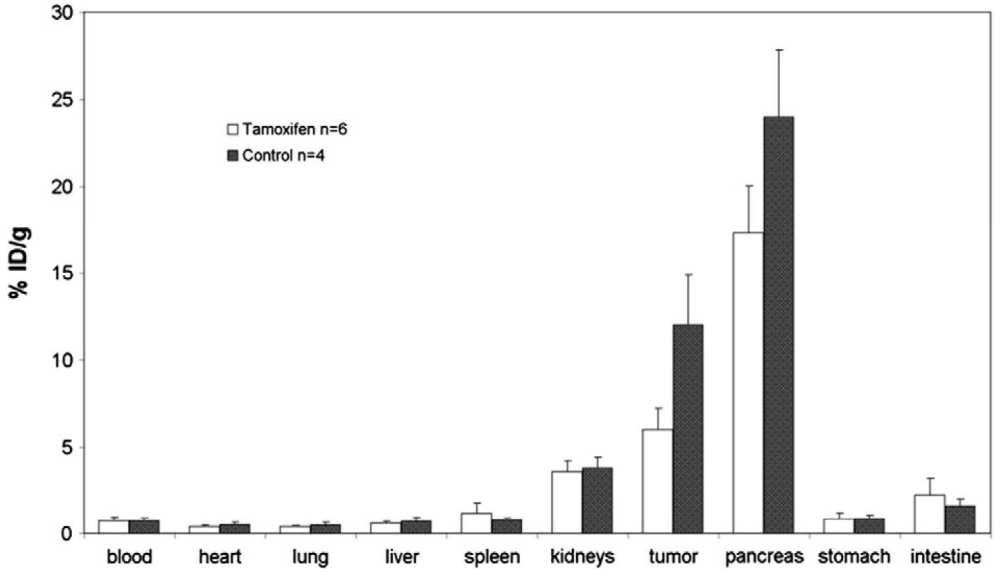


Fig. 6. *Ex vivo* biodistribution of ^{68}Ga-AMBA. Organ uptake after retro-orbitrary injection of ^{68}Ga-AMBA (430 ± 9 pmol and 2.14 ± 0.56 MBq) in ZR75-1 bearing mice. *Ex vivo* biodistribution was determined 1 hour after injection of ^{68}Ga-AMBA. The results are expressed as mean ± SEM percentage of injected dose per gram of tissue in 4–6 mice per group.

no other experiment of treatment monitoring in tumor models has been reported using bombesin derivates and PET.

We can question about the reduced ^{68}Ga-AMBA uptake in the tamoxifen treated group. One possible explanation is the reduction of the whole metabolic machinery activity of tumor cells due to the lack of stimulation via estrogen receptors. Another way is the possible coupling of the estrogen and the gastrin-releasing peptide receptors as reported by Nagasaki et al. in prostate cancer [25].

In summary, in our mouse tumor model of hormone-sensitive breast cancer, ^{68}Ga-AMBA, an agonist ligand of the gastrin-releasing peptide receptor, evidenced high tumor uptake and low background in normal organs except in the pancreas. With PET, tumors were clearly visualized with ^{68}Ga-AMBA, while ^{18} F-FDG uptake was low and the tumor hardly visible over background. We also observed that the evolution of ^{68}Ga-AMBA uptake could be used as an early predictive marker of the decrease of the tumor volume when treated with hormone therapy. In contrast, ^{18} F-FDG PET was neither able to predict nor monitor tumor response to a treatment.

Acknowledgments

The authors greatly acknowledge Sophie Massicot and Pr. Lacave for editing the manuscript. This work was supported by a research agreement between BRACCO Research USA INC. and University Pierre et Marie Curie (Paris 6). The authors have no competing financial interest to declare.

References

[1] Fani M, Maecke HR. Radiopharmaceutical development of radiolabelled peptides. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2012;39(Suppl 1):S11–30.
[2] Giladi E, Nagalla SR, Spindel ER. Molecular cloning and characterization of receptors for the mammalian bombesin-like peptides. J Mol Neurosci 1993;4:41–54.
[3] Markwalder R, Reubi JC. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. Cancer Res 1999;59:1152–9.
[4] Sun B, Halmos G, Schally AV, Wang X, Martinez M. Presence of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide and mRNA for three receptor subtypes in human prostate cancers. Prostate 2000;42:295–303.
[5] Halmos G, Wittliff JL, Schally AV. Characterization of bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in human breast cancer and their relationship to steroid receptor expression. Cancer Res 1995;55:280–7.
[6] Gugger M, Reubi JC. Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. Am J Pathol 1999;155:2067–76.
[7] Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fischler A, et al. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. Nature 1985;316:823–6.
[8] Reubi JC, Korner M, Waser B, Mazzucchelli L, Guillou L. High expression of peptide receptors as a novel target in gastrointestinal stromal tumours. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2004;31:803–10.
[9] Schroeder RP, Muller C, Reneman S, Melis ML, Breeman WA, de Blois E, et al. A standardised study to compare prostate cancer targeting efficacy of five radiolabelled bombesin analogues. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2010;37:1386–96.
[10] Linder KE, Metcalfe E, Arunachalam T, Chen J, Eaton SM, Feng W, et al. In vitro and in vivo metabolism of Lu-AMBA, a GRP-receptor binding compound, and the synthesis and characterization of its metabolites. Bioconjug Chem 2009;20:1171–8.
[11] Parry JJ, Andrews R, Rogers BE. MicroPET imaging of breast cancer using radiolabeled bombesin analogs targeting the gastrin-releasing peptide receptor. Breast Cancer Res Treat 2007;101:175–83.
[12] Cagnolini A, Chen J, Ramos K, Skedzielewski TM, Lantry LE, Nunn AD, 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 2010;68:2285–92.
[13] Velikyan I. Positron emitting [68Ga]Ga-based imaging agents: chemistry and diversity. Med Chem 2011;7:345–79.
[14] Smith TA, Appleyard MV, Sharp S, Fleming IN, Murray K, Thompson AM. Response to trastuzumab by HER2 expressing breast tumour xenografts is accompanied by decreased Hexokinase II, glut1 and [18 F]-FDG incorporation and changes in 31P-NMR-detectable phosphomonoesters. Cancer Chemother Pharmacol 2013;71:473–80.
[15] Maynard J, Ricketts SA, Gendrin C, Dudley P, Davies BR. 2-deoxy-2-[18 F]fluoro-D-glucose positron emission tomography demonstrates target inhibition with the potential to predict anti-tumour activity following treatment with the AKT inhibitor AZD5363. Mol Imaging Biol 2013;15:476–85.
[16] Maddalena ME, Fox J, Chen J, Feng W, Cagnolini A, Linder KE, et al. 177Lu-AMBA biodistribution, radiotherapeutic efficacy, imaging, and autoradiography in prostate cancer models with low GRP-R expression. J Nucl Med 2009;50:2017–24.
[17] Fournier P, Dumulon-Perreault V, Ait-Mohand S, Tremblay S, Benard F, Lecomte R, et al. Novel radiolabeled peptides for breast and prostate tumor PET imaging: (64)Cu/and (68)Ga/NOTA-PEG-[D-Tyr(6), betaAla(11), Thi(13), Nle(14)]BBN(6–14). Bioconjug Chem 2012;23:1687–93.
[18] Prasanphanich AF, Retzloff L, Lane SR, Nanda PK, Sieckman GL, Rold TL, et al. In vitro and in vivo analysis of [(64)Cu-NO2A-8-Aoc-BBN(7-14)NH(2)]: a site-directed radiopharmaceutical for positron-emission tomography imaging of T-47D human breast cancer tumors. Nucl Med Biol 2009;36:171–81.
[19] Schroeder RP, van Weerden WM, Krenning EP, Bangma CH, Berndsen S, Grievink-de Ligt CH, et al. Gastrin-releasing peptide receptor-based targeting using bombesin analogues is superior to metabolism-based targeting using choline for in vivo imaging of human prostate cancer xenografts. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2011;38:1257–66.
[20] Paquette M, Ouellet R, Archambault M, Croteau E, Lecomte R, Benard F. [18 F]-fluoroestradiol quantitative PET imaging to differentiate ER + and ERalpha-knockdown breast tumors in mice. Nucl Med Biol 2012;39:57–64.
[21] Paquette M, Tremblay S, Benard F, Lecomte R. Quantitative hormone therapy follow-up in an ER+/ERalphaKD mouse tumor model using FDG and [11C]-methionine PET imaging. EJNMMI Res 2012;2:61.
[22] Kristensen CA, Hamberg LM, Hunter GJ, Roberge S, Kierstead D, Wolf GL, et al. Changes in vascularization of human breast cancer xenografts responding to antiestrogen therapy. Neoplasia 1999;1:518–25.
[23] Lin KM, Hsu CH, Chang WS, Chen CT, Lee TW, Chen CT. Human breast tumor cells express multimodal imaging reporter genes. Mol Imaging Biol 2008;10:253–63.

[24] Aliaga A, Rousseau JA, Cadorette J, Croteau E, van Lier JE, Lecomte R, et al. A small animal positron emission tomography study of the effect of chemotherapy and hormonal therapy on the uptake of 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose in murine models of breast cancer. Mol Imaging Biol 2007;9:144–50.

[25] Nagasaki S, Nakamura Y, Maekawa T, Akahira J, Miki Y, Suzuki T, et al. Immunohistochemical analysis of gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) and possible regulation by estrogen receptor betacx in human prostate carcinoma. Neoplasma 2012; 59:224–32.

Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France

X.3. Discussion

Le marquage de l'AMBA avec du gallium-68 a permis d'obtenir de très bons rendements de marquage ainsi qu'une grande pureté radiochimique > 98% selon les conditions décrites par Cagnolini et al (Cagnolini *et al.*, 2010) montrant la reproductibilité du marquage conduisant à des résultats satisfaisants dans différents laboratoires avec différents modules automatisés (R&D system de Raytest versus Tracerlab de GE Healthcare).

Nous avons utilisé un modèle de cancer du sein humain dépendant des œstrogènes (ER +) et exprimant le GRPR, la lignée ZR75-1, que nous avons greffée en sous-cutané et qui s'est développé lentement chez la souris et a nécessité l'implantation de pilules d'œstrogènes. Ce modèle est plus représentatif d'un cancer du sein humain hormono-dépendant que les lignées cellulaires murines, qui ont été utilisées dans d'autres études d'imagerie (Paquette *et al.*, 2012a, Paquette *et al.*, 2012b).

L'imagerie TEP au ^{18}F-FDG réalisée lorsque les tumeurs étaient de petite taille ne nous a pas permis de bien les distinguer du bruit de fond adjacent, le SUVmax dans la tumeur était seulement légèrement supérieur à celui de l'arrière-plan (0,9 ± 0,2 vs 0,7 ± 0,1 respectivement), probablement reflétant le faible métabolisme glucidique de ce modèle décrit comme luminal A (Subik *et al.*, 2010).

Le ^{18}F-FDG est le traceur TEP tumoral le plus utilisé en oncologie clinique pour le suivi thérapeutique. Cependant, en imagerie TEP préclinique, le ^{18}F-FDG présente certains inconvénients, dont la fixation physiologique dans différents organes (cerveau, coeur, graisse brune) et une fixation tumorale relativement faible suivant la consommation en glucose de certaines lignées greffées chez la souris (K. M. Lin *et al.*, 2008) assez peu représentatives du cancer primitif chez la patiente. De plus, chez le petit animal, l'obtention de mesures reproductibles en ^{18}F-FDG est parfois délicate et nécessite la mise en place de protocoles précis de préparation des animaux. Des études antérieures ont souligné l'importance d'une manipulation méticuleuse des animaux pour atteindre des conditions optimales de mesure. Il a été démontré que le jeûne avant l'imagerie TEP et le réchauffement des souris avant et après l'injection du ^{18}F-FDG sont cruciaux (Fueger *et al.*, 2006) et que des facteurs tels que la température et le type d'anesthésie peuvent jouer sur la glycémie et donc sur la cinétique et la captation tumorale du ^{18}F-FDG (Fueger *et al.*, 2006, Lee *et al.*, 2005) nuisant ainsi considérablement à la qualité de l'image TEP et aux résultats de l'analyse (Wahl *et al.*, 1992).

Une seule équipe avait utilisé l'imagerie TEP au ^{18}F-FDG pour visualiser des xénogreffes tumorales issues de la lignée ZR75-1 et avait observé comme nous, une très faible captation tumorale (K. M. Lin *et al.*, 2008). En revanche, l'imagerie TEP réalisée avec le ^{68}Ga-AMBA a permis la détection d'une très petite tumeur (0,15 cm3) seulement 45 min après injection du radiotraceur.

Deux équipes ont utilisés des agonistes de la bombésine marqués au cuivre-64 et ont montré en imagerie TEP une accumulation et une rétention de ces traceurs dans des modèles de souris immunodéficientes porteuses de xénogreffes de cancer du sein humain dépendant des œstrogènes (T47D) une fixation *ex-vivo* par la tumeur à 1h post-injection comprise entre 2,27 et 4,6% ID / g mais aussi une fixation non spécifique importante dans les organes non cibles (foie, intestins) et une fixation spécifique attendue dans le pancréas (Parry *et al.*, 2007) (Prasanphanich *et al.*, 2009).
Le foie étant le premier viscère par les métastases dans le cancer du sein, les équipes s'intéressant aux radiotraceurs de type bombésine pour cette application ont voulu diminuer leur captation hépatique, démontrée pour beaucoup de ces analogues. Elles ont choisi d'introduire des groupements espaceurs de type PEG pour diminuer le caractère lipophilique du traceur et favoriser son élimination par voie rénale au lieu d'hépatique.
Ainsi, l'équipe de Fournier et al. (Fournier *et al.*, 2012) a comparé la biodistribution et les images TEP d'un agoniste de la BN marqué au gallium 68 ou au cuivre 64 dans les mêmes modèles de xénogreffes tumorales T47D. Leur étude a démontré que le ^{68}Ga/NOTA-PEG-BBN(6−14) permettait de détecter les tumeurs (environ 4%ID/g *ex vivo*, 30min après injection) de manière identique au ^{64}Cu/NOTA-PEG-BBN(6−14) mais avec captation plus faible dans les organes de la souris exprimant le GRPR, c'est-à-dire le pancréas et les glandes surrénales. Le ^{68}Ga présente plusieurs avantages par rapport au ^{64}Cu: une disponibilité quotidienne grâce au générateur ^{68}Ge / ^{68}Ga qui dure un an, une demi-vie plus courte qui facilite grandement l'élimination des déchets du laboratoire. Néanmoins, malgré l'introduction de PEG dans la molècule, leur traceur présentait tout de même encore une forte accumulation de la radioactivité dans le foie de l'ordre de 6,29%ID/g pour le ^{68}Ga/NOTA-PEG-BBN(6−14) ainsi qu'une clairance sanguine faible avec 2.97%ID/g de radiotraceur encore présent 30 min après injection.

Varasteh et al. ont également introduit un PEG sur un antagoniste de la bombésine. Des images TEP (2 h p.i.) ont été réalisées avec ce traceur, ^{68}Ga-NOTA-PEG3-RM26, chez des souris nude porteuses de xénogreffes d'un autre cancer du sein dépendant des œstrogènes (BT-474) Les tumeurs ont été clairement visualisées, mais de la même manière que pour le traceur précédent une accumulation de la radioactivité a été détectée dans les reins et la région abdominale (Varasteh *et al.*, 2014).

Nos résultats d'imagerie TEP et de biodistribution *ex vivo* obtenus 1h après injection du ^{68}Ga-AMBA sont en accord avec ceux rapportés précédemment dans des modèles de cancer de la prostate humain, PC3 ou VCaP (Linder *et al.*, 2009, R. P. Schroeder *et al.*, 2011) avec une captation comparable dans les organes non cibles, presque nulle dans le foie, une captation dans le pancréas

attendue du fait de l'expression d'une densité élevée de GRPR accessibles à la circulation sanguine, de respectivement 18,9 % ID/g et 57,5 % ID/g pour les études précédentes et de 23,9 %ID/g pour nous. En revanche, la captation tumorale était de 12 % ID/g dans la tumeur ZR75-1, alors qu'elle était plus faible dans les tumeurs PC3 4,85 % ID/g ou VCaP 9,5% ID/g.

Le second objectif de cette étude était de déterminer si le ^{68}Ga-AMBA pouvait être utilisé en TEP pour suivre la réponse du cancer du sein à l'hormonothérapie au tamoxifène et de comparer ses performances avec celles du ^{18}F-FDG.

Etant donné sa faible captation tumorale, le ^{18}F-FDG ne nous a pas permis de suivre l'effet du traitement au tamoxifène sur les tumeurs ZR75-1. En revanche, l'imagerie TEP en série utilisant le ^{68}Ga-AMBA a mis en évidence une réponse statistiquement significative du traitement au tamoxifène dans ces tumeurs, après seulement une semaine de traitement, avant même que l'effet du traitement soit visible sur le volume tumoral mesuré au pied à coulisse.

Le GRPR n'est pas une cible connue du tamoxifène, son degré d'expression semble pourtant refléter la réponse thérapeutique d'une tumeur humaine dépendante des oestrogènes. L'imagerie TEP à l'aide du ^{68}Ga-AMBA est donc un bon outil d'imagerie non invasive qui peut permettre de suivre de nouveaux traitements ou combinaison de traitements en phase de développement préclinique.

Ces résultats indiquent aussi que les changements quantitatifs de la fixation du ^{68}Ga-AMBA par le tissu tumoral pourraient être un marqueur prédictif précoce des patientes répondeuses à une hormonothérapie dans le cancer du sein ER +.

Une des hypothèses que nous avons avancée est que la diminution de l'expression du GRPR pourrait refléter simplement une diminution de l'activité métabolique générale des cellules tumorales, en conséquence de l'absence de stimulation des récepteurs aux œstrogènes.

Une autre hypothèse est qu'il pourrait exister un lien entre les voies de signalisation cellulaire des récepteurs aux estrogènes et ceux du GRP, peptide responsable de la libération de la gastrine. Nous avions trouvé une seule publication suggérant une interaction possible entre GRPR et ER: Nagasaki et al. suggéraient que ERβcx (l'un des variants d'ERβ, considéré comme facteur pronostique du cancer de la prostate) contribue au développement du cancer de la prostate par l'expression de GRPR dans les cellules carcinomateuses (Nagasaki *et al.*, 2012). Depuis, la littérature décrivant un possible lien entre l'expression du GRPR et celle des estrogènes a considérablement augmenté. Dalm et al. en 2015 ont constaté que 96% de leurs échantillons de tumeurs mammaires tous sous-types confondus (48/50) exprimaient le GRPR et ont trouvé une très forte corrélation entre le statut ER+ et l'expression du GRPR.

Dans une étude plus récente réalisée par Morgat et al. (Morgat *et al.*, 2017), l'analyse de tissue-micro-array de 1432 tumeurs du sein a révélée qu'environ 90% des tumeurs sont positives pour le GRPR. 75,8% présentaient une surexpression, très souvent associée à la positivité des récepteurs aux œstrogènes (83,2% des tumeurs ER-positives étaient GRPR+). Lorsque les sous-types moléculaires du cancer du sein étaient considérés, le GRPR était surexprimé dans 86,2% des tumeurs de type luminal A, 70,5% des luminales B HER2 négatives, 82,8% de luminal B HER2 positives, 21,3% des tumeurs HER2 + et 7,8% des tumeurs triple-négatives.

Les patientes atteintes de cancer du sein ER+ seraient donc un groupe cible potentiel pour l'imagerie ou la thérapie avec des radioligands GRPR.

XI. Analogues de la neurotensine portant le DOTA

XI.1. Introduction

Comme nous l'avons vu ci-dessus, plusieurs cancers surexpriment des récepteurs de la neurotensine de type 1 par rapport aux tissus normaux : certaines tumeurs de la tête et du cou, 65% des sarcomes d'Ewing (J. C. Reubi *et al.*, 1999), 76% des cancers colorectaux (Gui *et al.*, 2008), 90% des mésothéliomes malins (Alifano *et al.*, 2010a), 60% des cancers du poumon non à petites cellules de stade 1 (Alifano *et al.*, 2010b), 91% des cancers canalaires du sein invasif (S. Dupouy *et al.*, 2009), 75 à 88% des adénocarcinomes pancréatiques (J. C. Reubi *et al.*, 1998). Dans les cancers de la prostate l'expression du NTR1 varie selon le stade de différenciation tumorale, cette expression étant plus importante dans les adénocarcinomes que dans les adénomes prostatiques bénins (Swift *et al.*, 2010).

Un radiopharmaceutique ciblant le NTR1 serait donc un outil potentiel pour le diagnostic ou la thérapie de toutes ces tumeurs. C'est pourquoi, l'équipe du Dr. Gruaz-Guyon s'est intéressée au développement de nouveaux ligands analogues de la NT couplés à des chélatants de type polyaminopolycarboxyliques tels que le DTPA ou le DOTA destinés à l'imagerie voir à la radiothérapie ciblée.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le DTPA et le DOTA sont bien adaptés au marquage avec des radiométaux permettant différentes applications d'imagerie TEMP ou TEP ou de radiothérapie ciblée, comme le montre les succès obtenus avec des analogues de la somatostatine radiomarqués avec l'^{111}In, le ^{68}Ga, l' ^{90}Y, ou le ^{177}Lu.

Historiquement le tout premier analogue de la neurotensine développé pour le ciblage radioisotopique de tumeurs est le DTPA(In)-NT(8-13) qui consiste simplement en un couplage du DTPA sur la lysine^{8} de la NT8-13 permettant un marquage à l'indium-111. Ce peptide a permis *in vitro* d'augmenter la demie vie de la NT native de 1,5 min à 10 min (Chavatte et al. 1999, équipe de D. Tourwé).

Dans une première étude de ciblage tumoral *in vivo*, l'équipe d'A. Gruaz Guyon a développé un dérivé de la NT, le [Lys(DTPA)]-NT qui consistait en un couplage du DTPA sur la lysine^{6} de la NT(1-13) permettant le marquage à l'indium-111 (Hillairet De Boisferon *et al.*, 2002). Elle a étudié les caractéristiques de ce composé dans un modèle de souris greffées en sous cutané par la lignée HT29. Les études *in vivo* développant des analogues radiomarqués de la neurotensine utilisent de manière générale le modèle HT29, une lignée d'adénocarcinome colique à partir de laquelle l'ADNc codant pour le récepteur NTR1 humain a été isolé (Vita *et al.*, 1993).

Dans une seconde étude, cette équipe a souhaité approfondir la compréhension de l'effet du couplage du chélatant et du marquage ainsi que celle des modifications de la séquence d'acides aminés sur l'affinité.

Les caractéristiques d'une série d'analogues couplés au DTPA dérivés des analogues NT(8-13) marqués au ^{99m}Tc déjà décrits dans la littérature (Bruehlmeier *et al.*, 2002, Buchegger *et al.*, 2003, Garcia-Garayoa *et al.*, 2001, Garcia-Garayoa *et al.*, 2006, Maes *et al.*, 2006) ont été étudiées. Le couplage du DTPA(In) à la fonction α-NH_2 de la NT(8-13) a entraîné une importante baisse de l'affinité pour les cellules HT29 qui peut être attribuée à un phénomène d'encombrement stérique apporté par le complexe DTPA(In) ou bien à des changements structuraux induit par le DTPA: il a été en effet été décrit que le DOTA couplé à un peptide de 13 acides aminés pouvait induire une hélice α qui n'était pas observée dans le peptide non couplé (Mier *et al.*, 2007).

Dans une autre série d'analogues, inspirée du [Lys(DTPA)]-NT (Hillairet De Boisferon *et al.*, 2002), le DTPA a été éloigné de la séquence NT(8-13) qui assure la liaison au récepteur NTR1, pour être couplé sur la fonction ε-NH2 de la lysine de la NT (6-13). Dans cette série, la fonction α-NH_2 de la lysine^6 a été acétylée pour protéger contre la dégradation par les aminopeptidases et neutraliser la charge positive qui pouvait augmenter l'accumulation rénale (Akizawa *et al.*, 2001, Froidevaux *et al.*, 2005).

L'affinité, la stabilité et l'accumulation tumorale de ces analogues ont été évaluées à l'aide de la lignée HT29 *in vitro* ou *in vivo* sur de souris porteuses de tumeurs HT29 (Alshoukr *et al.*, 2009).

L'affinité *in vitro* d'un des composés de cette série (NT20.1, IC_{50}=0,82nM) s'est révélée être quasiment identique au ligand (NT8-13, IC_{50}=0,68nM) qui porte l'essentiel des propriétés biologiques et pharmacologiques du peptide entier (Alshoukr *et al.*, 2009) et qui présente une affinité pour son récepteur NTR1, 10 à 20 fois meilleure que la NT native (P. Kitabgi, 2006a, Myers *et al.*, 2009). Mais ce composé couplé au DTPA, DTPA(^{111}In)-NT20.1, qui ne présentait aucune modification de la séquence 8-13, permettant sa résistance à la dégradation, a présenté une très faible stabilité *in vivo* dans le plasma (seulement 0,8% de peptide intact) 15 minutes après injection et malgré sa très bonne affinité pour le NTR1, 1h après injection à la souris seulement 0.46% ID/g était retrouvé dans la tumeur HT29.

Les analogues suivants ont été stabilisés contre la dégradation, l'un par une substitution de la Leu^{12} par une Tleu^{12} et l'autre par N-methylation de la liaison Pro^7-Arg^8 en plus de la substitution par une Tle^{12} aboutissant au composé NT20.3 qui permis d'obtenir une bonne stabilité *in vivo* dans le plasma (26,5 % de peptide intact) 15 minutes après injection à la souris tout en conservant une

bonne affinité pour le NTR1 (IC_{50}= 15,9 nmol/L).

Comme attendu, ces modifications de séquence ont augmenté la résistance du peptide contre la dégradation enzymatique *in vitro* et cette double stabilisation de la molécule a eu un impact majeur sur le marquage tumoral, comme cela a déjà été décrit pour des analogues de la bombésine (Garcia Garayoa *et al.*, 2007), permettant l'obtention d'un pourcentage de dose injectée/gramme de 3,27% dans la tumeur HT29, 1h après injection, qui reste de 2,38% dans la tumeur 3 h après injection.

En dépit d'un marquage rénal encore important (7,49%ID/g 1h p.i. et 4,85%ID/g 3h p.i.), le DTPA (^{111}In)-NT-20.3 procure un marquage spécifique de la tumeur et permet un bon compromis avec un rapport de marquage tumeur/ rein supérieur à celui des analogues de la neurotensine DTPA décrits dans la littérature.

L'obtention d'images planaires et TEMP de contraste élevé permettant la détection des greffes tumorales à l'aide du DTPA(^{111}In)-NT20.3 dans des temps courts après l'injection, inférieurs à 60 minutes, un délai compatible avec la demi-vie du gallium-68 (68 min), a conduit cette équipe à proposer ce traceur pour l'imagerie TEP.

Le DTPA reste l'un des chélateurs bifonctionnels les plus utilisés pour le marquage des peptides à l'indium-111 donc pour la TEMP ; il forme des complexes stables et a une cinétique de marquage rapide. Cependant, la stabilité du complexe DTPA gallium-68 est faible *in vivo* et peut conduire à des problèmes de transmétallation/transchélation. De plus, le DTPA n'est pas approprié pour l'incorporation de radionucléides thérapeutiques tels que l'^{90}Y et le ^{177}Lu car il libère du métal libre qui entraine une toxicité pour la moelle osseuse (S. Liu, 2008), tandis que le DOTA chélatant macrocyclique formant des complexes cinétiquement et thermodynamiquement plus stables est plus approprié. L'octréotide-DTPA marqué au gallium-68 a donné des résultats décevants (Maecke, 2005). Les analogues de la somatostatine portant le DOTA, synthétisés à l'origine pour des applications thérapeutiques, marqués au gallium-68, ont montré des propriétés supérieures aux analogues radiomarqués à l'^{111}In pour la scintigraphie des tumeurs neuroendocrines (Michael Gabriel *et al.*, 2007).

L'équipe du Dr. Gruaz-Guyon et particulièrement Faisal Al shoukr ont alors développé une nouvelle série d'analogues de la neurotensine conjugués au chélatant DOTA, en utilisant le DTPA-NT-20.3 comme molécule principale ; ils ont également inclus dans l'étude un analogue synthétisé par l'équipe du Pr. Tourwé (Bruxelles), le DOTA-LB119 où la Tyr11 a été substituée par une diméthyl-tyrosine pour augmenter la stabilité. Dans ce traceur, le chélatant a également été éloigné de la séquence peptidique, assurant la liaison au récepteur, par un acide aminohexanoïque afin de minimiser l'encombrement stérique pouvant entrainer une diminution de l'affinité.

Le but de cette étude était de développer des analogues de DOTA-neurotensine pour l'imagerie TEP au ^{68}Ga ; ils pourraient également être marqués au ^{90}Y ou au ^{177}Lu pour la radiothérapie ciblée. Les caractéristiques de ces dérivés marqués à l'^{111}In ont été étudiées : affinité, cinétique de liaison et d'internalisation, stabilité in vivo ainsi que biodistribution. Une acquisition d'images TEMP a été réalisée dans un modèle de tumeurs humaines d'adénocarcinome colique HT29 surexprimant le récepteur NTR1 de la neurotensine.

J'ai alors mis au point le marquage de plusieurs de ces peptides à l'aide du gallium-68 issu d'un des premiers générateurs de ^{68}Ge/^{68}Ga du service de médecine nucléaire de l'hôpital Tenon détenu au LIMP. En optimisant les conditions de radiomarquage, nous avons pu obtenir un marquage rapide, automatisé et reproductible permettant d'aboutir à une activité spécifique suffisante pour une injection chez le petit animal. L'imagerie TEP de l'analogue ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 a été réalisée avec le même modèle d'adénocarcinome colique HT29.

XI.2. Article 2: Analogues de la neurotensine porteurs d'un chélatant DOTA pour la scintigraphie à l'indium-111 et l'imagerie TEP au gallium-68 de tumeurs positives pour le récepteur de la neurotensine.

Alshoukr F, **Prignon A**, Brans L, et al. Novel DOTA-neurotensin analogues for ^{111}In scintigraphy and ^{68}Ga PET imaging of neurotensin receptor-positive tumors. *Bioconjug Chem.* 2011;22:1374-1385.

Notes: Faisal Alshoukr and Aurélie Prignon are to be considered as equal co-authors

Bioconjugate Chemistry

ARTICLE

pubs.acs.org/bc

Novel DOTA-Neurotensin Analogues for ^{111}In Scintigraphy and ^{68}Ga PET Imaging of Neurotensin Receptor-Positive Tumors

Faisal Alshoukr,[†,‡,§,Δ] Aurélie Prignon,[∥,Δ] Luc Brans,[⊥] Abdelhak Jallane,[†,‡,§] Sandra Mendes,[†,‡,§] Jean-Noël Talbot,[∥] Dirk Tourwé,[⊥] Jacques Barbet,[#,§] and Anne Gruaz-Guyon*[,†,‡,§]

[†]Inserm, U773, Paris, F-75018, France

[‡]Université Denis Diderot-Paris 7, UMR S773 Paris, F-75018, France

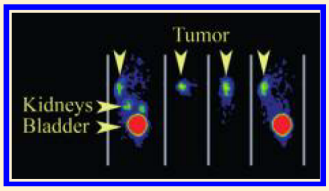
[§]CNRS, GDR 3260 Antibodies and therapeutic targeting, Tours, F-37032, France

[∥]Plateforme LIMP, IFR 65, Université Pierre et Marie Curie, Paris, F-75020, France

[⊥]Department of Organic Chemistry, Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan 2, B-1050 Brussels, Belgium

[#]Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes-Angers, Inserm, Université de Nantes, U892, Nantes, F-44000, France

ABSTRACT: Overexpression of the high affinity neurotensin receptor 1 (NTSR1), demonstrated in several human cancers, has been proposed as a new marker for human ductal pancreatic carcinoma and as an independent factor for poor prognosis for ductal breast cancer, head and neck squamous cell carcinoma, and non-small cell lung cancer. The aim of the present study was to develop new DOTA-neurotensin analogues for positron emission tomography (PET) imaging with ^{68}Ga and for targeted radiotherapy with ^{90}Y or ^{177}Lu. We synthesized a DOTA-neurotensin analogue series. Two of these peptides bear two sequence modifications for metabolic stability: DOTA-NT-20.3 shares the same peptide sequence as the previously described DTPA-NT-20.3. In the sequence of DOTA-NT-20.4, the Arg^8-Arg^9 bond was N-methylated instead of the Pro^7-Arg^8 bond in DOTA-NT-20.3. An additional sequence modification was introduced in DOTA-LB119 to increase stability. A spacer was added between DOTA and the peptide sequence to increase affinity. Binding to HT29 cells, which express NTSR1, *in vivo* stability, and biodistribution of the various analogues were compared, and the best candidate was used to image tumors of various sizes with the microPET in mice. ^{111}In-DOTA-NT-20.3, in spite of a relatively high uptake in kidneys, showed specific tumor uptake and elevated tumor to other organ uptake ratios. High contrast images were obtained at early time points after injection that allowed tumor detection at a time interval postinjection appropriate for imaging with the short-lived radionuclide ^{68}Ga. ^{111}In-DOTA-NT-20.4 displayed inferior binding to HT29 cells and reduced tumor uptake. ^{111}In-DOTA-LB119 displayed at early time points a significantly lower renal uptake but also a lower tumor uptake than ^{111}In-DOTA-NT-20.3, although binding to HT29 cells was similar. ^{68}Ga-DOTA-NT-20.3 displayed higher tumor uptake than ^{68}Ga-DOTA-LB119 and allowed the detection of very small tumors by PET. In conclusion, DOTA-NT-20.3 is a promising candidate for ^{68}Ga-PET imaging of neurotensin receptor-positive tumors. DOTA-NT-20.3 may also be considered for therapy, as the yttrium-labeled peptide has higher affinity than that of the indium-labeled one. A prerequisite for therapeutic application of this neurotensin analogue would be to lower kidney uptake, for example, by infusion of basic amino acids, gelofusin, or albumin fragments, to prevent nephrotoxicity, as with radiolabeled somatostatin analogues.



INTRODUCTION

During the past few years, several reports have pointed to the role of neurotensin and the high affinity neurotensin receptor 1 (NTSR1) in the progression of a variety of human cancers.[1] Neurotensin (NT) is a tridecapeptide which acts, in the central nervous system, as a neuromodulator involved in dopamine transmission, inhibition of food intake, hypothermia, and analgesia. In the periphery, neurotensin effects involve hypotension, decrease in gastric acid secretion, lipid digestion, gut motility, proinflammatory response, and also cell proliferation of a variety of normal or cancer cells such as pancreatic adenocarcinoma, colon, prostate, breast, and lung cancer cells.[1−4] Neurotensin exerts its trophic effects, in an endocrine, paracrine, or autocrine fashion, predominantly through NTSR1, but NTSR2 and particularly NTSR3 may also contribute to growth stimulation of normal and neoplastic tissues.[3] Overexpression of NTSR1 has been demonstrated in several human cancers such as pancreatic adenocarcinoma (75−88%),[5,6] invasive ductal breast cancer (91%),[7] non-small cell lung carcinoma (60%),[8] malignant mesothelioma (90%),[9] colon adenocarcinoma,[10] head and neck squamous cell carcinoma,[11] prostate cancer,[12] small cell lung carcinoma, Ewing's sarcoma, and meningioma.[13] Recent studies have suggested that increased NTSR1 expression contributes to the progression and aggressiveness of several tumors.[7,8,10,11] In addition, NTSR1 overexpression has been proposed as a new marker for human ductal pancreatic carcinoma [6] and as an independent factor for poor prognosis for ductal breast cancer,[14] head and neck squamous cell carcinoma,[11] and non-small cell lung cancer.[8]

Received: February 8, 2011
Revised: May 18, 2011
Published: June 12, 2011

ACS Publications © 2011 American Chemical Society

Table 1. Peptide Sequence and Analytical Data

peptide	sequence	% purity	M+H$^+$ MALDI-TOF	M+H$^+$ calculated
NT	pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH			
NT(8−13)	H-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH			
NT-20.3	Ac-Lys-Pro-Me-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH			
DTPA-NT-20.3[a]	Ac-Lys(DTPA)-Pro-Me-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH	>99	1473.83	1473.80
DOTA-NT-20.3	Ac-Lys(DOTA)-Pro-Me-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH	98	1484. 83	1484.85
DOTA-NT-20.4	Ac-Lys(DOTA)-Pro-Arg-Me-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH	>97	1484. 84	1484.85
DOTA-LB119[b]	Ac-Lys(Ahx-DOTA)-Pro-Me-Arg-Arg-Pro-Dmt-Tle-Leu-OH	>95	1627.08	1626.98

[a] Previously published.[19] [b] Ahx: aminohexanoic acid; Dmt: 2′,6′-dimethyltyrosine.

Radiolabeled neurotensin analogues could be used with scintigraphy or positron emission tomography (PET) for staging and/or prognostication, treatment follow-up, and further for internal radiotherapy of tumors overexpressing neurotensin receptors. The potential of radiolabeled peptide receptor ligands has been demonstrated by the role of somatostatin receptor ^{111}In-scintigraphy, which is nowadays a routine imaging modality in the diagnosis and staging of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEPNETs), and by the therapy results obtained with ^{90}Y- and ^{177}Lu-labeled somatostatin analogues.[15,16]

We have previously developed DTPA-conjugated analogues of NT(8−13), the minimal sequence that mimics the effects of full-length NT,[17] and of NT(6−13).[18,19] Since neurotensin is rapidly degraded *in vivo*, sequence modifications were introduced to stabilize these molecules. An NT(6−13) analogue, DTPA-(^{111}In)-NT-20.3, may be considered a promising candidate for ^{111}In imaging of neurotensin receptor-positive tumors. This tracer showed specific tumor uptake *in vivo* and yielded high contrast on planar and SPECT tumor imaging in nude mice. In spite of a relatively high uptake in kidneys, uptake ratios between tumors and other normal organs including stomach, small intestine, and colon were high. Tumor was detected at early time points postinjection (30−60 min) on images obtained with ^{111}In-DTPA-NT-20.3. Such a time interval is appropriate for imaging with the short-lived radionuclide ^{68}Ga (half-life of 68 min). Indeed, ^{68}Ge/^{68}Ga generators, with a relatively long half-life that permits use over more than one year, have been made available. They provide ^{68}Ga independently of an on-site cyclotron. The generators make the labeling of peptides with this positron emitting radionuclide relatively easy by simple chelation.[20] They prompted the development of several ^{68}Ga-labeled radiopharmaceuticals, particularly peptide receptor ligands such as somatostatin, α-MSH, or bombesin analogues.[15,21−23] The superiority of PET imaging of somatostatin receptors with ^{68}Ga-labeled somatostatin derivatives over SPECT with ^{111}In-labeled pentetreotide has been reported in a number of publications.[24−27]

DTPA provides easy and stable peptide labeling with indium-111. However, labeling stability has been shown to be less satisfactory with other radioactive metals, particularly for yttrium-90 for therapy. The macrocyclic chelator 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N*,*N*′,*N*″,*N*‴-tetraacetic acid (DOTA) is suitable for labeling with numerous radionuclide and is much more efficient in preventing leakage and subsequent bone marrow toxicity in targeted radionuclide therapy with yttrium-90.[28] DOTA-substituted peptides have also been used successfully for labeling with lutetium-177 and gallium-68. The aim of the present study was thus to develop a new DOTA conjugated neurotensin analogue series that would allow PET imaging with ^{68}Ga of neurotensin receptor-positive tumors, using DTPA-NT-20.3 as lead molecule. These DOTA-neurotensin analogues should also be suitable for labeling with ^{90}Y or ^{177}Lu in the aim of internal radiotherapy. Binding to HT29 cells, which express NTSR1, *in vivo* stability, and biodistribution of the various analogues were compared, and the best candidate was used to image tumors of various sizes with the microPET in mice.

MATERIALS AND METHODS

Cells. Experiments were performed with the HT29 human colorectal carcinoma cell line (ATCC, Rockville, USA). Cells were grown in DMEM (Gibco, France) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, and 50 μg/mL gentamycin at 37 °C in 5% CO_2.

Synthesis of the DOTA-NT Analogues. All reagents used for the synthesis were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France, or Bornem, Belgium), Macrocyclics (Dallas, USA), Novabiochem (Läufelfingen, Switzerland), Bachem (Bubendorf, Switzerland), and RSP (Shirley, USA).

Sodium acetate 2 M was obtained from Hospira (Lake Forest, USA), absolute ethanol from Prolabo (Briare, France), trifluoroacetic acid from Supelco (Bellefont, USA). Water purified on Chelex resin from Biorad (St. Louis, USA) was used in all reactions.

The purity of the compounds was checked by HPLC on a Nucleosil C_{18} (5 μm, 100 Å, Shandon, France) reverse-phase column or on a Discovery BIO SUPELCO Wide Pore (5 μm, 300 Å, Sigma-Aldrich) column with a gradient of A, water (0.05% TFA), and B, CH_3CN (0.05% TFA), at a flow rate of 1.5 mL/min on a Waters apparatus.

The acetylated NT(6−13) analogues NT-20.3 (Ac-Lys-Pro-Me-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH) and NT-20.4 (Ac-Lys-Pro-Arg-Me-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH) were synthesized by NeoMPS (Strasbourg, France). 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7-tris-(acetic acid)-10-acetic acid mono(*N*-hydroxysuccinimidyl ester) (DOTA-NHS ester) (Macrocyclics, Dallas, TX, USA) (5 equiv) was coupled to the lysine ε-NH_2 of NT-20.3 or of NT-20.4 (1 equiv) as described.[29] These DOTA-NT-20.3 and DOTA-NT-20.4 were purified by C_{18} reverse phase chromatography (5 μm, 100 Å, Nucleosil, Shandon, France) using a linear 150 min gradient (flow rate, 2 mL/min; A, H_2O/TFA(0.05%); B, acetonitrile/TFA(0.05%)) from 0% to 37% B. Coupling yields were approximately 85% for DOTA-NT-20.3 and 64% for DOTA-NT-20.4.

DOTA-LB119 was obtained starting from Ac-Lys(Dde)-Pro-Me-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Pro-Dmt(Trt)-Tle-Leu-OWang resin. After deprotection of the Dde protection using $NH_2OH.HCl$/imidazole,[30] Fmoc-Ahx was coupled to the free ε-NH_2 group of Lys (DIC/HOBt) followed by Fmoc deprotection and coupling

of DOTA(O*t*Bu)$_3$ using HATU. The peptide was cleaved from the resin using TFA/H_2O/thioanisole/phenol/ethanedithiol (82.5:5:5:5:2.5) and purified by HPLC.

All DOTA-peptides were purified to at least 95% purity and identified by mass spectrometry (Table 1).

Radiolabeling. *^{111}In Labeling.* DTPA-NT-20.3 was labeled with ^{111}In as already described.[19] The DOTA-NT analogues (1 nmol) were labeled with indium-111 ($^{111}InCl_3$, 10−20 MBq, Covidien imaging, France) in 270 mM acetate, 27 mM citrate, buffer pH 4.5 during 25 min at 95 °C. Excess free indium was removed on a Sep-Pak cartridge (Waters Milford, USA). Radiochemical purity was confirmed by reverse-phase HPLC.

^{68}Ga Labeling. A fully automatic, PC-controlled, radiopharmaceutical synthesis device (SynChrom R&D, Raytest, Germany) was used for all labeling steps. ^{68}Ga ($t_{1/2}$ 68 min) was eluted from a ^{68}Ge/^{68}Ga-generator-system (IGG100, Eckert Ziegler, Berlin) in which ^{68}Ge ($t_{1/2}$ 270.8 d) was attached to a borosilicate glass column containing a titanium dioxide bed. The ^{68}Ga was eluted with 5 mL of 0.1 M hydrochloric acid. DOTA-peptide (25 nmol) in 290 μL 0.8 M sodium acetate was added to 300 MBq of $^{68}GaCl_3$ in 2 mL 0.1 M HCl. The reaction mixture (pH 3.5) was incubated at 95 °C for 8 min. Excess free ^{68}Ga was removed on a Sep-Pak cartridge (Waters Milford, USA). Radiochemical purity was confirmed by reverse-phase HPLC.

Determination of the IC_{50} of the DOTA-NT Analogues for Binding to NTSR1 in Living HT29 Cells and Kinetics of Activity Associated to or Internalized into Cells. The chelate formed by the nonradioactive metal (Me) and the DOTA-peptides (Me-DOTA-peptides) was obtained by incubation (25 min at 95 °C) of the DOTA-peptide (150 nmol in 150 μL water) with solutions of $InCl_3$, YCl_3, or $GaCl_3$ (1.5 μmol in 150 μL acetate 100 mM, citrate 10 mM, buffer, pH 5). IC_{50} for the binding to living HT29 cells was determined by competition between ^{125}I-labeled neurotensin (Perkin-Elmer, France) and the Me-DOTA-peptide chelate. HT29 cells (1.5×10^6 cells) were rinsed with 500 μL DMEM 0.2% BSA and incubated for 60 min at 37 °C with ^{125}I-labeled neurotensin (40 pM, 300 μL DMEM, 0.2% BSA, 0.8 mM 1,10-phenanthroline) in the presence of increasing concentrations of nonradioactive Me-DOTA-NT analogue. After washing the wells twice with ice-cold DMEM 0.2% BSA, cells were lysed in 500 μL 0.1 N NaOH and radioactivity was counted. Nonspecific binding was evaluated in the presence of 10^{-6} M neurotensin. Competition curves were analyzed with the *Equilibrium Expert* software.[31] All experiments were performed three times in triplicate.

Kinetic studies were performed with 0.5×10^{-9} M ^{111}In-DOTA-NT-20.3 or ^{111}In-DOTA-LB119 or 5×10^{-9} M ^{111}In-DOTA-NT-20.4 as above, except for the use of twelve-well plates (600 μL, 1.5×10^6 cells). At selected times, total radioactivity associated to the cells was evaluated as above. To determine the amount of internalized radioactivity, wells were incubated in DMEM/0.2% BSA, pH 2.0, for 15 min at 4 °C, to dissociate the surface-bound ligand. Internalized activity was then counted after washing and cell lysis. Nonspecific binding and internalization was evaluated in the presence of 10^{-6} M neurotensin. Results are expressed as the percentage of acid washed resistant activity, corresponding to specific binding, related to the activity specifically associated with the cells (I/B, mean ± sem).

***In Vivo* Metabolic Stability.** Female BALB/c mice ($n = 3-4$) were injected in the tail vein with ^{111}In-labeled DOTA-NT analogues (50 pmol). Mice were sacrificed 15 min after injection. Plasma and urine samples (50 μL) were added to 200 μL methanol and filtered. Then, methanol was evaporated under vacuum and the sample was analyzed by C_{18} RP-HPLC. Detection was performed with a radioactivity detector (HERM LB 500, Berthold, France). Elution was performed using, after 5 min at 0% B, a linear 15 min gradient from 0% to 35% B and a linear 25 min gradient from 35% to 50%; flow rate: 1.5 mL/min. The sample was also coinjected with fresh radioactive peptide to identify the peak corresponding to intact peptide. Under these conditions, the retention times of the peptides were 34.0 min for ^{111}In-DOTA-NT-20.3 and ^{111}In-DOTA-LB119 and 33.1 min for ^{111}In-DOTA-NT-20.4.

Biodistribution and Imaging Studies. All *in vivo* experiments were performed in compliance with the French guidelines for experimental animal studies and fulfill the UKCCCR guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia.

HT29 cells (6.7×10^5 cells) were inoculated subcutaneously in the flank of 6−8 week old athymic nu/nu male mice (Harlan, France). Biodistribution and imaging studies were performed two weeks later except as mentioned otherwise.

Biodistribution and Imaging Studies of ^{111}In-Labeled DOTA-NT Analogues. Mice were injected in the tail vein with ^{111}In-labeled DTPA-NT-20.3 (25−45 pmol) or ^{111}In-labeled DOTA-NT analogues (40−65 pmol, 0.5−0.7 MBq in 100 μL PBS 0.01% mouse serum albumin, except for mice dissected 49 h postinjection which received 500−900 pmol, 7−12 MBq) and sacrificed at different times. Blood, organs, and tumors were collected and weighed and radioactivity was counted. Injected activity was corrected for losses by subtraction of noninjected and subcutaneously injected material remaining in the animal tail. In blocked control experiments, each mouse received a coinjection of the labeled peptide and of its unlabeled counterpart (180 nmol NT-20.3 for DOTA-NT-20.3, Ac-Lys-Pro-Arg-Me-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH for DOTA-NT-20.4, and Ac-Lys(Ahx)-Pro-Me-Arg-Arg-Pro-Dmt-Tle-Leu-OH for DOTA-LB119).

To estimate the areas under the time concentration curves (AUC) of the various peptides, biodistribution data collected at various time after injection were fitted using *WinSAAM*[32] to a pharmacokinetic model with two compartments to describe the distribution and elimination kinetics. Specific uptake in tumors and kidneys was modeled using one additional compartment for each tissue. Uptake data in tumor and kidneys were then fitted as the sum of the content of these additional compartments plus a fraction of the content of the central compartment of the model. To reduce the number of adjustable parameters, the volume of the central compartment was set to that of blood calculated as 9.5% of mean mouse body weight,[33] and the fractions of rapidly exchangeable fluid (blood + interstitial fluid) were set to 0.25 and to 0.39 for tumor and kidneys, respectively, as determined by Sung and co-workers[34] and Covell and co-workers.[35] The same model was used for all peptides. Addition of more compartments or adjusting the central compartment volume or the fractions of rapidly exchangeable fluid did not significantly improve data fitting. AUC were then calculated for blood, tumor, and kidneys by adding an accumulation compartment and extrapolating to 12 000 min.

^{111}In scintigraphic imaging was performed at the imaging platform of CEFI (Institut Claude Bernard, IFR 2, Paris). Mice under pentobarbital anesthesia were i.v. injected with ^{111}In-DOTA-NT analogues (500−900 pmol, 7−12 MBq) using a dedicated small animal Gamma Imager-S/CT system (Biospace Mesures) equipped with a parallel collimator (matrix 128 × 128,

with 15% energy windows centered on both indium-111 peaks at 171 and 245 keV). Planar anterior acquisitions were performed from 0 to 1 h, 1 to 1.5 h, 4.5 to 5.5 h, 24 to 25 h, and 48 to 49 h postinjection. Tumor to kidney activity ratio was evaluated using ROI surrounding the tumor and the right kidney. Radioactivity excretion in urine was determined from activity collected in the bladder 1.5 h postinjection.

Biodistribution and Imaging Studies with ^{68}Ga-Labeled DOTA-NT Analogues. Animals were injected in the retro-orbital sinus, under general anesthesia by isoflurane inhalation, with ^{68}Ga-DOTA-NT-20.3 (420 ± 30 pmol, 0.96 ± 0.08 MBq) or ^{68}Ga-DOTA-LB119 (450 ± 50 pmol, 1.2 ± 0.1 MBq) in 0.1 mL saline, 8 and/or 14 days after graft PET acquisitions were performed at the LIMP imaging platform (Hôpital Tenon, IFR 65 of Université Pierre et Marie Curie, Paris) with the Mosaic animal PET machine (Philips Medical systems, Cleveland, OH, USA). Static acquisitions were performed 45 min later with an exposure time of 10 min except otherwise mentioned.

Data were standardized with SUV units (standardized uptake value, g/mL). It is a widely used, simple PET quantifier, calculated as the ratio of radioactive concentration in a ROI surrounding the organ (MBq/mL) to the injected activity per animal body weight corrected from decay (MBq/g). Data were analyzed using *PETView* and Syntegra−Philips software (PETView; Philips Medical Systems, Bothell, WA).

Mice were sacrificed by cervical dislocation while under anesthesia one hour after injection. Blood, organs, and tumors were collected and weighed and radioactivity was counted. Tissue activity was decay-corrected.

For comparison, 9 days after inoculation of tumor cells, after a fasting period of 12 h, mice were injected intravenously with 6 to 10 MBq fluorodeoxyglucose (^{18}F) (FDG). Images were recorded one hour later with a 10 min acquisition time.

Statistical Analysis. Statistical analysis of differences in tissue uptake values was performed using unpaired *t* test for comparison between two groups or ANOVA analysis followed by Newman-Keuls' test for multiple comparisons. Differences of $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Synthesis of DOTA-NT Analogues. A series of NT (6−13) analogues that bear DOTA on the Lys^6 lateral chain were synthesized. The N-terminal end was acetylated to protect against amino-peptidases and to neutralize the positive charge of the α-NH$_2$ that favors renal accumulation.[36,37] Changes were introduced in the peptide sequence to protect the bonds between Arg^8 and Arg^9, Pro^{10} and Tyr^{11}, or Tyr^{11} and Ile^{12} against enzymatic degradation (Table 1). DOTA-NT-20.3 is the DOTA analogue of DTPA-NT-20.3, which provided, in a previous study, very encouraging ^{111}In targeting to neurotensin receptor-positive tumors.[19] This peptide was doubly stabilized by N-methylation of the Pro^7-Arg^8 bond and a Tle^{12} substitution. In DOTA-NT-20.4, the N-methylation was introduced at the Arg^8-Arg^9 bond instead of the Pro^7-Arg^8 bond in DOTA-NT-20.3.

We previously demonstrated that coupling of polyaminopolycarboxylate chelators such as DTPA dramatically decreases the affinity, unless the distance between the chelating agent and the NT(8−13) sequence that binds to the NTSR1 receptor is increased.[19] Therefore, we introduced an aminohexanoic acid spacer between DOTA and the peptide sequence in DOTA-LB119, an analogue of DOTA-NT-20.3 in which Tyr^{11} was replaced by 2′,6′-dimethyltyrosine (Dmt) to further stabilize the molecule.

Table 2. Affinity of Peptides for Binding to HT29 Cells

peptide	IC_{50} (nM)
NT[a]	1.7 ± 0.4
NT-20.3[a]	2.2 ± 0.3
In-DTPA-NT-20.3[a]	16 ± 2
In-DOTA-NT-20.3	15 ± 1
Ga-DOTA-NT-20.3	14 ± 2
Y-DOTA-NT-20.3	5.6 ± 0.7
In-DOTA-NT-20.4	190 ± 20
In-DOTA-LB119	14.1 ± 0.7
Ga-DOTA-LB119	7.5 ± 0.7
Y-DOTA-LB119	9.9 ± 0.5

[a] For comparison, previously published.[19]

All DOTA-peptides were purified to at least 95% purity and identified by mass spectrometry (Table 1).

Radiolabeling. ^{111}In-labeling yields of the DOTA-NT analogues were 82 ± 3% for DOTA(^{111}In)-NT-20.3, 79 ± 6% for DOTA(^{111}In)-NT-20.4, and 87 ± 2% for DOTA(^{111}In)-LB119. Very similar specific activities of about 11 MBq/nmol were obtained for the three peptides.

The decay-corrected labeling yield of ^{68}Ga obtained was 67 ± 9% with a specific activity of 2.5−4.5 MBq/nmol at the end of the labeling. The overall preparation time was 30 min.

After purification of the labeled compound on a reverse phase C_{18} cartridge (Sep-Pak cartridge), the radiochemical purity of the ^{111}In- or ^{68}Ga-labeled analogues was checked by reverse-phase HPLC with a radioactivity detector: only one peak corresponding to the labeled peptide was detected on the chromatogram.

Binding Affinities. The IC_{50} of the Me-DOTA-peptide chelates for the binding of ^{125}I-labeled neurotensin to living HT29 cells was measured after 60 min incubation at 37 °C. Since the peptides are rapidly internalized by target cells (see below), the determination of affinity constants for NTSR1 at 37 °C is not straightforward, and IC_{50} values reflect the binding potential of the various peptides (Table 2). In-DOTA coupling had similar effects on affinity as In-DTPA, since In-DOTA-NT-20.3 IC_{50} was similar to that of its In-DTPA-counterpart. Conversely, N-methylation of the Arg^8-Arg^9 bond, instead of the Pro^7-Arg^8 bond of In-DOTA-NT-20.3, increased the IC_{50} by a factor of about 12 in In-DOTA-NT-20.4. This loss of affinity may be attributed to the importance of Arg^9 for binding to NTSR1, since replacement of this amino acid by citrulline decreases the affinity by about 100-fold.[38] In-DOTA-LB119 displayed an IC_{50} similar to that of In-DOTA-NT20.3 in spite of the substitution of Tyr^{11} by Dmt, which decreased the affinity by a factor of 5 in the In-DTPA-NT(8−13) analogue series.[19] Most probably, the expected loss of affinity was compensated for by the introduction of an aminohexanoic acid spacer, between DOTA and the ε-NH2 of Lys^6 in In-DOTA-LB119.

The chelated metal also had an influence on the affinity of the complex. The yttrium complexes of DOTA-NT-20.3 and of DOTA-LB119 displayed lower IC_{50} than the indium ones ($p < 0.01$). The IC_{50} of the gallium chelate of DOTA-NT-20.3 was not significantly different from that of the indium complex, in opposition to the IC_{50} decrease of the Ga-DOTA-LB119 as compared to In-DOTA-LB119 ($p < 0.001$).

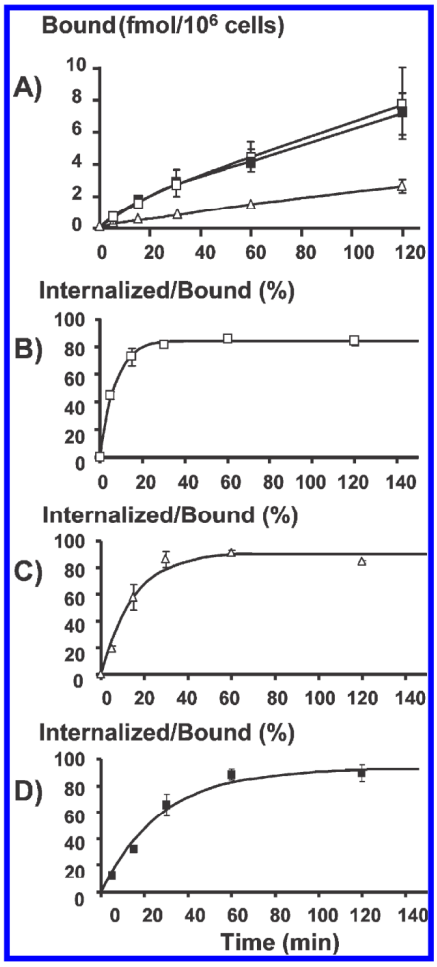


Figure 1. *In vitro* binding and internalization kinetics of ^{111}In-DOTA-peptides in HT29 cells. Panel A: Kinetics of specific radioactivity accretion to 1×10^6 HT29 cells at 37 °C (bound, fmol, mean ± sem) in the presence of 5×10^{-10} M labeled peptide. Each point is the average of four experiments performed in triplicate. Open squares: ^{111}In-DOTA-NT-20.3. Black squares: ^{111}In-DOTA-LB119. Triangles: ^{111}In-DOTA-NT-20.4. Panels B (^{111}In-DOTA-NT-20.3), C (^{111}In-DOTA-NT-20.4), and D (^{111}In-DOTA-LB119): Internalization kinetics. Results are expressed as the percentage of acid washed resistant activity, corresponding to specific binding, related to the activity associated with the cells (internalized/bound, mean ± SEM). Radioactivity, associated to cells or acid wash resistant, corresponding to nonspecific binding was evaluated in the presence of 10^{-6} M neurotensin. Solid line: results fitted with a monoexponential curve. Three experiments performed in triplicate.

Kinetics of *in Vitro* Radioactivity Binding and Internalization into HT29 Cells. As expected from their IC_{50}, the binding of ^{111}In-DOTA-NT-20.3 and of ^{111}In-DOTA-LB119 was not significantly different at every time point, and a significantly lower binding was observed for ^{111}In-DOTA-NT-20.4 after 15 min of incubation (Figure 1). The amount of ^{111}In-DOTA-peptide associated with cells that was internalized into cells increased rapidly with time reaching a 85 ± 2% plateau for ^{111}In-DOTA-NT-20.3, 91 ± 2% for ^{111}In-DOTA-NT-20.4, and 93 ± 2% for ^{111}In-DOTA-LB119 after less than 60 min.

***In Vivo* Peptide Catabolism.** The stability to enzymatic degradation was evaluated *in vivo*. The fraction of radioactivity associated to the intact ^{111}In-DOTA-peptides in plasma was determined 15 min after *iv* injection to BALB/c mice (Figure 2). Samples were analyzed by C_{18} RP-HPLC chromatography. Metabolites eluted at shorter retention times than the full-length radioactive peptide.

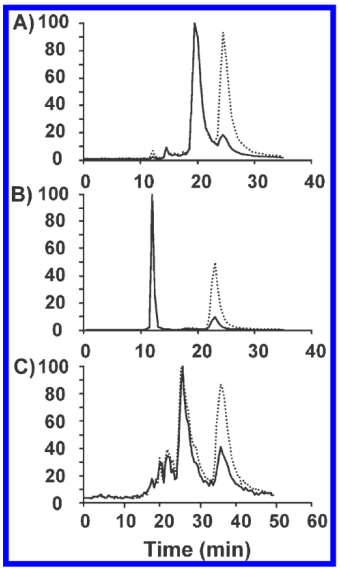


Figure 2. *In vivo* serum stability of ^{111}In-DOTA-peptides: representative C18 HPLC chromatograms of plasma samples collected 15 min postinjection to mice. (A) ^{111}In-DOTA-NT-20.3. (B) ^{111}In-DOTA-NT-20.4. (C) ^{111}In-DOTA-LB119. Solid line: plasma sample. Dotted line: coinjection of the sample with the radioactive control. Chromatograms were normalized to the highest metabolite peak.

There was no significant difference between the amount of intact peptide recovered in the plasma of mice injected with ^{111}In-DOTA-NT-20.3 (22 ± 1%) and ^{111}In-DOTA-LB119 (26 ± 3%), but ^{111}In-DOTA-NT-20.4 (16 ± 2%) was less stable than ^{111}In-DOTA-LB119 ($p < 0.05$). The fraction of activity (% ID/g) remaining in blood 15 min postinjection amounted to 6.1 ± 0.4%, 5.2 ± 0.2%, and 3.9 ± 0.8% for ^{111}In-DOTA-NT-20.3, ^{111}In-DOTA-NT-20.4, and ^{111}In-DOTA-LB119, respectively.

Biodistribution and Imaging Studies of the DOTA(^{111}In)-NT Peptides. Biodistribution studies of the neurotensin analogues ^{111}In-DTPA-NT-20.3 (Table 3), ^{111}In-DOTA-NT-20.3 (Table 4), ^{111}In-DOTA-NT-20.4 (Table 5), and ^{111}In-DOTA-LB119 (Table 6) were performed at various time points postinjection in male nude mice. Tumor accretion expressed as the percentage of injected dose per gram of tumor (%ID/g) showed no significant difference between ^{111}In-DTPA-NT-20.3 and ^{111}In-DOTA-NT-20.3 at any time postinjection, indicating similar tumor targeting efficacy of these two peptides. A slow tumor washout of both peptides was observed between 3 and 6 h, as already described for ^{111}In-DTPA-NT-20.3 in female nude mice. The renal uptake of these two peptides was not significantly different, except at 6 h postinjection ($P < 0.05$).

At early time points, ^{111}In-DOTA-NT-20.3 displayed a higher tumor uptake than ^{111}In-DOTA-LB119 (1 h $P < 0.001$ and 3 h $P < 0.05$), but ^{111}In-DOTA-LB119 tumor uptake decreased slowly with time and, from 6 to 24 h, no significant difference was observed between these two peptides. Renal accumulation of radioactivity was lower for ^{111}In-DOTA-LB119 than for ^{111}In-DOTA-NT-20.3 at early times postinjection ($P < 0.001$ at 1 h and $P < 0.05$ from 3 to 6 h). As a consequence, despite its lower tumor uptake, ^{111}In-DOTA-LB119 tumor to kidney uptake ratios were higher at 6 h ($P < 0.001$) postinjection than that of ^{111}In-DOTA-NT-20.3. ^{111}In-DOTA-NT-20.4 displayed a lower tumor uptake than ^{111}In-DOTA-NT-20.3 at every time point and than ^{111}In-DOTA-LB119 from 3 to 24 h, and a higher kidney uptake than these two peptides. As a consequence, the tumor to

Table 3. Tissue Distributions of ^{111}In-DTPA-NT-20.3 in Male Nude Mice Grafted with HT29 Cells

	^{111}In-DTPA-NT-20.3				
uptake (%ID/g)[a]	1 h $n = 4$	3 h $n = 4$	6 h $n = 6$	24 h $n = 4$	48 h $n = 3$
blood	0.13 ± 0.03	0.026 ± 0.004	0.023 ± 0.004	0.0076 ± 0.0008	0.0028 ± 0.0005
lungs	0.6 ± 0.3	0.11 ± 0.02	0.13 ± 0.04	0.044 ± 0.003	0.035 ± 0.003
liver	0.12 ± 0.01	0.093 ± 0.008	0.075 ± 0.009	0.049 ± 0.003	0.041 ± 0.002
spleen	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.074 ± 0.005	0.064 ± 0.004
stomach[b]	0.14 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.15 ± 0.05	0.27 ± 0.08	0.033 ± 0.008
small intestine[b]	1.1 ± 0.4	0.5 ± 0.1	0.61 ± 0.09	0.38 ± 0.05	0.192 ± 0.005
large intestine[b]	0.5 ± 0.2	0.23 ± 0.02	1.4 ± 0.2	0.82 ± 0.13	0.15 ± 0.03
muscle	0.5 ± 0.4	0.14 ± 0.09	0.024 ± 0.005	0.023 ± 0.007	0.016 ± 0.004
bone	0.20 ± 0.06	0.10 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.044 ± 0.003	0.027 ± 0.004
kidney	7.8 ± 0.1	7 ± 2	2.8 ± 0.3	1.9 ± 0.3	1.5 ± 0.3
tumor	3.1 ± 0.4	2.0 ± 0.4	2.0 ± 0.2	0.86 ± 0.07	0.9 ± 0.1
			tumor(T)/organ		
T/blood	28 ± 7	75 ± 6	100 ± 20	110 ± 10	360 ± 90
T/kidney	0.40 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.72 ± 0.09	0.5 ± 0.1	0.64 ± 0.06
T/liver	26 ± 2	21 ± 3	27 ± 3	17.7 ± 0.5	23 ± 3
T/muscle	25 ± 9	40 ± 30	100 ± 10	50 ± 10	70 ± 10

[a] Uptake is expressed as the percentage of injected dose per gram of tissue (%ID/g). [b] Organs with their content.

Table 4. Tissue Distributions of ^{111}In-DOTA-NT-20.3 in Male Nude Mice Grafted with HT29 Cells

	^{111}In-DOTA-NT-20.3				
uptake (%ID/g)[a]	1 h $n = 7$	3 h $n = 11$	6 h $n = 7$	24 h $n = 4$	49 h $n = 3$
blood	0.36 ± 0.06	0.014 ± 0.002	0.006 ± 0.002	0.0028 ± 0.0003	0.0028 ± 0.0004
lungs	0.47 ± 0.04	0.14 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.062 ± 0.004	0.07 ± 0.01
liver	0.21 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.123 ± 0.008	0.085 ± 0.002	0.07 ± 0.01
spleen	0.19 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.113 ± 0.009	0.10 ± 0.01	0.16 ± 0.01
stomach[b]	0.13 ± 0.03	0.2 ± 0.1	0.09 ± 0.04	0.06 ± 0.01	0.020 ± 0.005
small intestine[b]	0.9 ± 0.1	0.52 ± 0.09	0.34 ± 0.06	0.32 ± 0.02	0.070 ± 0.003
large intestine[b]	0.39 ± 0.05	1.1 ± 0.3	1.5 ± 0.5	0.19 ± 0.02	0.058 ± 0.007
muscle	0.10 ± 0.02	0.027 ± 0.009	0.04 ± 0.01	0.0116 ± 0.0008	0.008 ± 0.001
bone	0.15 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.099 ± 0.007	0.030 ± 0.005	0.053 ± 0.002
kidney	7.6 ± 0.9	4.9 ± 0.4	5.2 ± 0.5	2.5 ± 0.1	0.86 ± 0.08
pancreas	0.095 ± 0.009	0.03 ± 0.01	0.030 ± 0.002	ND	ND
tumor	4.7 ± 0.8	2.5 ± 0.2	1.9 ± 0.2	1.3 ± 0.2	0.68 ± 0.09
			tumor(T)/organ		
T/blood	17 ± 5	170 ± 30	420 ± 90	500 ± 100	250 ± 30
T/kidney	0.63 ± 0.07	0.53 ± 0.05	0.35 ± 0.02	0.50 ± 0.04	0.78 ± 0.03
T/liver	22 ± 3	21 ± 2	17 ± 3	15 ± 1	11 ± 4
T/muscle	60 ± 20	130 ± 20	80 ± 20	110 ± 20	80 ± 20
T/pancreas	47 ± 8	90 ± 10	70 ± 10	ND	ND

[a] Uptake is expressed as the percentage of injected dose per gram of tissue (%ID/g). [b] Organs with their content.

kidney uptake ratio of this peptide was very low at every time postinjection.

Tumor uptake was receptor mediated, as shown by the dramatic decrease in tumor uptake when the radiolabeled ^{111}In-DOTA-peptides were coinjected with their unlabeled counterpart: 2.5 ± 0.2% vs 0.14 ± 0.02% ID/g for ^{111}In-DOTA-NT-20.3, 1.41 ± 0.05% vs 0.12 ± 0.03% for ^{111}In-DOTA-LB119, and 0.52 ± 0.07% vs 0.11 ± 0.01% for ^{111}In-DOTA-NT-20.4 ($p < 0.001$, 79−94% reduction, 3 h postinjection).

Radioactivity excretion in urine was fast, and more than 60% of the injected activity was recovered in the bladder 1.5 h after injection of ^{111}In-DOTA-NT-20.3 or ^{111}In-DOTA-LB119. Blood activity decreased rapidly for the three ^{111}In-DOTA-peptides, and low radioactivity uptake was observed in most nontumor organs, except in kidneys and, to some extent, in the gastrointestinal tract, particularly in small intestine and in colon. With the exception of kidneys, tumor to normal organ uptake ratios were high for ^{111}In-DOTA-NT-20.3 and, to a lesser extent,

Table 5. Tissue Distributions of ^{111}In-DOTA-NT-20.4 in Male Nude Mice Grafted with HT29 Cells

	^{111}In-DOTA-NT-20.4				
uptake (%ID/g)[a]	1 h $n = 4$	3 h $n = 4$	6 h $n = 4$	24 h $n = 4$	49 h $n = 3$
blood	0.27 ± 0.03	0.040 ± 0.003	0.037 ± 0.005	0.016 ± 0.005	0.0019 ± 0.0006
lungs	0.27 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.037 ± 0.001
liver	0.107 ± 0.007	0.076 ± 0.008	0.09 ± 0.01	0.071 ± 0.007	0.074 ± 0.007
spleen	0.097 ± 0.006	0.082 ± 0.006	0.070 ± 0.006	0.075 ± 0.009	0.08 ± 0.02
stomach[b]	0.18 ± 0.09	0.16 ± 0.09	0.062 ± 0.005	0.05 ± 0.02	0.0086 ± 0.0009
small intestine[b]	0.5 ± 0.3	0.12 ± 0.03	0.15 ± 0.05	0.090 ± 0.008	0.023 ± 0.003
large intestine[b]	0.20 ± 0.04	0.5 ± 0.3	0.36 ± 0.05	0.12 ± 0.02	0.033 ± 0.007
muscle	0.10 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.040 ± 0.008	0.023 ± 0.008	0.010 ± 0.002
bone	0.16 ± 0.05	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.035 ± 0.005	0.037 ± 0.008
kidney	9 ± 2	8 ± 1	9 ± 2	4.2 ± 0.8	1.7 ± 0.7
pancreas	0.044 ± 0.004	0.027 ± 0.002	0.022 ± 0.003	0.023 ± 0.003	ND
tumor	0.8 ± 0.1	0.52 ± 0.07	0.5 ± 0.1	0.33 ± 0.05	0.21 ± 0.08
			tumor(T)/organ		
T/blood	3.1 ± 0.8	13 ± 2	13 ± 3	40 ± 10	130 ± 80
T/kidney	0.095 ± 0.008	0.064 ± 0.005	0.053 ± 0.002	0.080 ± 0.007	0.2 ± 0.1
T/liver	7.2 ± 0.7	6.8 ± 0.7	5.4 ± 0.6	7 ± 2	2.8 ± 0.8
T/muscle	9 ± 1	14 ± 3	12 ± 3	26 ± 7	30 ± 10
T/pancreas	18 ± 4	20 ± 4	23 ± 5	21 ± 5	ND

[a] Uptake is expressed as the percentage of injected dose per gram of tissue (%ID/g). [b] Organs with their content.

Table 6. Tissue Distributions of ^{111}In-DOTA-LB119 in Male Nude Mice Grafted with HT29 Cells

	^{111}In-DOTA-LB119				
uptake (%ID/g)[a]	1 h $n = 7$	3 h $n = 4$	6 h $n = 4$	24 h $n = 3$	49 h $n = 3$
blood	0.38 ± 0.05	0.023 ± 0.002	0.0045 ± 0.0002	0.007 ± 0.002	0.0016 ± 0.0003
lungs	0.36 ± 0.03	0.106 ± 0.007	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01
liver	0.20 ± 0.01	0.151 ± 0.007	0.14 ± 0.02	0.080 ± 0.005	0.09 ± 0.03
spleen	0.153 ± 0.007	0.09 ± 0.01	0.076 ± 0.009	0.064 ± 0.003	0.10 ± 0.03
stomach[b]	0.28 ± 0.08	0.16 ± 0.04	0.5 ± 0.5	0.08 ± 0.01	0.024 ± 0.004
small intestine[b]	1.1 ± 0.1	0.67 ± 0.08	0.7 ± 0.1	0.35 ± 0.05	0.084 ± 0.005
large intestine[b]	0.4 ± 0.1	1.5 ± 0.5	1.2 ± 0.8	0.16 ± 0.03	0.101 ± 0.006
muscle	0.09 ± 0.01	0.021 ± 0.005	0.05 ± 0.02	0.010 ± 0.003	0.015 ± 0.007
bone	0.15 ± 0.04	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02
kidney	3.4 ± 0.2	2.4 ± 0.2	2.2 ± 0.2	1.04 ± 0.07	0.6 ± 0.1
pancreas	0.081 ± 0.008	0.0217 ± 0.0008	0.018 ± 0.001	0.0180 ± 0.0006	0.013 ± 0.002
tumor	1.8 ± 0.1	1.41 ± 0.05	1.4 ± 0.2	1.0 ± 0.3	0.46 ± 0.06
			tumor(T)/organ		
T/blood	6 ± 1	63 ± 7	300 ± 40	160 ± 60	330 ± 90
T/kidney	0.55 ± 0.05	0.60 ± 0.05	0.63 ± 0.06	0.9 ± 0.2	0.74 ± 0.07
T/liver	9.0 ± 0.7	9.4 ± 0.4	10 ± 2	12 ± 3	6 ± 1
T/muscle	24 ± 7	80 ± 10	80 ± 40	130 ± 70	40 ± 10
T/pancreas	25 ± 4	65 ± 2	75 ± 7	50 ± 10	37 ± 3

[a] Uptake is expressed as the percentage of injected dose per gram of tissue (%ID/g). [b] Organs with their content.

for ^{111}In-DOTA-LB119. For example, tumor to blood amounted to 170 ± 30% and 63 ± 7%, respectively, tumor to muscle 130 ± 20% and 80 ± 20%, tumor to pancreas 90 ± 10% and 65 ± 2%, and tumor to liver 21 ± 2% and 9.4 ± 0.4% at three hours postinjection (Tables 4 and 6). Some excretion by the digestive route was also observed: 55 ± 8% and 60 ± 10% of the radioactivity in the stomach and 76 ± 8% and 79 ± 2% in the colon were associated to the organ content for ^{111}In-DOTA-NT-20.3 and ^{111}In-DOTA-LB119, respectively, at 3 h postinjection. Nevertheless, tumor to stomach (32 ± 8% at 3 h postinjection), to small intestine (7 ± 1%), and to colon (4 ± 1%) ratios were quite high for ^{111}In-DOTA-NT-20.3. They were somewhat

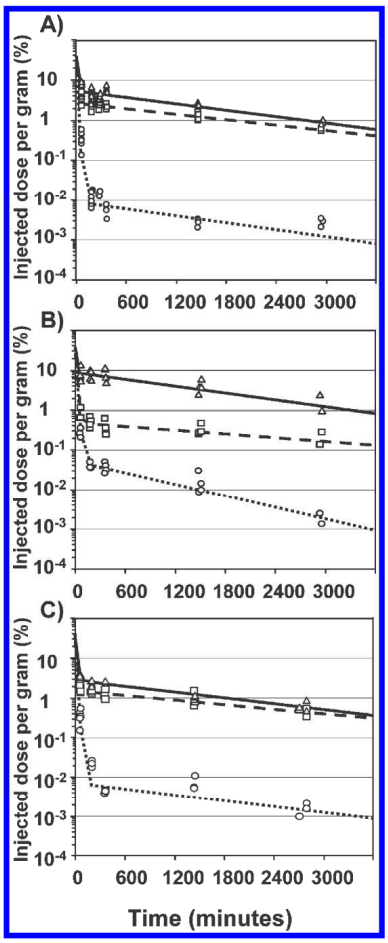


Figure 3. Biodistribution kinetics of ^{111}In-DOTA-peptides in tumor-bearing nude mice. Mice were injected with ^{111}In-DOTA-NT-20.3 (panel A), ^{111}In-DOTA-NT-20.4 (panel B), or ^{111}In-DOTA-LB119 (panel C) and sacrificed at selected time intervals. Blood sample (circles), tumors (squares), and right kidneys (triangles) were weighed and counted, and the activity was expressed as %ID/g. The three kinetics were fitted simultaneously using the same pharmacokinetic model as described in Materials and Methods, and the fitted curves for blood (dotted line), tumor (dashed line), and right kidney (solid line) are shown in the graphs as semilogarithmic plots.

lower for ^{111}In-DOTA-LB119: 10 ± 2%, 2.2 ± 0.3%, and 1.2 ± 0.3%, respectively. Some of the radioactivity accretion in the intestines was receptor-mediated, since after removal of their content, the radioactivity uptake was significantly reduced in small intestine (0.171 ± 0.008% vs 0.082 ± 0.007% ID/g for ^{111}In-DOTA-20.3 and 0.68 ± 0.01% vs 0.17 ± 0.04% ID/g for LB119, $p < 0.001$) and in colon (0.4 ± 0.1% vs 0.09 ± 0.02%, $p < 0.05$, and 0.7 ± 0.1% vs 0.16 ± 0.06% ID/g, $p < 0.01$, respectively), when the tracer was coinjected with an excess of unlabeled peptide.

Comparison between organ uptakes of different peptides at selected times postinjection hardly reflects irradiation doses delivered to these organs over time for a therapeutic injection of radiolabeled peptides. Then, for a preliminary evaluation of the potential of these peptides for targeted radiotherapy, areas under the time−activity curves (AUC expressed as %ID/g.min) were calculated after simultaneously fitting the activity biodistribution data for blood, tumor, and kidney to a multicompartmental model. The same, relatively simple model was used for all peptides with two compartments to describe the blood pharmacokinetic and one additional compartment to describe tumor and kidney uptake kinetics. The addition of a fraction of the central compartment, calculated on the basis of published data for the fractions of blood and interstitial fluid contained in tumors and normal organs,[34,35] to these tissues considerably improved data fitting. A total of seven parameters were thus adjusted to simultaneously fit the biodistribution data in blood, tumor, and kidneys. Good fitting was obtained in all cases (Figure 3, Table 7); however, it should be kept in mind that the kinetics reflect the total activity present in the tissues, responsible for tissue irradiation, and not the intact radiolabeled peptide, which is quickly catabolized. The estimated values for these parameters were rather similar for all peptides with subtle changes explaining the differences in pharmacokinetics.

Table 7. Area under Curves for Tumor, Kidneys, and Blood

peptide	tumor AUC[a]	kidney AUC[a]	blood AUC[a]
^{111}In-DTPA-NT-20.3	6743	10767	464
^{111}In-DOTA-NT-20.3	5463	9210	500
^{111}In-DOTA-LB-119	3687	5163	514
^{111}In-DOTA-NT-20.4	1618	13774	492

[a] Area under curve (AUC) are expressed as %ID/g.min.

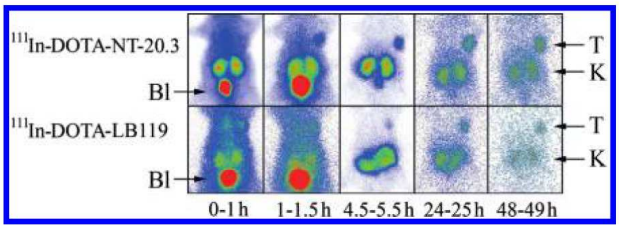


Figure 4. ^{111}In-DOTA-NT-20.3 and ^{111}In-DOTA-LB119 planar images of male nude mice grafted with HT29 cells. Planar anterior acquisitions were performed from 0 to 1 h, 1 to 1.5 h, 4.5 to 5.5 h, 24 to 25 h, and 48 to 49 h postinjection under anesthesia. Bl: bladder. K: kidney. T: tumor. Tumor weight: 167 mg for ^{111}In-DOTA-NT-20.3 and 196 mg for ^{111}In-DOTA-LB119.

Blood clearances were pretty close for all peptides; however, as judged by the AUC, tumor uptake was similar for ^{111}In-DTPA-NT-20.3 and ^{111}In-DOTA-NT-20.3, lower for ^{111}In-DOTA-LB119, and still lower for ^{111}In-DOTA-NT-20.4. Kidney uptake was lower for ^{111}In-DOTA-LB119, higher for ^{111}In-DTPA-NT-20.3 and ^{111}In-DOTA-NT-20.3, and even higher for ^{111}In-DOTA-NT-20.4. These resulted in similar tumor/kidney AUC ratios (0.6 to 0.7) for ^{111}In-DTPA-NT-20.3, ^{111}In-DOTA-NT-20.3, and ^{111}In-DOTA-LB119 and in a much lower value for ^{111}In-DOTA-NT-20.4 (0.1). The IC_{50} of the yttrium complex of DOTA-NT-20.3 is 2-fold lower than that of the indium one ($p < 0.01$).Then, one can expect that tumor AUC and so tumor to kidney AUC ratio may be higher with ^{90}Y- than ^{111}In-labeled DOTA-NT-20.3.

Planar images of mice grafted with HT29 cells were recorded from 1 to 48 h, after injection of ^{111}In-DOTA-NT-20.3 or ^{111}In-DOTA-LB 119 (Figure 4). There was a clear visualization of the tumor at early time points in mice injected with ^{111}In-DOTA-NT-20.3. At late time points, the tumor could be clearly detected with the two peptides. These results were consistent with biodistribution data and tumor to organ uptake ratios. Kidneys and bladder were the only other sites of visible activity accumulation. The activity ratio between tumor and kidneys was 0.47 ± 0.03% at 1 h and 0.69 ± 0.07% at 24 h for ^{111}In-DOTA-NT-20.3

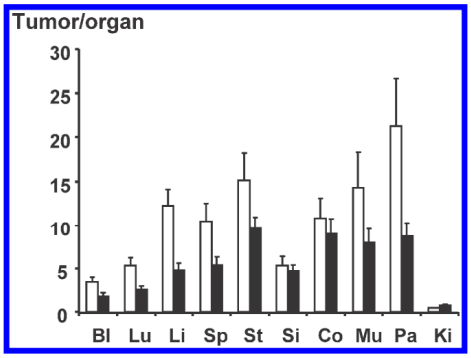


Figure 5. Tumor to normal organ uptake ratios obtained 1 h after injection of ^{68}Ga-DOTA-NT-20.3 (420 ± 30 pmol, 0.96 ± 0.08 MBq) or ^{68}Ga-DOTA-LB119 (450 ± 50 pmol, 1.2 ± 0.1 MBq) in male nude mice, grafted with HT29 cells. Bl: blood. Lu: lung. Li: liver. Sp: spleen. St: stomach. Si: small intestine. Co: colon. Mu: muscle. Pa: pancreas. Ki: kidney.

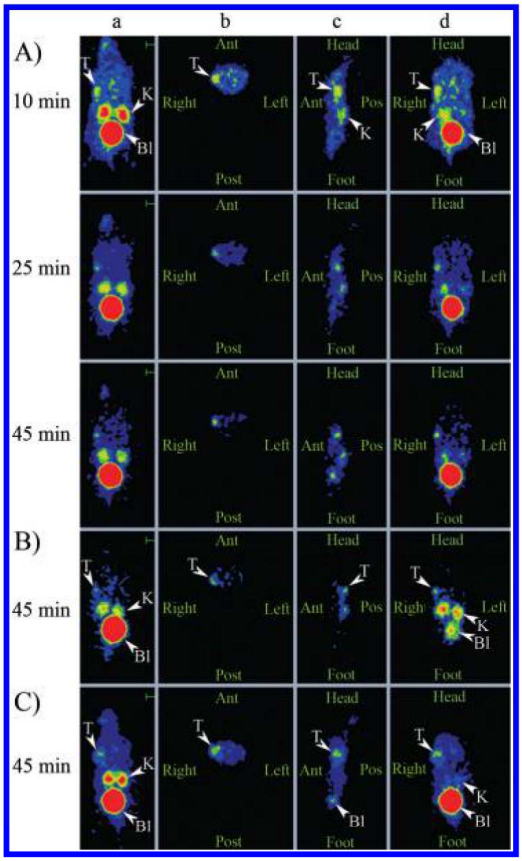


Figure 6. TEP imaging of male nude mice, grafted with HT29 cells in the right flank, injected with ^{68}Ga-DOTA-NT-20.3: (A) images were recorded at different time points after injection of ^{68}Ga-DOTANT-20.3; in the same mouse (tumor volume 40 mm^3), no tumor was detectable on ^{18}F-FDG PET images performed 24 h later; (B) and (C) images recorded 45 min after ^{68}Ga-DOTA-NT-20.3 injection (tumor volumes: 22 and 288 mm^3). Imaging was performed seven (A and B) or twelve days (C) after cell graft. The acquisition time was 10 min a = Maximum Intensity Projection (MIP), frames: b = axial, c = sagittal, and d = coronal. Bl: Bladder. K: Kidney. T: Tumor. ant: anterior. pos: posterior.

(tumor weight: 0.15 ± 0.04% g), 0.45 ± 0.05% and 0.50 ± 0.01% for ^{111}In-DOTA-LB119 (tumor weight: 0.20 ± 0.05% g).

Biodistribution and PET Imaging with ^{68}Ga-DOTA-NT-20.3 and ^{68}Ga-DOTA-LB119. Biodistribution studies were performed 1 h after injection of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 (420 ± 30 pmol, 0.96 ± 0.08 MBq) or ^{68}Ga-DOTA-LB119 (450 ± 50 pmol, 1.2 ± 0.1 MBq). No significant difference was observed between tumor uptake of ^{68}Ga-labeled and ^{111}In-labeled DOTA-NT-20.3, but, probably due to its higher affinity, ^{68}Ga-DOTA-LB119 tumor uptake was significantly increased as compared to ^{111}In-DOTA-LB119 (50% increase, $P < 0.05$). Nevertheless, the tumor uptake of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 was higher than that of ^{68}Ga-DOTA-LB119 ($P < 0.05$).

As observed for the ^{111}In complexes the renal accretion of ^{68}Ga-DOTA-LB119 was lower than that of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 ($P < 0.05$), and for both ^{68}Ga-labeled peptides, the renal uptake was similar to that of the ^{111}In-labeled ones. Tumor to normal tissue uptake ratios were similar or higher for ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 as compared to ^{68}Ga-DOTA-LB119 except for kidneys (0.46 ± 0.06% vs 0.79 ± 0.07%) (Figure 5).

High contrast images were obtained with ^{68}Ga-DOTA-NT20.3, which allowed the visualization of very small tumors (Figure 6). As shown in Figure 6, 22 and 40 mm^3 tumor grafts could be easily detected as soon as 45 min after ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 injection (10 min acquisition). The tumor SUV_{max} 45 min after ^{68}Ga-DOTA-NT-20.3 injection amounted to 0.9 ± 0.1 and the tumor to kidney SUV_{max} ratio was 0.6 ± 0.1. Tumor was not detectable on FDG PET images (not shown).

DISCUSSION

Since radiolabeled neurotensin analogues may be valuable tools for both imaging and therapy of neurotensin receptor-positive tumors, a number of radiolabeled neurotensin analogues, stabilized against enzymatic degradation *in vivo* by changes in the peptide sequence, has been described in the literature. In a series of peptides bearing (N^{α}His)Ac, a chelator of ^{99m}Tc and ^{188}Re, NT-XIX, an NT(8−13) analogue, displayed the most promising properties to target these radionuclides *in vivo*, with low kidney uptake, and reduction of tumor mass was observed after treatment with the rhenium-188-labeled peptide.[39,40] Nevertheless, some intestine uptake may be a source of background for imaging and of toxicity for therapeutic applications. Polyaminopolycarboxylate chelators, such as DTPA or DOTA, coupled to somatostatin analogues have been used with success to deliver various radiometals, including ^{111}In, ^{68}Ga, ^{90}Y, or ^{177}Lu, to somatostatin receptor-positive tumors, such as gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEPNETs). PET imaging with [^{68}Ga-DOTA^0,Tyr^3]octreotate or [^{68}Ga-DOTA^0,Tyr^3]octreotide has been reported to achieve higher diagnostic efficacy than SPECT with ^{111}In-labeled analogues.[24−27] In addition, therapy with [^{90}Y-DOTA^0,Tyr^3]octreotide and [^{177}Lu-DOTA^0,Tyr^3]octreotate provided symptomatic improvement, tumor regression, improved quality of life, and a benefit in overall survival.[15,16] Several DTPA and DOTA neurotensin analogues have been developed to target these radionuclides to tumors overexpressing neurotensin receptors.[18,41,42] However, these radiolabeled peptides showed moderate tumor uptake and comparably high kidney uptake. We recently reported the encouraging results obtained with a new DTPA-neurotensin(6−13) analogue, DTPA-NT-20.3, which displayed improved uptake ratio between tumor and kidneys, superior to previously published DTPA and DOTA neurotensin analogues.[19] High-quality planar scintigraphy and SPECT images were obtained after a short delay, compatible with the use of the short-lived radionuclide ^{68}Ga for PET imaging.

A macrocyclic chelator, such as DOTA, is necessary for targeted radionuclide therapy with ^{90}Y, since *in vivo* leakage of this radionuclide from DTPA complexes leads to bone marrow toxicity.[28] For PET imaging, the *in vivo* stability of ^{68}Ga-DTPA chelates remains a matter of controversy. Then, the aim of the present study was to design new DOTA-substituted neurotensin analogues suitable for ^{68}Ga PET imaging and possibly for ^{90}Y or ^{177}Lu targeted radiotherapy of neurotensin-receptor-positive tumors.

In the three synthesized DOTA-peptides, a Tle^{12} substitution was introduced to protect the bond between Tyr^{11} and Ile^{12}. Since positive charges increase renal uptake,[36,37] the α-NH_2 was neutralized by acetylation, which also protected the peptides against aminopeptidases. In DOTA-NT-20.3, which shares the same peptide sequence with DTPA-NT-20.3, an N-methylation of the Pro^7-Arg^8 bond was introduced for stability. In the triple-stabilized DOTA-LB119, Tyr^{11} was substituted with Dmt and a spacer was introduced between the peptide and the chelator in order to reduce the affinity loss induced by polyaminopolycarboxylate coupling, which we previously observed.[19] In DOTA-NT-20.4, the Arg^8-Arg^9 bond was protected by an N-methylation.

The properties of the ^{111}In labeled DOTA-peptides were evaluated and compared to those of ^{111}In-DTPA-NT-20.3. The affinity decrease induced by DOTA coupling is similar to that observed with DTPA, as indicated by the similar IC_{50} of these two peptides. As already observed for ^{111}In-DTPA-NT-20.3, the DOTA analogue rapidly internalizes *in vitro*. Biodistribution of both peptides was very similar in male nude mice grafted with HT29 cells. Circulating activity decreased rapidly, and high tumor to blood uptake ratios were obtained at early times postinjection. Tumor uptakes of both peptides were not significantly different at any time point and decreased quite slowly with time. Uptake in normal organs was low, leading to high tumor to organs ratio except in kidneys.

The three ^{111}In-DOTA-peptides exhibited receptor mediated tumor targeting, abolished by coinjection of their unlabeled counterpart. N-Methylation of the Pro^7-Arg^8 or of the Arg^8-Arg^9 bonds was similarly effective for *in vivo* stabilization, as shown by the stability results obtained with ^{111}In-DOTA-NT-20.3 and ^{111}In-DOTA-NT-20.4. Probably due to its lower affinity, tumor uptake of ^{111}In-DOTA-NT-20.4 was lower than the two other ^{111}In-DOTA-analogues. Unexpectedly, renal accumulation of this peptide was also higher. Although ^{111}In-DOTA-NT-20.3 and ^{111}In-DOTA-LB119 displayed similar stability and IC_{50}, the tumor uptake of this last peptide was significantly lower at early time points. Renal uptake was also lower at early time points for ^{111}In-DOTA-LB119, as already observed for Dmt^{11} substituted (N^{α}His)Ac-NT(8−13) analogues.[39] In agreement with the biodistribution studies, high contrast images were obtained with ^{111}In-DOTA-NT-20.3 with a clear detection of tumors at early time points.

Since tumor grafts were detected at early time points postinjection with ^{111}In-DOTA-LB119 and particularly ^{111}In-DOTA-NT-20.3, these peptides were further evaluated for ^{68}Ga targeting. Radiolabeling was obtained in good yields with ^{68}Ga, and no free ^{68}Ga was detected after purification. The specific activities obtained allowed the injection of less than 500 pmol per mouse for PET imaging, in order to minimize the saturation of tumor neurotensin receptors. For both peptides, uptake in normal organs, 1 h postinjection, was low except in kidneys. ^{68}Ga-DOTA-NT-20.3 provided reasonably high tumor uptake, higher than that of ^{68}Ga-DOTA-LB119. Very small tumor masses (20−40 mm^3) could be detected with ^{68}Ga-DOTA-NT-20.3 at 45 min after injection.

Metal complexation had an influence on the IC_{50} of the DOTA-peptides. Effects observed with gallium differed according to the peptide. No significant difference was observed with DOTA-NT-20.3, but it enhanced DOTA-LB119 affinity as compared to indium, and the tumor uptake of ^{68}Ga-DOTA-LB119 was significantly increased (by 50%). Yttrium significantly decreased the IC_{50} of both peptides. Such an affinity difference induced by the incorporated metal has already been described in the literature for DOTATOC[43] and bombesin analogues.[44]

CONCLUSION

In summary, in spite of a relatively high uptake in kidneys, ^{111}In-DOTA-NT-20.3 showed specific tumor uptake, provided elevated tumor to other organ uptake ratios, particularly tumor to intestine, and high contrast images at early time points after injection. A very low background in normal tissues, except kidneys, was obtained by PET imaging with ^{68}Ga-DOTA-NT-20.3 which allowed the detection of very small tumors. DOTA-NT-20.3 may be considered a promising candidate for ^{68}Ga-PET imaging of neurotensin receptor-positive tumors, such as pancreatic adenocarcinoma, invasive ductal breast cancer, and non-small cell lung carcinoma. The high affinity observed for the yttrium complex of DOTA-NT-20.3, higher than that of the indium one, suggests that targeting ^{90}Y with this peptide may ensure a higher tumor uptake than with ^{111}In. A prerequisite for therapeutic application of this neurotensin analogue would be to lower kidney uptake, for example, by infusion of basic amino acids, gelofusin, or albumin fragments, to prevent nephrotoxicity, as with radiolabeled somatostatin analogues.[45,46]

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Anne Gruaz-Guyon, Inserm, U773, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, BP 416, F-75018, France. E-mail: anne.gruaz-guyon@inserm.fr, Phone: (33) 1 57 27 75 55, Fax (33) 1 57 27 75 31.

Notes

$^{\Delta}$Faisal Alshoukr and Aurélie Prignon are to be considered as equal coauthors.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by Inserm, by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), and by the Cancéropole Ile de France. We thank the Syrian government for awarding a research fellowship to F.A. We are grateful to Edouard Treca for IC_{50} determination of some peptides.

REFERENCES

(1) Myers, R. M., Shearman, J. W., Kitching, M. O., Ramos-Montoya, A., Neal, D. E., and Ley, S. V. (2009) Cancer, chemistry, and the cell: molecules that interact with the neurotensin receptors. *ACS Chem. Biol. 4*, 503–525.

(2) Vincent, J. P., Mazella, J., and Kitabgi, P. (1999) Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol. Sci. 20*, 302–309.

(3) Evers, B. M. (2006) Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues. *Peptides 27*, 2424–2433.

(4) Thomas, R. P., Hellmich, M. R., Townsend, C. M., Jr., and Evers, B. M. (2003) Role of gastrointestinal hormones in the proliferation of normal and neoplastic tissues. *Endocr. Rev. 24*, 571–599.

(5) Ehlers, R. A., Kim, S., Zhang, Y., Ethridge, R. T., Murrilo, C., Hellmich, M. R., Evans, D. B., Townsend, C. M., Jr., and Mark Evers, B. (2000) Gut peptide receptor expression in human pancreatic cancers. *Ann. Surg. 231*, 838–848.

(6) Reubi, J. C., Waser, B., Friess, H., Buchler, M., and Laissue, J. (1998) Neurotensin receptors: a new marker for human ductal pancreatic adenocarcinoma. *Gut 42*, 546–550.

(7) Souaze, F., Dupouy, S., Viardot-Foucault, V., Bruyneel, E., Attoub, S., Gespach, C., Gompel, A., and Forgez, P. (2006) Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. *Cancer Res. 66*, 6243–6249.

(8) Alifano, M., Souaze, F., Dupouy, S., Camilleri-Broet, S., Younes, M., Ahmed-Zaid, S. M., Takahashi, T., Cancellieri, A., Damiani, S., Boaron, M., Broet, P., Miller, L. D., Gespach, C., Regnard, J. F., and Forgez, P. (2010) Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. 16*, 4401–4410.

(9) Alifano, M., Loi, M., Camilleri-Broet, S., Dupouy, S., Regnard, J. F., and Forgez, P. (2010) Neurotensin expression and outcome of malignant pleural mesothelioma. *Biochimie 92*, 164–170.

(10) Gui, X., Guzman, G., Dobner, P. R., and Kadkol, S. S. (2008) Increased neurotensin receptor-1 expression during progression of colonic adenocarcinoma. *Peptides 29*, 1609–1615.

(11) Shimizu, S., Tsukada, J., Sugimoto, T., Kikkawa, N., Sasaki, K., Chazono, H., Hanazawa, T., Okamoto, Y., and Seki, N. (2008) Identification of a novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinomas: a role for the neurotensin-neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway. *Int. J. Cancer 123*, 1816–1823.

(12) Swift, S. L., Burns, J. E., and Maitland, N. J. (2010) Altered expression of neurotensin receptors is associated with the differentiation state of prostate cancer. *Cancer Res. 70*, 347–356.

(13) Reubi, J. C., Waser, B., Schaer, J. C., and Laissue, J. A. (1999) Neurotensin receptors in human neoplasms: high incidence in Ewing's sarcomas. *Int. J. Cancer 82*, 213–218.

(14) Dupouy, S., Viardot-Foucault, V., Alifano, M., Souaze, F., Plu-Bureau, G., Chaouat, M., Lavaur, A., Hugol, D., Gespach, C., Gompel, A., and Forgez, P. (2009) The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression. *PLoS One 4*, e4223.

(15) Kwekkeboom, D. J., Kam, B. L., van Essen, M., Teunissen, J. J., van Eijck, C. H., Valkema, R., de Jong, M., de Herder, W. W., and Krenning, E. P. (2010) Somatostatin-receptor-based imaging and therapy of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr. Relat. Cancer 17*, R53–73.

(16) Krenning, E. P., Teunissen, J. J., Valkema, R., deHerder, W. W., deJong, M., and Kwekkeboom, D. J. (2005) Molecular radiotherapy with somatostatin analogs for (neuro-)endocrine tumors. *J. Endocrinol. Invest. 28*, 146–150.

(17) Granier, C., van Rietschoten, J., Kitabgi, P., Poustis, C., and Freychet, P. (1982) Synthesis and characterization of neurotensin analogues for structure/activity relationship studies. Acetyl-neurotensin-(8−13) is the shortest analogue with full binding and pharmacological activities. *Eur. J. Biochem. 124*, 117–124.

(18) Hillairet De Boisferon, M., Raguin, O., Thiercelin, C., Dussaillant, M., Rostene, W., Barbet, J., Pelegrin, A., and Gruaz-Guyon, A. (2002) Improved tumor selectivity of radiolabeled peptides by receptor and antigen dual targeting in the neurotensin receptor model. *Bioconjugate Chem. 13*, 654–662.

(19) Alshoukr, F., Rosant, C., Maes, V., Abdelhak, J., Raguin, O., Burg, S., Sarda, L., Barbet, J., Tourwe, D., Pelaprat, D., and Gruaz-Guyon, A. (2009) Novel neurotensin analogues for radioisotope targeting to neurotensin receptor-positive tumors. *Bioconjugate Chem. 20*, 1602–1610.

(20) Maecke, H. R., Hofmann, M., and Haberkorn, U. (2005) (68)Ga-labeled peptides in tumor imaging. *J. Nucl. Med. 46* (Suppl 1), 172S–178S.

(21) Wei, L., Zhang, X., Gallazzi, F., Miao, Y., Jin, X., Brechbiel, M. W., Xu, H., Clifford, T., Welch, M. J., Lewis, J. S., and Quinn, T. P. (2009) Melanoma imaging using (111)In-, (86)Y- and (68)Ga-labeled CHX-A″-Re(Arg11)CCMSH. *Nucl. Med. Biol. 36*, 345–354.

(22) Mansi, R., Wang, X., Forrer, F., Kneifel, S., Tamma, M. L., Waser, B., Cescato, R., Reubi, J. C., and Maecke, H. R. (2009) Evaluation of a 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid-conjugated bombesin-based radioantagonist for the labeling with single-photon emission computed tomography, positron emission tomography, and therapeutic radionuclides. *Clin. Cancer Res. 15*, 5240–5249.

(23) Pagou, M., Zerizer, I., and Al-Nahhas, A. (2009) Can gallium-68 compounds partly replace (18)F-FDG in PET molecular imaging? *Hell. J. Nucl. Med. 12*, 102–105.

(24) Buchmann, I., Henze, M., Engelbrecht, S., Eisenhut, M., Runz, A., Schafer, M., Schilling, T., Haufe, S., Herrmann, T., and Haberkorn, U. (2007) Comparison of 68Ga-DOTATOC PET and 111In-DTPAOC (Octreoscan) SPECT in patients with neuroendocrine tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 34*, 1617–1626.

(25) Hofmann, M., Maecke, H., Borner, R., Weckesser, E., Schoffski, P., Oei, L., Schumacher, J., Henze, M., Heppeler, A., Meyer, J., and Knapp, H. (2001) Biokinetics and imaging with the somatostatin receptor PET radioligand (68)Ga-DOTATOC: preliminary data. *Eur. J. Nucl. Med. 28*, 1751–1757.

(26) Gabriel, M., Decristoforo, C., Kendler, D., Dobrozemsky, G., Heute, D., Uprimny, C., Kovacs, P., Von Guggenberg, E., Bale, R., and Virgolini, I. J. (2007) 68Ga-DOTA-Tyr3-octreotide PET in neuroendocrine tumors: comparison with somatostatin receptor scintigraphy and CT. *J. Nucl. Med. 48*, 508–518.

(27) Kowalski, J., Henze, M., Schuhmacher, J., Macke, H. R., Hofmann, M., and Haberkorn, U. (2003) Evaluation of positron emission tomography imaging using [68Ga]-DOTA-D Phe(1)-Tyr(3)-Octreotide in comparison to [111In]-DTPAOC SPECT. First results in patients with neuroendocrine tumors. *Mol. Imaging Biol. 5*, 42–48.

(28) Liu, S. (2008) Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Adv. Drug Delivery Rev. 60*, 1347–1370.

(29) Wang, D., Miller, S. C., Sima, M., Parker, D., Buswell, H., Goodrich, K. C., Kopeckova, P., and Kopecek, J. (2004) The arthrotropism of macromolecules in adjuvant-induced arthritis rat model: a preliminary study. *Pharm. Res. 21*, 1741–1749.

(30) Brans, L., Maes, V., Garcia-Garayoa, E., Schweinsberg, C., Daepp, S., Blauenstein, P., Schubiger, P. A., Schibli, R., and Tourwe, D. A. (2008) Glycation methods for bombesin analogs containing the (NalphaHis)Ac chelator for 99mTc(CO)3 radiolabeling. *Chem. Biol. Drug Des. 72*, 496–506.

(31) Raguin, O., Gruaz-Guyon, A., and Barbet, J. (2002) Equilibrium expert: an add-in to Microsoft Excel for multiple binding equilibrium simulations and parameter estimations. *Anal. Biochem. 310*, 1–14.

(32) Stefanovski, D., Moate, P. J., and Boston, R. C. (2003) WinSAAM: a windows-based compartmental modeling system. *Metabolism 52*, 1153–1166.

(33) Riches, A. C., Sharp, J. G., Thomas, D. B., and Smith, S. V. (1973) Blood volume determination in the mouse. *J. Physiol. 228*, 279–284.

(34) Sung, C., Youle, R. J., and Dedrick, R. L. (1990) Pharmacokinetic analysis of immunotoxin uptake in solid tumors: role of plasma kinetics, capillary permeability, and binding. *Cancer Res. 50*, 7382–7392.

(35) Covell, D. G., Barbet, J., Holton, O. D., Black, C. D., Parker, R. J., and Weinstein, J. N. (1986) Pharmacokinetics of monoclonal immunoglobulin G1, F(ab′)2, and Fab′ in mice. *Cancer Res. 46*, 3969–3978.

(36) Akizawa, H., Arano, Y., Mifune, M., Iwado, A., Saito, Y., Mukai, T., Uehara, T., Ono, M., Fujioka, Y., Ogawa, K., Kiso, Y., and Saji, H. (2001) Effect of molecular charges on renal uptake of 111In-DTPA-conjugated peptides. *Nucl. Med. Biol. 28*, 761–768.

(37) Froidevaux, S., Calame-Christe, M., Tanner, H., and Eberle, A. N. (2005) Melanoma targeting with DOTA-alpha-melanocyte-stimulating hormone analogs: structural parameters affecting tumor uptake and kidney uptake. *J. Nucl. Med. 46*, 887–895.

(38) Barroso, S., Richard, F., Nicolas-Etheve, D., Reversat, J. L., Bernassau, J. M., Kitabgi, P., and Labbe-Jullie, C. (2000) Identification of

residues involved in neurotensin binding and modeling of the agonist binding site in neurotensin receptor 1. *J. Biol. Chem. 275*, 328–336.

(39) Garcia-Garayoa, E., Blauenstein, P., Blanc, A., Maes, V., Tourwe, D., and Schubiger, P. A. (2009) A stable neurotensin-based radiopharmaceutical for targeted imaging and therapy of neurotensin receptor-positive tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 36*, 37–47.

(40) Maes, V., Garcia-Garayoa, E., Blauenstein, P., and Tourwe, D. (2006) Novel 99mTc-labeled neurotensin analogues with optimized biodistribution properties. *J. Med. Chem. 49*, 1833–1836.

(41) Achilefu, S., Srinivasan, A., Schmidt, M. A., Jimenez, H. N., Bugaj, J. E., and Erion, J. L. (2003) Novel bioactive and stable neurotensin peptide analogues capable of delivering radiopharmaceuticals and molecular beacons to tumors. *J. Med. Chem. 46*, 3403–3411.

(42) de Visser, M., Janssen, P. J., Srinivasan, A., Reubi, J. C., Waser, B., Erion, J. L., Schmidt, M. A., Krenning, E. P., and de Jong, M. (2003) Stabilised 111In-labelled DTPA- and DOTA-conjugated neurotensin analogues for imaging and therapy of exocrine pancreatic cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 30*, 1134–1139.

(43) Froidevaux, S., Eberle, A. N., Christe, M., Sumanovski, L., Heppeler, A., Schmitt, J. S., Eisenwiener, K., Beglinger, C., and Macke, H. R. (2002) Neuroendocrine tumor targeting: study of novel gallium-labeled somatostatin radiopeptides in a rat pancreatic tumor model. *Int. J. Cancer 98*, 930–937.

(44) Koumarianou, E., Mikolajczak, R., Pawlak, D., Zikos, X., Bouziotis, P., Garnuszek, P., Karczmarczyk, U., Maurin, M., and Archimandritis, S. C. (2009) Comparative study on DOTA-derivatized bombesin analog labeled with 90Y and 177Lu: in vitro and in vivo evaluation. *Nucl. Med. Biol. 36*, 591–603.

(45) de Jong, M., Rolleman, E. J., Bernard, B. F., Visser, T. J., Bakker, W. H., Breeman, W. A., and Krenning, E. P. (1996) Inhibition of renal uptake of indium-111-DTPA-octreotide in vivo. *J. Nucl. Med. 37*, 1388–1392.

(46) Vegt, E., van Eerd, J. E., Eek, A., Oyen, W. J., Wetzels, J. F., de Jong, M., Russel, F. G., Masereeuw, R., Gotthardt, M., and Boerman, O. C. (2008) Reducing renal uptake of radiolabeled peptides using albumin fragments. *J. Nucl. Med. 49*, 1506–1511.

XI.3. Discussion

Les affinités des nouveaux analogues couplés à un DOTA au lieu d'un DTPA ont été déterminées après couplage à un métal non radioactif pour être les plus proches des composés radiomarqués car il a été décrit que le métal pouvait avoir un impact majeur sur l'affinité.

Ainsi les affinités des composés DOTA(In)-NT20.3 ; DOTA(Ga)-NT20.3 se sont révélées être quasiment identiques au DTPA(In)-NT20.3, c'est-à-dire diminuées d'un facteur 7 par rapport au ligand natif NT (8-13). L'introduction du chélate DOTA à la place du chélate DTPA n'a pas perturbé la liaison du ligand pour son récepteur. Le DOTA(In)-LB119 a présenté des caractéristiques d'affinité et de liaison voisines de celle de DOTA(In)-NT-20.3.

Par contre la méthylation de la liaison Arg^8-Arg^9 dans DOTA(In)-NT-20.4 a diminué l'affinité d'un facteur 13 par rapport à la méthylation de la liaison Pro^7-Arg^8. Ceci peut être attribué à l'importance de l'Arg^9 pour la liaison au récepteur. *In vivo* sa localisation tumorale a été faible, en accord avec sa faible affinité, malgré une stabilité voisine de celle de DOTA(In)-NT-20.3 indiquant que la liaison Arg^8-Arg^9 est protégée de façon équivalente par une méthylation de l'une ou l'autre des arginines.

DOTA(In)-LB119 a présenté des caractéristiques d'affinité et de liaison voisines de celle de DOTA(In)-NT-20.3. Sa stabilité *in vivo* n'a été que légèrement augmentée, malgré la stabilisation de 3 liaisons dans ce dérivé. Le marquage tumoral et rénal obtenu *in vivo* était plus faible qu'observé avec DOTA(^{111}In)-NT-20.3. La plus faible vitesse d'internalisation de ce peptide, d'un facteur 5 environ, pourrait être responsable du plus faible marquage tumoral.

Comme cela avait déjà été observé pour DTPA(^{111}In)-NT20.3, l'analogue DOTA a été rapidement internalisé *in vitro* dans les cellules HT29. 1 heure après injection ; les biodistributions *in vivo* des deux peptides ne présentaient pas de différence significative, avec une captation tumorale élevée notamment pour DOTA(^{111}In)-NT20.3 (4,7%ID/g contre 3,05%ID/g pour DTPA(^{111}In)-NT20.3), une rapide diminution de l'activité circulante (0,13%ID/g pour DTPA(^{111}In)-NT20.3 contre 0,36%ID/g pour DOTA(^{111}In)-NT20.3), suggérant peut-être une moins bonne stabilité *in vivo* du complexe DOTA-indium-111.

DOTA-NT20.3, le peptide ayant démontré les meilleures caractéristiques *in vivo,* a été évalué pour l'imagerie TEP au gallium-68. Nous avons réalisé son radiomarquage en moins de 30 min grâce à un automate Raytest entièrement piloté par un ordinateur. Nous sommes partis d'une activité totale de 200 à 300MBq de gallium-68 et d'une quantité de peptide de 28 nmol et nous avons obtenu un rendement de marquage corrigé de la décroissance du gallium-68 de l'ordre de 67±9 %, avec une activité spécifique de 2,5 à 4,5 MBq/nmol. Celle-ci permet d'injecter moins de 500 pmol par souris et d'éviter ainsi la saturation des récepteurs par un excès de peptide non marqué. L'imagerie TEP réalisée seulement 7 jours après la greffe tumorale a détecté de petites tumeurs de 40 mm^3

seulement 25min après injection du traceur ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 et a permis, 45min après l'injection, d'obtenir un SUVmax de 0,9±0.1 dans les tumeurs avec un rapport tumeur/reins de 0,6±0,1 alors que ces tumeurs n'étaient pas visibles à l'aide de l'imagerie TEP réalisée 24h après avec du ^{18}F-FDG. Les biodistributions *ex vivo* réalisées 1h après injection ont permis d'obtenir des valeurs de 5,4±0.5 % ID/g dans la tumeur et 11±2 % ID/g dans les reins, valeurs non significativement différentes de celles obtenues avec DOTA(^{111}In)-NT20.3.
DOTA-LB119 a aussi été marqué au gallium-68 et comparé *ex vivo* à l'aide d'une expérience de biodistributions au DOTA-NT20.3.

Les aires sous la courbe (AUC) du radiotraceur DOTA(^{111}In)-NT20.3 calculées à partir des données de biodistribution obtenues chez les souris représentent la concentration du traceur dans la tumeur, les reins ou le sang en fonction du temps. De manière intéressante, l'affinité des DOTA (métal)-NT20.3 marqués à l'indium, au gallium ou à l'yttrium montre que le complexe avec l'yttrium a une affinité significativement deux fois plus élevée que celle du complexe avec l'indium ou avec le gallium. Cette augmentation d'affinité procurée par l'yttrium avait déjà été montrée avec les analogues de la somatostatine (Froidevaux *et al.*, 2002) et les analogues de la bombésine (Koumarianou *et al.*, 2009). On pourrait ainsi envisager le DOTA-NT20.3 comme agent de thérapie ciblée couplé à l'yttrium-90 et supposer que le marquage tumoral de ^{90}Y-DOTA-NT20.3 serait deux fois plus élevé que celui obtenu avec ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 ou avec ^{111}In-DOTA-NT20.3 et donc que l'AUC de la tumeur serait deux fois plus élevée.
Parmi les analogues de la NT étant parvenus à l'essai clinique, les meilleurs résultats précliniques d'imagerie TEMP ont été obtenus avec le ^{99m}Tc-NT XIX, qui présentait une captation tumorale de 3,9 %ID/g 1h30 après injection et une rétention rénale du traceur de 14,6%ID/g toujours dans le modèle HT29 (Bruehlmeier *et al.*, 2002), de plus cet analogue entrainait une accumulation digestive élevée, révélée par un bruit de fond élevé sur les images et donc un risque de toxicité pour les applications thérapeutiques. Les résultats obtenus avec des dérivés portant un chélatant polyaminopolycarboxylique, étaient beaucoup moins satisfaisants avec un marquage tumoral faible et une fixation rénale importante.
En dépit de l'accumulation rénale de ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 qui reste de 11% de la dose injectée par gramme 1h après injection, ce peptide procure un marquage tumoral tout à fait satisfaisant et comparable au seul peptide marqué au gallium-68 décrit dans la littérature (Maschauer *et al.*, 2010) qui obtenait, dans le même modèle tumoral HT29, un SUVmax bien plus faible dans la tumeur de 0,16, un pourcentage de la dose injectée par gramme 65 min après injection de 8 % dans les reins et de 0,7% dans la tumeur.
Le ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 permet ainsi l'obtention d'images bien contrastées dans des temps courts

seulement 45 min après l'injection, grâce à une faible accumulation du traceur dans les organes sains et notamment dans la région intestinale. Ce peptide est donc un bon candidat pour l'imagerie TEP des tumeurs surexprimant le NTR1 par rapport au tissu sain comme l'adénocarcinome pancréatique, le cancer colorectal, le carcinome ductal invasif et le cancer du poumon non à petites cellules.

XII. ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 pour l'imagerie TEP du cancer

XII.1. Introduction

Nous avions choisi le modèle le modèle de greffe de cellules de la lignée HT29, de tumeurs d'adénocarcinome colique surexprimant le NTR1, pour les études préliminaires *in vivo* car c'était celui le plus utilisé dans la littérature et cela nous permettait donc de comparer les performances de nos traceurs à celles des autres traceurs décrits. Le DOTA-NT20.3 marqué au gallium-68 nous ayant donné des résultats encourageants dans ce modèle il nous paraissait fondamental de démontrer l'intérêt du ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 dans d'autres types de tumeurs exprimant le NTR1 et particulièrement l'adénocarcinome pancréatique. En effet, le cancer colorectal bénéficie d'un dépistage organisé et son diagnostic précoce par coloscopie permet d'obtenir un taux de survie de 90 % à 5 ans, pour les stades localisés.

En revanche, l'adénocarcinome pancréatique exocrine est une maladie dévastatrice qui évolue silencieusement et métastase rapidement vers d'autres organes (foie, ganglions lymphatiques, péritoine), par conséquent la majorité des patients sont à un stade avancé de la maladie au moment du diagnostic, et seulement 20% des patients sont éligibles pour une résection chirurgicale curative (Audrey Vincent *et al.*).

Le diagnostic initial et la stadification de la maladie sont couramment réalisés en utilisant la TDM, l'IRM et l'échographie endoscopique (Holzapfel *et al.*, 2011) (Canto *et al.*, 2012), mais ces méthodes d'imagerie ne sont pas très efficaces pour la détection de l'invasion et des petites métastases (Parsons *et al.*, 2008). La TEP/TDM utilisant le ^{18}F-FDG permet de détecter efficacement les tumeurs pancréatiques primitives et les métastases hépatiques généralement manquées par la TDM et l'IRM (Pakzad *et al.*, 2006). Son utilisation dans la stadification tumorale est limitée par une sensibilité relativement faible dans la détection des ganglions lymphatiques métastatiques.
De plus, l'hypermétabolisme du ^{18}F-FDG dans la caractérisation de masses pancréatiques de nature inflammatoires réduisent sa spécificité (Sandrasegaran *et al.*, 2013, Sampath Santhosh *et al.*, 2013b). La découverte de radiotraceurs plus spécifiques des PDAC que le ^{18}F-FDG pourrait permettre de pallier les limitations de cette technique.

Les NTRs ne sont pas détectés dans le pancréas exocrine normal ainsi que dans la pancréatite chronique alors qu'ils sont surexprimés dans la plupart des PDAC (J. C. Reubi *et al.*, 1998) et dans

les métastases hépatiques (Korner *et al.*, 2015). Par conséquent, les analogues radiomarqués de la NT pourraient être des outils efficaces pour améliorer la détection des PDAC et envisager leur radiothérapie ciblée.

Nous avons donc souhaité quantifier l'expression du NTR1 dans des échantillons de « tissue micro array » (TMA) provenant d'une cohorte locale de patients opérés pour un cancer du pancréas et les comparer aux données de la littérature.

Nous avons ensuite évalué le potentiel du ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 comme traceur TEP pour l'imagerie du cancer du pancréas humain. Nous avons utilisé la lignée de cellules d'adenocarcinome pancréatique humain AsPC1, exprimant le NTR1 de façon plutôt faible (Na *et al.*, 2015), greffée en sous cutané ou en orthotopique pour être plus proche de la pathologie humaine. Puis, nous avons vérifié si le radiotraceur ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 était capable de faire la distinction entre une tumeur de PDAC et une pancréatite expérimentale induite par hyperstimulation à la caeruléine, un des points faibles du traceur métabolique ^{18}F-FDG en TEP.

XII.2. Article 3: Evaluation du ^{68}Ga-DOTA-NT20 3 comme agent d'imagerie TEP pour la détection de l'expression du NTR1 dans un modèle d'adénocarcinome pancréatique

Evaluation of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 as a PET imaging agent for neurotensin receptor-1 expression in a model of exocrine pancreatic adenocarcinoma.

Prignon A.[1], Provost C.[1], Alshoukr F.[6], Wendum D.[3], Couvelard A.[4], Barbet J.[5], Forgez P.[6], Talbot JN.[2], and Gruaz-Guyon A.[7]

Authors information

[1] Laboratoire d'Imagerie Moléculaire Positonique (LIMP), UMS28 Phénotypage du petit animal, Sorbonne Universités, Paris, France

[2] Nuclear medicine department AP-HP, Tenon Hospital, Sorbonne Universities, Paris, France

[3] Pathology Department Saint-Antoine Hospital, Sorbonne Universitiess, Paris, France,

[4] Pathology Department AP-HP Bichat-Claude Bernard Hospital, DHU Unity, Paris-Diderot University, Paris, France.

[5] GIP Arronax, Saint-Herblain, France

[6] UMRS 1007, Paris Descartes University, Paris, France

[7] Inserm U773-CRB3, DHU Unity, Paris-Diderot University, Paris, France.

Abstract

Purpose

In a search of new diagnostic and treatment strategies, this study assessed the expression of neurotensin receptor 1 (NTR1) in human pancreatic cancer and the feasibility of NTR1 PET imaging in animal models of human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) for detecting the tumour and for discriminating PDAC from pancreatitis.

Methods

NTR1 expression was evaluated by immunohistochemistry in tissue microarray samples from patients with PDAC. An analogue of neurotensin, DOTA-NT20.3, was radiolabelled with gallium 68 (^{68}Ga) and assessed for NTR1 imaging in mice bearing subcutaneous or orthotopic AsPC-1 (human PDAC) xenografts. Binding specificity was demonstrated by co-injection of excess unlabeled NT20.3. Uptake of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 was evaluated in comparison with ^{18}F-FDG in a caerulein-hyperstimulation model of acute pancreatitis.

Results

A 56% rate of NTR1 expression was found in specimens of human PDAC. ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 PET allowed detection of AsPC-1 tumours as early as 10 min p.i. High-contrast images were obtained between 40 and 50 min p.i. with a tumour to non-tumour SUV_{max} ratio of 3.9 ± 1 (n=4). No uptake was seen in pancreas. Excretion in urine reached 61% of injected dose (ID) in bladder 50 minutes p.i. ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 accumulation in kidneys was moderate (5% of ID, 45 min p.i.). *Ex vivo* biodistribution, investigated 1 h p.i., showed high uptake in AsPC1 tumours (5.28 ± 0.93 %ID/g), moderate kidney retention (5.38 ± 0.54 %ID/g), low uptake in pancreas (0.22 ± 0.03 %ID/g) and in remaining organs. Blocking experiments confirmed binding specificity. ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 was more specific than ^{18}F-FDG for differentiating tumour from pancreatitis with higher tumour selectivity and lower uptake in pancreatic inflammation.

Conclusions

NTSR1 is frequently expressed in human PDAC and ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 has favorable pharmacokinetics and biodistribution resulting in high quality PET images. ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 is a promising PET imaging probe for targeting human PDAC overexpressing NTR1.

Keywords PET imaging. Gallium-68, radiotracer. Neurotensin receptor. Pancreatic ductal adenocarcinoma.

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most lethal cancers worldwide. Early-stage PDAC is usually asymptomatic; consequently, the majority of patients have developed advanced disease at the time of diagnosis. Only 20% of patients are eligible for curative surgical resection [1]. Despite aggressive treatment protocols, including surgery in case of resectable tumour, chemotherapy, and radiotherapy, the overall 5-year survival rate of approximately 7% has remained unchanged over the last decade [2].

Initial diagnosis and disease staging are commonly accomplished using computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), and endoscopic ultrasonography [3, 4]. Although they provide excellent anatomic details, they may not depict small tumours or metastases [5]. Patients would clearly benefit from an early and accurate diagnosis tool detecting pancreatic malignancies and monitoring therapeutic response [6].

Molecular imaging allows for the noninvasive assessment of physiologic and pathologic processes at the cellular or molecular level [7]. Positron-emission tomography coupled to computed tomography (PET/CT) using 2-[^{18}F] fluoro-deoxyglucose (^{18}F-FDG) could help to the diagnosis and the management of patients. It can effectively detect primary pancreatic tumours and hepatic metastases commonly missed by CT and MRI [8]. ^{18}F-FDG PET/CT was also reported to distinguish benign from malignant intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs) of the pancreas [8, 9].

Nevertheless, ^{18}F-FDG is not sensitive enough, for characterizing small intrapancreatic lesions or detecting small sized metastases particularly in lymph nodes. FDG also lacks specificity in differentiating between PDAC and focal mass pancreatitis (FMP) [9, 10].

One approach to improve functional imaging is to take advantage of the abnormal expression of membrane receptors in early stage of PDAC, as compared to normal tissue or benign tumours.

Neurotensin (NT), a 13-amino acid gastrointestinal (GI) peptide, regulates GI functions including stimulation of pancreatic and biliary secretion, colonic motility, and growth of normal intestinal mucosa and pancreas, and consequently contributes in the digestion of nutriments. NT action is mediated by three receptors. Two are G protein coupled receptors: the high affinity neurotensin receptor (NTR1) and the low affinity neurotensin receptor (NTR2). NTR3 is a single transmembrane receptor localized mainly in the Trans-Golgi network and acts as a sorting protein [11]. Moreover, NT is involved in the progression of various solid tumours. Those effects are mainly associated with an over expression of NTR1 [12, 13]. NTRs are not detected in normal exocrine pancreas as well as in chronic pancreatitis whereas they are over expressed in most PDAC [14] and in liver metastases [15]. Therefore, over-expression of NTR1 could be considered as a

target to diagnose and localise PDAC using a non-invasive, nuclear medicine imaging probes, such as a radiolabelled NTR1 ligand.

To confirm the potential interest of such an imaging probe, NTR1 expression was evaluated in tissue microarrays from a local cohort of patients operated for pancreatic cancer and the results were compared to the previous literature data.
Then, a DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) conjugated NT analogue was used to image NTR1 in experimental tumours. The previously published analogue DOTA-NT20.3, which exhibited the best performance in a human colon carcinoma model [16], was radiolabelled with gallium-68 (^{68}Ga-DOTA-NT20.3) and tested as a PET tracer for imaging over-expression of NTR1 in animal models of human PDAC. using the pancreas cancer cell line AsPC1 (NTR1 positive at low level) [17]. We also checked whether ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 uptake was able to discriminate between PDAC tumour and experimental pancreatitis, a drawback of the metabolic PET tracer ^{18}F FDG.

Materials and methods

NTR1 Immunohistochemistry

Immunohistochemistry on tissue microarrays (TMA) were used to detect the expression of NTR1 in resected pancreatic adenocarcinoma of patients. Data from pancreas cancers of fifty patients who underwent surgery for a pancreatic ductal carcinoma in Beaujon Hospital (Clichy, France) between 2000 and 2004 were retrospectively studied. Clinical parameters were the following: 26 women and 24 men, aged 61 ± 9 years, tumour size 32 ± 14 cm, patients were scored pT1N0 = 1, pT1N1 = 1, pT2N0 =1, pT2N1 = 2, pT3N0 = 5 and, pT3N1 = 40. This investigation was conducted in accordance with the ethical standards and approved by the Institutional Review Board (IRB) of Paris North Hospitals, Paris 7 University, AP-HP, N° 12-059.
Deparaffinised tissue sections (4 µm) were subjected to heat-induced epitope retrieval in citrate buffer (pH 6.0). The sections were labelled for the target proteins using the avidin-biotin-peroxidase complex method. The slides were incubated at room temperature for 1 h with NTR1 antibody. The slides were then incubated with biotinylated anti-goat IgG, Vector laboratories, Inc). The antigen-antibody complex was revealed with avidin-biotin-peroxidase complex, according to the manufacturer's instructions (Vectastain ABC Kit, Vector laboratories, Inc.). NTR1 staining was done with diamino-benzidine tetrahydrochloride. All slides were counterstained with hematoxylin then scored by a pathologist (DW, or AC). The immunohistochemical staining was evaluated in a

semiquantitative manner: the localization of the staining was noted (cytoplasmic, membranous, nuclear) and a score (0-300) was calculated, obtained by multiplying the labelling intensity (negative scored as 0, weak as 1, moderate as 2 and strong scored as 3) by percentage of stained cells (0 to 100%). Deparaffinised tumours or tissues sections from animal models (4 µm) were subjected to the same protocol.

PET imaging agents

The DOTA-NT20.3 peptide (Ac-Lys(DOTA)-Pro-Me-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH) was produced by Pichem and kindly provided by Iason GmbH. It was labeled with ^{68}Ga as previously reported by Alshoukr et al. [16]. Details and quality controls are presented in the Supplementary data. Industrially produced ^{18}F-FDG was obtained from the Nuclear Medicine department of Tenon hospital.

Animal models

All animal experiments were carried out in compliance with the French laws relating to the conduct of animal experimentation. The subcutaneous tumours (group 2) were developed by injection of $4x10^6$ cells of the human pancreatic cell line AsPC-1 (ATCC, Rockville, MD, USA) in a 1:1 mixture of matrigel (BD Biosciences) in the right shoulder of Male or female immunodeficient mice (Nu/nu, Charles River, France) (5-6 weeks old).

The orthotopic tumours (group 3) were developed by surgical injection of AsPC-1 cells into the head of the pancreas (Hoffman, 1999). The immunodeficient mice (Nu/nu were anesthetized with isoflurane and analgesic treatment with 0.1 mg Carprofen (Rimadyl®, Pfizer) was applied 1 h before and 24 h after surgery. A small (<1cm) incision was made in the left abdominal flank, through which the spleen was pulled out, allowing access to the pancreas. AsPC-1 cells (5×10^6) in 100 µL PBS were injected into the head of the pancreas. After inoculation, the organs were gently pushed back in the abdomen and the wound was closed in one layer with wound clips.

A caerulein-hyperstimulation model of acute pancreatitis (group 4) was reproduced (Lerch *et al.*, 2013). Pancreatitis was induced in Female C57Bl6 mice (5 to 10 weeks old) (Charles River, France) by administration of seven hourly intraperitoneal injections of 50 µg/kg caerulein (Sigma, France). Control mice received comparable injections of 0.9 mg/mL sodium chloride (NaCl). Mice were sacrificed 7 h following the first injection of caerulein or saline during acute phase.

A schematic overview of the experimental design is presented below (Fig. 1).

PET imaging and analysis

Nu/nu mice (group 1) and subcutaneous AsPC-1 tumour-bearing mice (group 2, 4 weeks after cells implantation) received an i.v. injection of 1 to 4 MBq of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 (~ 400 pmol) via the retroorbitary sinus. Using a small-animal PET system (Mosaic, Philips Medical systems, Cleveland, OH, USA), dynamic PET imaging over 50 min was performed immediately p.i. PET data were dynamically sorted into 3D sinograms, the first series was 5×1min with 1 min between each sinogram and the second series was 4×10 min. All sinograms were reconstructed in 3D Standardized Uptake Value (SUV) images and visualized as Maximum Intensity Projection (MIP).
For all the following experiments, static PET acquisitions were performed during an exposure time of 10 minutes, 45 min after injection of radiotracers. Other subcutaneous AsPC-1 tumour-bearing mice from group 2 were submitted to a check of specificity of the uptake (blocking study). Mice received ~ 2.4MBq of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 (~ 420pmol), co-injected or not with 180 nmol of non-labelled NT20.3 peptide, which represents more than 400-fold excess of cold peptide. Orthotopic AsPC-1 tumour-bearing mice from group 3 were imaged 2 and 4 weeks after tumour inoculation with ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 or after a fasting period of 12 hours with ^{18}F-FDG. Every mouse received an injection of about 1.5 MBq. For the pancreatitis model (group 4), 6 h 45 following the first injection of caerulein or saline, ^{18}F-FDG or ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 PET imaging was performed during expected acute phase of pancreatitis, as described by Lerch et al. [19]. Mice received an injection of about 3 MBq. (Fig. 1).
Processing of reconstructed images was performed with the Syntegra–Philips software (PETView; Philips Medical Systems). For each mouse, 3D volumes of interest (VOIs) were drawn manually by irregular contouring on PET images as follows: total mouse, heart, kidneys, tumour and urinary bladder. Visual determination of VOIs was performed by consensus of two operators. The total number of voxels/organ was divided by the number of voxels into the “total mouse” per frame. Data were expressed as % ID (injected dose)/organ per frame and the decay-corrected mean time-activity curves (TACs) were extracted for each target organ and tumour.
Tracer uptake in tumour was quantified using maximum of the standardized uptake values in the VOI (SUVmax, g/mL). The distribution of SUVmax values was reported as the mean ± standard deviation (S.D) at each time point for tumour and “non-tumour” measured on background close to the tumour area. The tumour-to-non-tumour (T/NT) uptake ratios were calculated from SUVmax.

Ex-vivo biodistribution studies

After imaging, 1 h p.i. of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3, mice from group 2 were sacrificed and main organs

and tissues were dissected, washed, weighed, and counted in a gamma-counter (1480 Wizard 3, Perkin Elmer). Tumour or tissue uptake was expressed as mean ± SD percentage injected dose/gram (%ID/g), corrected for radionuclide decay. Mice of the blocking study were also sacrificed 1h p.i. of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 and tumour uptake (%ID/g) was compared to that obtained in the presence of unlabeled NT20.3 peptide at the same time point. Mice with orthotopic tumours (group 3, 4 weeks after tumour implantation) were sacrificed 1 h p.i. of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 or ^{18}F-FDG. Mice with induced pancreatitis (group 4, 7h following the first injection of caerulein or saline) were sacrificed 1 h p.i. of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 or ^{18}F-FDG. Tumour uptake (%ID/g) was reported for each radiotracer.

Statistical analysis

Quantitative data are presented as mean ± SD and were compared using t test for independent or for paired samples or using one-way ANOVA followed by Bonferroni test for multiple comparisons. Statistical analysis was performed using Prism 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Level of significance was $P<0.05$.

Results

NTR1 expression in human PDAC

NTR1 labelling was analyzed in TMA from 50 patients. Examples of positive and negative labelling in TMA spot are shown in Fig. 2. Labelling was scored according to the intensity and the percentage of labelled tumour cells, in 9 patients (18 %) specimens were considered strongly positive and in 19 patients (38 %) specimens were scored positive. The other tumours had a weak staining and one was considered as negative. Altogether 56% of PDAC positively expressed NTR1.

PET imaging and biodistribution of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 in a mouse model bearing human pancreatic adenocarcinoma

Dynamic PET imaging was performed during 50 min after ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 injection in healthy nu/nu mice (group 1: 3 female and 3 male, Supplementary Data) and in nu/nu mice with 300 to 500 mm^3 subcutaneous ASPC1 tumours (group 2). Time activity curves (TACs) were generated by VOI analysis.

Four AsPC-1 tumour–bearing male mice received 3 ± 0.8 MBq; (423 ± 53 pmol) of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3. AsPC-1 tumours were clearly visible as early as 10 min p.i and easy to differentiate from

non-tumour tissue (Fig. 3a). High-contrast images were obtained between 40 and 50 min p.i. SUVmax in tumours was 1± 0.2 with a non-tumour background SUVmax of 0.3± 0.1 (Fig. 3c). Excretion in urine was fast, reaching 61% of injected dose (ID) in the bladder 50 minutes p.i.. The accumulation of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 in the kidneys was moderate (5% of ID 45 min p.i.), reflecting a good renal clearance of the tracer. Tumour uptake plateaued over the PET acquisition period, representing 1.5 % of ID; it reached 1.7 % of ID 45 min p.i. (Fig. 3b).The clearance from blood was fast (3.1 % of ID in heart VOI, reaching 0.2 % of ID at 45 min p.i.) resulting, as shown in figure 3d, in tumour-to-non-tumour uptake ratios increasing from 1.7 ± 0.3 to 3.9 ± 0.2 between 10-20 min and 40-50 min p.i.

Uptake of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 in major organs and blood was investigated *ex vivo* 1 h p.i. by weighting and counting organs in a gamma counter (Fig. 4). A moderate uptake of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 (5.38 ± 0.54 %ID/g) was observed in kidneys. Very low tracer accumulation was observed in other organs, particularly in the pancreas (0.22 ± 0.03 %ID/g), consistent with the visual observations on PET imaging (Fig. 3a). The circulating activity was 0.99 ± 0.44 % ID/g and the uptake in AsPC-1 tumours was 5.28 ± 0.93 %ID/g, corresponding to a tumour-to-blood ratio of 5.93 ± 1.62 (Fig. 3e). The tumour-to-muscle ratio was 18.21 ± 4.01 and the tumour-to-kidneys ratio was 1 ± 0.26. Table 1 in Supplementary Data summarizes the data of the *ex vivo* biodistribution.

Specificity of in vivo tumour uptake of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3

The specificity of tumour uptake of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 was tested by co-administration of 180 nmol (representing an excess over 400 fold) of unlabeled NT20.3 (peptide with the same amino-acid sequence but without DOTA). SUVmax in tumours was 1.8 ± 0.6 for the group of mice injected with ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 alone vs 0.8 ± 0.1 for the blocking group resulting in a 70% reduction of the PET imaging uptake ratio (T/NT) was reduced by 70% from 3.7 ± 1.1 to 1 ± 0.1 ($p<0.005$) (Fig. 4a and 4b). The *ex vivo* tumour uptake (1 h p.i.) was also reduced by 70 % from 5.8 ± 1.7 to 1.6 ± 0.5 %ID/g ($p<0.005$) (Fig. 4c).

Comparative PET imaging with^{68}Ga-DOTA-NT20.3 and ^{18}F-FDG in experimental orthotopic pancreatic ductal adenocarcinoma

PET imaging was also performed in experimental orthotopic PDAC 45 min after ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 or ^{18}F-FDG injection (Fig. 5). Seven mice were imaged with ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 (n=4) or with ^{18}F-FDG (n=3) 14 days and 30 days after cells implantation. Mice were injected with ^{68}Ga-

DOTA-NT20.3: 1.3 ± 0.3 MBq; (534 ± 46 pmol) or, after a fasting period of 12 hours, with ^{18}F-FDG (1.5 ± 0.1 MBq).

A strong background corresponding to uptake by normal tissues was observed with ^{18}F-FDG (Fig. 5b) as compared to the very low background in normal organs, except for kidneys, obtained with ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 (Fig. 5a). Fourteen days after orthotopic implantation, tumours were not palpable. PDAC was clearly detectable with ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 due to the high contrast over the low background with this tracer.

This contrast was reinforced 30 days after tumour inoculation (Fig. 5a). In addition, the tumour uptake ratio was significantly higher for ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 (4.6 ± 1.5) (Fig. 5a and 5c), as compared to ^{18}F-FDG (1.2 ± 0.1) (Fig.5b and 5c) (*P<0.05). *Ex vivo* analysis confirmed these results, the tumour uptake being 7 ± 1.4 %ID/g vs. 0.4 ± 0.1 %ID/g for ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 and ^{18}F-FDG, respectively.

After PET imaging, the expression of NTR1 in tumours invading the pancreas was confirmed by immunohistochemistry. NTR1 labelling was frequent and intense (Fig. 5d panels 1 and 2). Some cells showed a very strong intracytoplasmic labelling dispersed or organized in cluster. Other cells showed a discrete membrane labelling. (Fig. 5d panels 3and 4)

Comparative PET imaging with ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 and ^{18}F-FDG in experimental pancreatitis

Female C57Bl6 mice received repeated intraperitoneal injections of supra-physiologic concentrations of caerulein (50 µg/kg), an analogue of cholecystokinin, to induce pancreatitis [20].

The ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 and the ^{18}F-FDG uptake in pancreatic inflammation were compared. Seven animals were injected with 2.9 ± 0.6 MBq of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 (401 ± 26 pmol) and 7 mice were injected with 3.1 ± 0.9 MBq of ^{18}F-FDG after a fasting period of 12 hours.

Fig. 6a shows representative histological sections of the pancreas of treated and untreated mice. Cearulein administration caused pancreatic oedema, infiltration by inflammatory cells between the acini and into the peripancreatic fat and fibrosis. NTR1 labelling was dispersed inside of the cytoplasm in cearulein treated and control animals. The labelling was weak and of the same intensity in both conditions.

^{18}F-FDG PET imaging confirmed the extent and intensity of pancreatic inflammation *in situ*. As shown in fig.6b image 1, in treated mice with acute pancreatitis, ^{18}F-FDG uptake in the pancreas was elevated By contrast, in control mice, only a low ^{18}F-FDG accumulation was observed in the pancreas (Figure 6b image 2).

As expected, ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 PET imaging did not show radiotracer uptake in any of the

conditions (Fig. 6b image 3 and 4). *Ex vivo* analysis of the entire pancreas was performed. ^{18}F-FDG showed a strong and a significant uptake (11% ID/g) when animals were treated with cearulein as compared to control mice (4% ID/g). ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 uptake was weaker (1.5 % ID /g) in pancreatitis as compared to ^{18}F-FDG uptake. ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 uptake was weak and similar in pancreas of treated and untreated animals (1.5 % and 2% ID/g), respectively (Fig. 6c and d).

Discussion

Most patients with pancreatic cancer are diagnosed with metastatic disease, and only a small fraction of patients are suitable candidates for surgical resection [21]. Improved diagnostic tools are thus urgently needed to better detect and characterize pancreatic malignancies. Molecular imaging with a specific probe could improve the diagnostic imaging and tumour staging by detecting metastases, recurrence and could help monitoring response to therapy.

The overexpression of neurotensin receptors (NTRs) has been described for the first time in 1998 by Reubi et al. in 75 to 88% of human PDAC using in vitro receptor autoradiography. In contrast, NTR expression was not detected in normal human pancreas, in chronic pancreatitis, as well as in endocrine pancreatic tumours [14]. In 2011, Wang et al. studied a series of patients who were not subjected to chemotherapy and radiotherapy at the time of surgery. They demonstrated for the first time co-expression of NT and NTR1 using immunohistochemistry in an elevated rate of 80% (32/40) of tumours [22], indicating that the counteraction of NT and NTR1 regulates the genesis and development of pancreatic carcinomas. These data were extended to liver metastases and pancreatic intraepithelial neoplasia of higher degree using in vitro receptor autoradiography by Korner et al. in 2015 [15].
In this study, NTR1 expression was confirmed in another patient cohort with a 56% positivity rate of NTR1 expression. This frequency was less than previous reported, perhaps because of the lack of sensitivity of the immunohistochemical technique as compared to autoradiography. Complementary studies are needed to better characterize this frequency.

NTR1 expression by cancer cells triggered the development of radioactive neurotensin analogues that could be used for the visualization and, eventually, for targeted radiotherapy of PDAC and other tumours overexpressing this receptor such as breast [23] non-small cell lung [24], colon [25] or prostate cancers [26].

Few radiolabelled neurotensin analogues, stabilized against enzymatic degradation in vivo by

changes in the peptide sequence, have been tested in patients. The first one, a ^{99m}Tc-labeled NT analogue was evaluated for its tumour targeting characteristics in PDAC patients by Buchegger et al. The initial clinical findings were not very favourable due to the high nonspecific uptake of radioactivity in the intestinal region and in the kidneys, with a high background for imaging [27]. The second one, ^{99m}Tc -Demotensin VI was tested in patients with PDAC, small cell lung cancer (SCLC), non-small cell lung cancer (NSCLC) or colon carcinoma. The tracer was well tolerated by patients and showed suitable body clearance, such as rapid renal excretion and minimal abdominal uptake; however, detection capacity was poor in the tumours investigated, suggesting a poor in vivo stability and and also low receptor expression in the tumours [28].

Peptide receptor antagonists have been described as having superior tumour uptake and retention compared with agonists [29]. Schulz et al. modified the known NTR1 antagonist SR142948A [30] by attaching a DOTA yielding the novel diarylpyrazole-based NTR1 antagonist 3BP-227 [31]. Recent data demonstrate that this peptide radiolabelled with lutetium-177 is an effective and promising candidate for radioligand therapy, with a favourable preliminary safety profile in NTR1-positive HT29 tumour and high potential for clinical translation [32]. Baum et al. just reported the first clinical evidence of the feasibility of treatment of PDAC using this radiotracer ^{177}Lu-3BP-227 [33].
The biodistribution profile of indium-labelled 3BP-227 in tumour–bearing mice confirmed high tumour accumulation and low uptake in normal tissues, leading to favorable tumour-to-kidney activity ratios at 20 h after injection, which is not compatible with usual radionuclides for PET imaging, fluoride-18 or gallium-68 in particular.

^{68}Ga is a positron emitter with a half-life of 68 min. It may be obtained from ^{68}Ge-^{68}Ga generators. The major advantage of this generator is that it is a continuous source of ^{68}Ga, independent of an on-site cyclotron [34-36]. ^{68}Ga conjugation to small peptides and biomolecules has been developed and has shown great potential in clinical applications [37]. In our previous study, ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 displayed high tumour uptake and allowed the detection of very small colon carcinoma (HT29) tumours with PET [16]. The current pre-clinical study aimed to investigate 68Ga-DOTA-NT20.3 as a new molecular probe for the evaluation of NTR1 expression in pancreatic tumours, and to further assess its feasibility for the detection of pancreatic adenocarcinoma.
In this study, DOTA-NT20.3 was easily labelled with ^{68}Ga with a yield of about 98%. Biodistribution studies revealed that ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 was cleared rapidly from blood, and mainly excreted by the kidney, whereas its uptake in other normal organs was very low. Dynamic PET imaging revealed focal uptake in the tumour and afforded high quality images with low

background. The specificity of the uptake of the radiotracer was confirmed in a blocking study.

To our knowledge, this is the first study evaluating a specific peptide based gallium tracer to visualize PDAC xenograft model; only one team used ^{68}Ga-chloride (similarly to the well documented ^{67}Ga citrate for SPECT imaging) and ^{18}F-FDG PET imaging to delineate subcutaneously implanted human pancreatic adenocarcinoma xenografts in rats and found that the tumour uptake of ^{18}F-FDG was clearly superior [38]. Moreover, we chose to use an orthotopic xenograft tumour model that closely mimicked the clinical presentation of pancreatic cancer in patients and allowed tumours to grow in their native microenvironment. As Von Forstner et al. we found low uptake of ^{18}F-FDG in PDAC orthotopic tumours [39]. Only one study succeeded in using ^{18}F-FDG PET to determine the early effect of combination therapy in a MIA PaCa-2 orthotopic pancreatic cancer model [40]. It could be interesting to test in further study the efficacy of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 to follow new therapeutics.

Differential diagnosis of PDAC, focal mass pancreatitis (FMP) or autoimmune pancreatitis (AIP) is still one of the toughest problems in the management of pancreatic disease. Approximately 4% to 10% of the pancreatic resections performed for presumed malignancy revealed non-neoplastic disease on pathologic evaluation [41]. As a consequence, a disease-specific imaging probe that targets specific molecular or genetic abnormalities of the disease, rather than depending only on metabolic changes, would be a desirable probe for tumour detection. Experimental acute pancreatitis induced by cerulein is reminiscent of the clinical manifestations of severe acute pancreatitis [19].

In the present study, we have evaluated the extent and quantification of pancreatic inflammation in mice using small animal ^{18}F-FDG-PET, as reported by Dong et al. [42] and as expected, the in *situ* inflammatory response was visible on ^{18}F-FDG PET but not on ^{68}Ga-DOTA-NT20.3. This result was concordant with histological observation of pancreatic edema, infiltration by inflammatory cells in close contact with acini and fibrosis but no detection of NTR1 expression.

High tumour selectivity and low uptake in case of pancreatic inflammation in animal models support the potential for clinical use of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 as a tool to discriminate PDAC from pancreatitis.

Conclusion

^{68}Ga-DOTA-NT20.3 has a favorable pharmacokinetics and biodistribution profile, which results in high quality PET images in mice with subcutaneous or orthotopic grafted human pancreatic cancer.

Moreover, in contrary to FDG, ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 was able to discriminate PDAC from FMP, in mouse models. Thus ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 possesses specific binding to NTR1 of pancreatic tumour cells and provides higher PET detection than ^{18}F-FDG. ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 thus seems to be a good candidate for PET imaging of over-expression of NTR1 on human ductal pancreatic carcinoma and could benefit to patients with suspected PDAC. Moreover, ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 could help to define the patient population most likely to benefit from targeted therapy with ^{177}Lu-labeled NTR1 antagonist 3BP-227.

Figures

Group 1 Nu/nu mice n=3♀ & n= 3♂		^{68}Ga-DOTA-NT20.3	Dynamic PET imaging immediatly p.i.
Group 2 Nu/nu mice Subcutaneous xenograft 4x10^{6} AsPC-1 w/ matrigel n= 11♂	4 weeks	^{68}Ga-DOTA-NT20.3	Dynamic PET imaging immediatly p.i. n=4 *Ex-vivo* biodistribution 1h p.i. Blocking study: Static PET imaging 45min p.i. n=4 & n=3 blocking
Group 3 Nu/nu mice Orthotopic xenograft 5x10^{6} AsPC-1 n= 7♂	2 & 4 weeks	^{68}Ga-DOTA-NT20.3 n=4 ^{18}F-FDG n=3	Static PET imaging 45min p.i. *Ex-vivo* tumor uptake 1h p.i.
Group 4 C57Bl6 mice Caerulein treated n= 8♀ PBS n= 6♀	7h 7h	^{68}Ga-DOTA-NT20.3 n=4 ^{18}F-FDG n=4 ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 n=3 ^{18}F-FDG n=3	Static PET imaging 45min p.i. *Ex-vivo* pancreas uptake 1h p.i.

Fig.1 Schematic overview of the experimental design

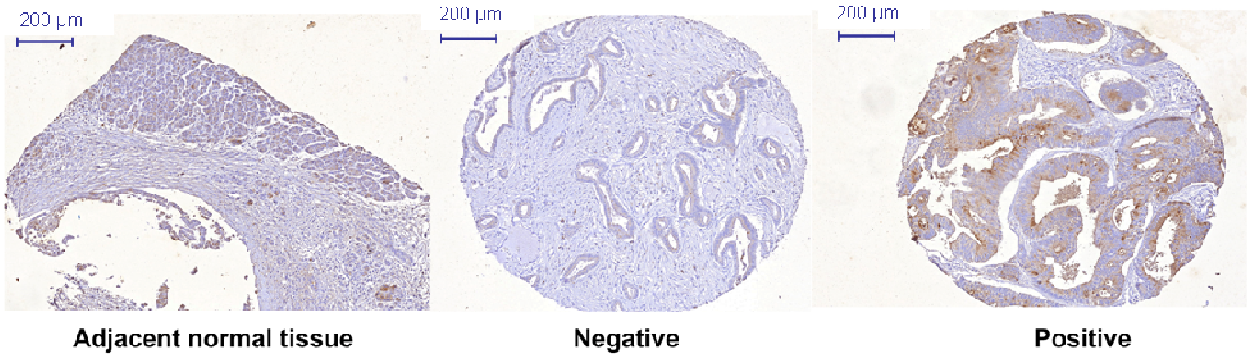


Fig. 2 NTR1 is highly expressed in PDAC
TMA analyzed with Panoramic viewer at the X20 magnification, example of NTR1 positive and negative staining in adenocarcinoma and a very weak staining in adjacent normal tissue.

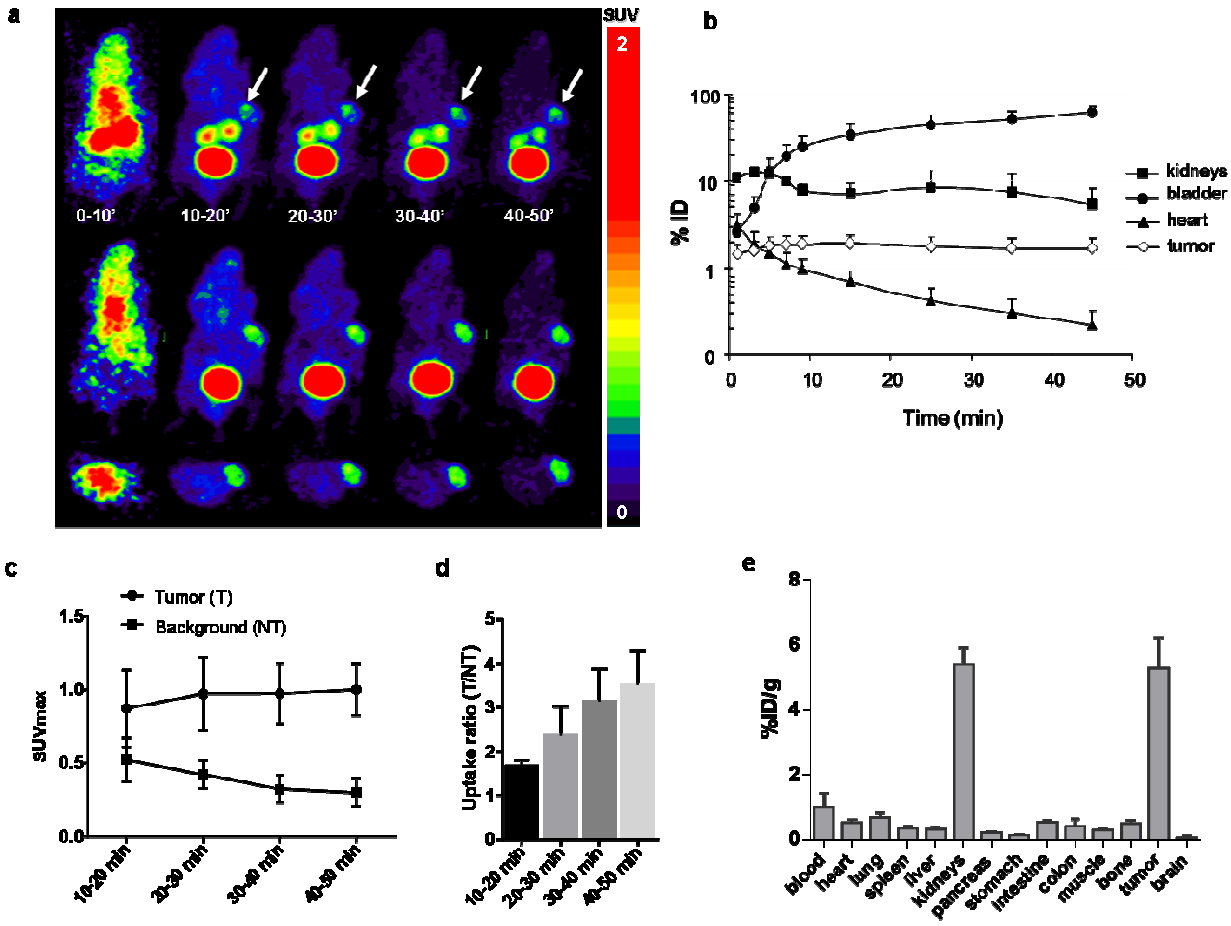


Fig. 3

a) Representative PET imaging of AsPC-1 tumour-bearing mice administered with 3 ± 0.8 MBq; (423 ± 53 pmol) of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 (n=4). Dynamic acquisition was started immediately p.i. for a duration of 50 min. PET imaging was composed of 5 frames of 1 min computed in 1 frame and 4 frames of 10 min. Up: maximum intensity projection (MIP), middle: coronal slice, down: transversal slice. Tumour (arrow) uptake of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 is clearly visible.

b) Time activity curve analysis of dynamic PET imaging, data expressed in mean % of injected dose in the volume of interest (VOI) (%ID) ± SD (n=4). The data were obtained by quantitative analysis of dynamic PET images of AsPC-1 tumour-bearing mice at 0-50 min p.i. of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3. (n=4)

c) Time point of maximal standardized uptake value in tumour and background ROIs. Data expressed in mean SUVmax ± SD (n=4).

d) PET imaging analysis in tumour to non-tumour uptake ratio in mean ± SD. (n=4).

e) *Ex vivo* biodistribution of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 in AsPC-1 tumour-bearing nude mice at 1h p.i. Tissue radioactivity is expressed as the percentage of injected dose per gram (%ID/g, mean ± SD).

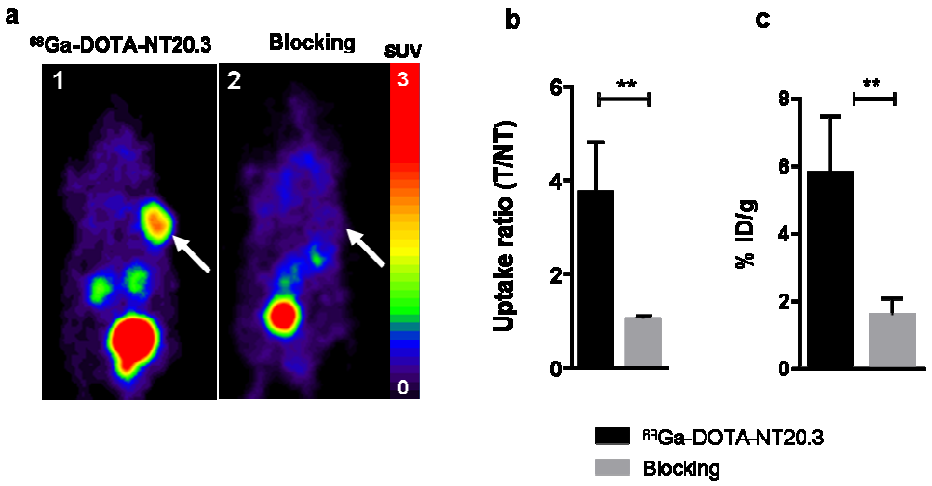


Fig. 4

a) Representative maximum intensity projection (MIP) PET imaging of blocking studies in AsPC-1 tumour-bearing mice. One mouse injected with 3.6 MBq of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 (507 pmol), Fig. 4a. panel 1. One mouse co-injected with 2 MBq (322 pmol) of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 and 180 nmol of unlabeled NT20.3. Fig. 4a. panel 2. PET imaging was performed at 40-50 min p.i.

b) Tumour to non-tumour uptake ratio from PET imaging analysis.

c) Tumour radioactivity determined ex vivo (1h p.i.) and expressed as % ID/g.

Data are given as mean ± SD (n=4 for the ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 group and n=3 for the blocking group). **P<0.01

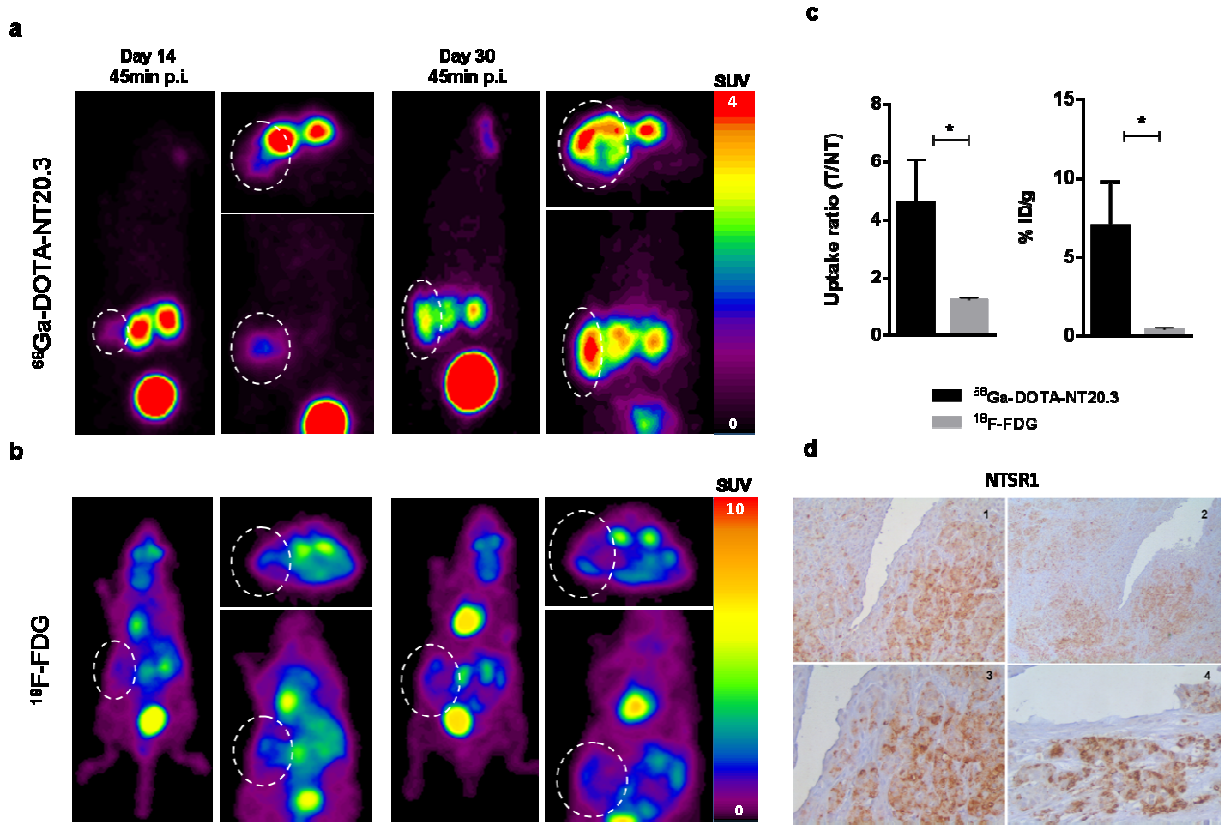


Fig. 5

Comparative PET imaging 45 min p.i. of radiotracers ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 (a) and ^{18}F-FDG (b) in an orthotopic pancreatic ductal adenocarcinoma model. Representative in vivo PET images of orthotopic AsPC-1 tumour–bearing mice 14 and 30 days after cells implantation. Maximum Intensity Projection (MIP) and transversal slices. Circles indicate the tumour.

c) Tumour to non-tumour uptake ratio from PET imaging analysis at day 30 and tumour radioactivity determined ex vivo 1h p.i. after in-vivo PET imaging and expressed as % ID/g. Mice were injected with ^{68}Ga-DOTA-NT20.3: 1.3 ± 0.3 MBq; (534 ± 46 pmol) or with ^{18}F-FDG (1.5 ± 0.1 MBq). Data are expressed in mean ± SD (n=4 for the ^{68}Ga-NT20.3, n=3 for the ^{18}F-FDG) *P<0.05

d) NTR1 immunohistochemistry of an orthotopic AsPC-1 tumour invading the pancreas. Magnification X40 (panel 1), X100 (panel 2), and X200 (panel 3 and 4)

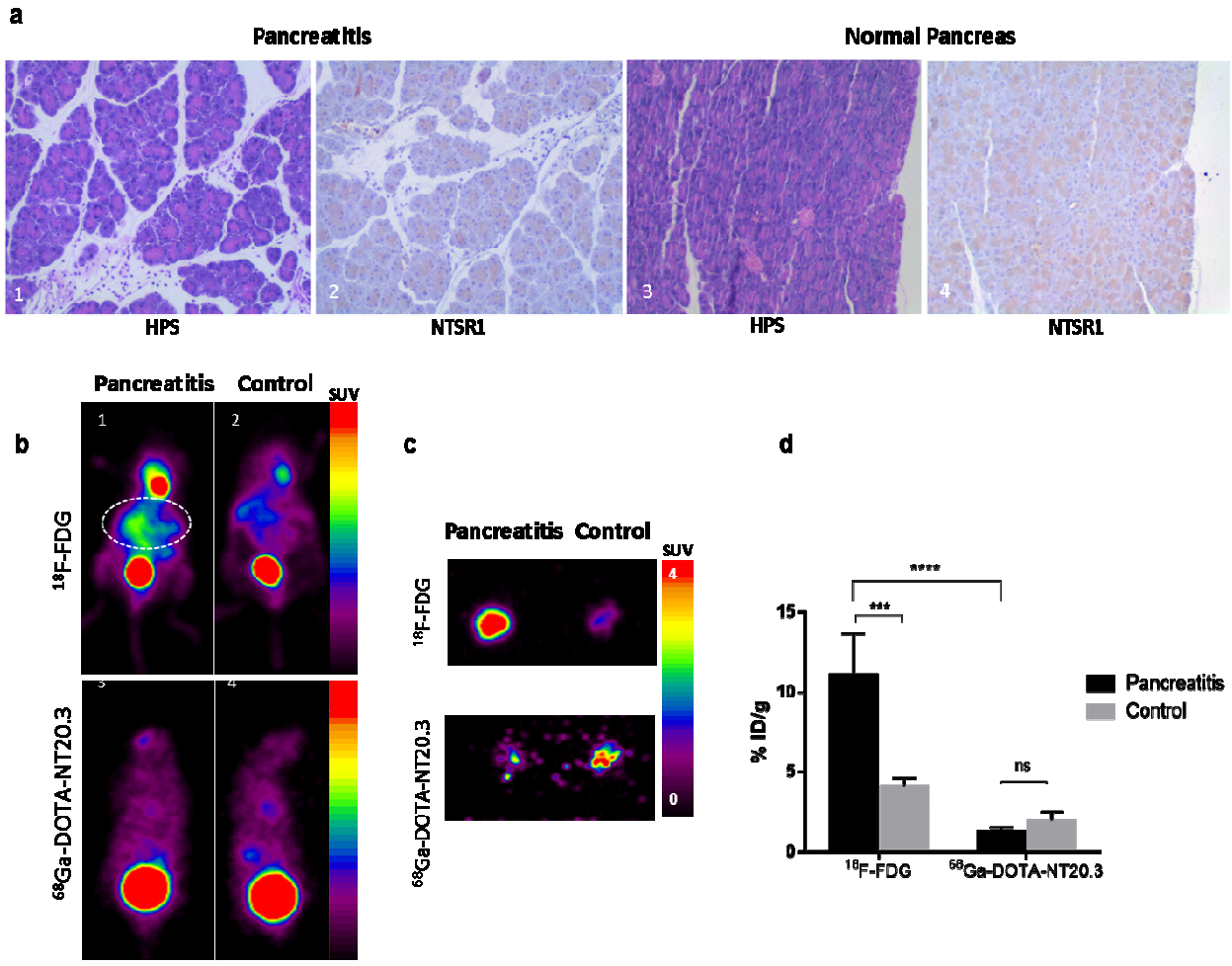


Fig. 6

a) Effects of caerulein on pancreatic histology. Representative histological sections of mouse pancreas fixed in 10% neutral-buffered formalin, paraffin embedded, and stained with HPS from a caerulein treated one (panel 1) and from a control mouse (panel 3). Caerulein administration caused pancreatic oedema, infiltration by inflammatory cells in close contact with acini and fibrosis. Original magnification x100. On adjacent slice NTR1 labelling was performed image 2, 4 is shown.
b) Representative in vivo PET images of caerulein treated mice (left) and control mice (right) with ^{18}F-FDG (up) and ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 (down).
c) Representative ex-vivo PET images of caerulein treated pancreas and untreated control pancreas with ^{18}F-FDG (up) and ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 (down).
d) Uptake of imaging agents in pancreas of control and treated mice as determined by ex vivo by weighting and counting the organs. Data are expressed in mean %ID/g ± SD (n=4 for the ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 caerulein treated group, n=3 for the ^{68}Ga-NT20.3 untreated group, n=4 for the ^{18}F-FDG caerulein treated group, n=3 for the ^{18}F-FDG untreated group). ***P<0.005; ****P<0.001

Supplementary Data

Preparation and Quality Control of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3

NTSR1 targeting peptide, DOTA-NT20.3 (Ac-Lys(DOTA)-Pro-Me-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH; MW=1484.7 g/mol) was produced according to good manufacturing practice (GMP) by Pichem and kindly provided by Iason GmbH. Frozen vials of DOTA-NT20.3 containing 50 µg were suspended in Trace Select water (Sigma) at 1mg/mL. The ^{68}Ga-labeling of DOTA-NT20.3, was performed as described [16] with minor modifications, using a R&D Synchrom module (Raytest, Germany), Briefly, the ^{68}Ge/^{68}Ga eluate (1.5 mL, 150–300MBq) was adjusted to pH=3.5 with sodium acetate (0.8 mol/L). DOTA-NT20.3 (15 nmol) was added and incubated under agitation at 95°C for 8 min. The product ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 was purify on a C18 Sep-Pack cartridge (Waters Milford, USA) and eluted using 800 µL of 80% ethanol in the second reactor. ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 was subsequently evaporated at 70°C under argon flow then the final product was diluted with 9 mg/mL sodium chloride (NaCl). The overall decay-corrected radiochemical yield (RY) of the GMP batch of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 was 87.7 ± 9.1 % during the entire labeling, purification and evaporation procedure (around 30 min). A specific activity of 8.5 ± 2.8 MBq/nmol was achieved (n = 6).

The radiochemical purity, as determined by reverse phase (RP) high-performance liquid chromatography (HPLC), was ≥ 99% (retention time 6.5 min). Radiochemical purity was also assessed using Silica Gel Instant TLC (ITLC) with 50% methanol / 50% sodium acetate 1mol/L as mobile phase and only one spot with a rate of flow (RF) 0.6 was observed.

PET imaging of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 in healthy female or male mice.

Dynamic PET imaging was performed during 50 min to determine biodistribution of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 in Nu/nu mice from group 1 (n=3 female and n=3 male), mice received intravenously 2.4 ± 1.3 MBq; (434 ± 89 pmol) and 2.6 ± 1.2 MBq; (478 ± 55 pmol) respectively of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3. Time activity curves (TACs) were generated from VOI analysis of the obtained images. Mice were characterized by a rapid delivery of ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 up to 2 min p.i into blood compartment represented by 1.8 % of injected dose in heart VOI. This percentage decrease rapidly and after 15 minutes is divided 3 times (0.61 for female and 0.73 for male) to reach only 0.29 and 0.34 (female and male respectively) at the end of the acquisition 45min p.i. Bladder and kidneys, major organs for tracer clearance and elimination, consequently showed relatively high radioactivity accumulation. No uptake was observed in other organs especially in pancreas, the organ of interest.

No significant difference of radiotracer biodistribution was found between female and male mice.

Table 1 Summarized data of the *ex vivo* biodistribution.

N° subjects	4	
Tissue	% ID/g	± SD
blood	0.99	0.44
heart	0.52	0.10
lung	0.68	0.16
spleen	0.34	0.07
liver	0.31	0.09
kidneys	5.38	0.54
pancreas	0.22	0.03
stomach	0.14	0.03
intestine	0.53	0.08
colon	0.41	0.23
muscle	0.29	0.02
bone	0.49	0.11
tumor	5.28	0.93
brain	0.06	0.04
tumor/blood	5.93	1.82
tumor/kidneys	1.00	0.26
tumor/muscle	18.21	4.01

References

1. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. The Lancet.378:607-20. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62307-0.

2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA: a cancer journal for clinicians. 2015;65:5-29. doi:10.3322/caac.21254.

3. Holzapfel K, Reiser-Erkan C, Fingerle AA, Erkan M, Eiber MJ, Rummeny EJ, et al. Comparison of diffusion-weighted MR imaging and multidetector-row CT in the detection of liver metastases in patients operated for pancreatic cancer. Abdominal imaging. 2011;36:179-84. doi:10.1007/s00261-010-9633-5.

4. Canto MI, Hruban RH, Fishman EK, Kamel IR, Schulick R, Zhang Z, et al. Frequent detection of pancreatic lesions in asymptomatic high-risk individuals. Gastroenterology. 2012;142:796-804; quiz e14-5. doi:10.1053/j.gastro.2012.01.005.

5. Parsons CM, Sutcliffe JL, Bold RJ. Preoperative evaluation of pancreatic adenocarcinoma. Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery. 2008;15:429-35.

6. Zamboni G, Hirabayashi K, Castelli P, Lennon AM. Precancerous lesions of the pancreas. Best practice & research Clinical gastroenterology. 2013;27:299-322. doi:10.1016/j.bpg.2013.04.001.

7. Hussain T, Nguyen QT. Molecular imaging for cancer diagnosis and surgery. Advanced drug delivery reviews. 2014;66:90-100. doi:10.1016/j.addr.2013.09.007.

8. Pakzad F, Groves AM, Ell PJ. The role of positron emission tomography in the management of pancreatic cancer. Seminars in nuclear medicine. 2006;36:248-56. doi:10.1053/j.semnuclmed.2006.03.005.

9. Santhosh S, Mittal BR, Bhasin D, Srinivasan R, Rana S, Das A, et al. Role of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography in the characterization of pancreatic masses: Experience from tropics. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2013;28:255-61. doi:10.1111/jgh.12068.

10. Sandrasegaran K, Nutakki K, Tahir B, Dhanabal A, Tann M, Cote GA. Use of Diffusion-Weighted MRI to Differentiate Chronic Pancreatitis From Pancreatic Cancer. American Journal of Roentgenology. 2013;201:1002-8. doi:10.2214/AJR.12.10170.

11. Vincent JP, Mazella J, Kitabgi P. Neurotensin and neurotensin receptors. Trends in pharmacological sciences. 1999;20:302-9.

12. Dupouy S, Mourra N, Doan VK, Gompel A, Alifano M, Forgez P. The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. Biochimie. 2011;93:1369-78. doi:https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.04.024.

13. Wu Z, Martinez-Fong D, Trédaniel J, Forgez P. Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy. Frontiers in Endocrinology. 2012;3:184. doi:10.3389/fendo.2012.00184.

14. Reubi JC, Waser B, Friess H, Buchler M, Laissue J. Neurotensin receptors: a new marker for human ductal pancreatic adenocarcinoma. Gut. 1998;42:546-50.

15. Korner M, Waser B, Strobel O, Buchler M, Reubi JC. Neurotensin receptors in pancreatic ductal carcinomas. EJNMMI research. 2015;5:17. doi:10.1186/s13550-015-0094-2.

16. Alshoukr F, Prignon A, Brans L, Jallane A, Mendes S, Talbot JN, et al. Novel DOTA-neurotensin analogues for 111In scintigraphy and 68Ga PET imaging of neurotensin receptor-positive tumors. Bioconjugate chemistry. 2011;22:1374-85. doi:10.1021/bc200078p.

17. Na Y, Choi J-W, Kasala D, Hong J, Oh E, Li Y, et al. Potent antitumor effect of neurotensin receptor-targeted oncolytic adenovirus co-expressing decorin and Wnt antagonist in an orthotopic pancreatic tumor model. Journal of Controlled Release. 2015;220:766-82. doi:https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.015.

18. Hoffman R. Orthotopic Metastatic Mouse Models for Anticancer Drug Discovery and Evaluation: a Bridge to the Clinic. Invest New Drugs. 1999;17:343-60. doi:10.1023/A:1006326203858.

19. Lerch MM, Gorelick FS. Models of Acute and Chronic Pancreatitis. Gastroenterology. 2013;144:1180-93. doi:http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2012.12.043.

20. Lerch MM, Gorelick FS. Models of acute and chronic pancreatitis. Gastroenterology. 2013;144:1180-93. doi:10.1053/j.gastro.2012.12.043.

21. Ansari D, Gustafsson A, Andersson R. Update on the management of pancreatic cancer: Surgery is not enough. World Journal of Gastroenterology : WJG. 2015;21:3157-65. doi:10.3748/wjg.v21.i11.3157.

22. Wang JG, Li NN, Li HN, Cui L, Wang P. Pancreatic cancer bears overexpression of neurotensin and neurotensin receptor subtype-1 and SR 48692 counteracts neurotensin induced cell proliferation in human pancreatic ductal carcinoma cell line PANC-1. Neuropeptides. 2011;45:151-6. doi:10.1016/j.npep.2011.01.002.

23. Souaze F, Dupouy S, Viardot-Foucault V, Bruyneel E, Attoub S, Gespach C, et al. Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. Cancer research. 2006;66:6243-9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0450.

24. Alifano M, Souaze F, Dupouy S, Camilleri-Broet S, Younes M, Ahmed-Zaid SM, et al. Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2010;16:4401-10. doi:10.1158/1078-0432.ccr-10-0659.

25. Chao C, Tallman ML, Ives KL, Townsend Jr CM, Hellmich MR. Gastrointestinal Hormone Receptors in Primary Human Colorectal Carcinomas1. Journal of Surgical Research. 2005;129:313-21. doi:https://doi.org/10.1016/j.jss.2005.04.038.

26. Swift SL, Burns JE, Maitland NJ. Altered expression of neurotensin receptors is associated with the differentiation state of prostate cancer. Cancer research. 2010;70:347-56. doi:10.1158/0008-5472.can-09-1252.

27. Buchegger F, Bonvin F, Kosinski M, Schaffland AO, Prior J, Reubi JC, et al. Radiolabeled neurotensin analog, 99mTc-NT-XI, evaluated in ductal pancreatic adenocarcinoma patients. Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine. 2003;44:1649-54.

28. Gabriel M, Decristoforo C, Woll E, Eisterer W, Nock B, Maina T, et al. [99mTc]demotensin VI: biodistribution and initial clinical results in tumor patients of a pilot/phase I study. Cancer biotherapy &

radiopharmaceuticals. 2011;26:557-63. doi:10.1089/cbr.2010.0952.

29. Fani M, Nicolas GP, Wild D. Somatostatin Receptor Antagonists for Imaging and Therapy. Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine. 2017;58:61S-6S. doi:10.2967/jnumed.116.186783.

30. Gully D, Labeeuw B, Boigegrain R, Oury-Donat F, Bachy A, Poncelet M, et al. Biochemical and pharmacological activities of SR 142948A, a new potent neurotensin receptor antagonist. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 1997;280:802-12.

31. Schulz J, Rohracker M, Stiebler M, Goldschmidt J, Grosser OS, Osterkamp F, et al. Comparative Evaluation of the Biodistribution Profiles of a Series of Nonpeptidic Neurotensin Receptor-1 Antagonists Reveals a Promising Candidate for Theranostic Applications. Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine. 2016;57:1120-3. doi:10.2967/jnumed.115.170530.

32. Schulz J, Rohracker M, Stiebler M, Goldschmidt J, Stober F, Noriega M, et al. Proof of Therapeutic Efficacy of a 177Lu-Labeled Neurotensin Receptor 1 Antagonist in a Colon Carcinoma Xenograft Model. Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine. 2017;58:936-41. doi:10.2967/jnumed.116.185140.

33. Moltz JH, Dobbs RE, McCann SM, Fawcett CP. Effects of hypothalamic factors on insulin and glucagon release from the islets of Langerhans. Endocrinology. 1977;101:196-202. doi:10.1210/endo-101-1-196.

34. Fani M, Andre JP, Maecke HR. 68Ga-PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals. Contrast media & molecular imaging. 2008;3:67-77. doi:10.1002/cmmi.232.

35. Zhernosekov KP, Filosofov DV, Baum RP, Aschoff P, Bihl H, Razbash AA, et al. Processing of generator-produced 68Ga for medical application. Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine. 2007;48:1741-8. doi:10.2967/jnumed.107.040378.

36. Breeman WA, de Blois E, Sze Chan H, Konijnenberg M, Kwekkeboom DJ, Krenning EP. (68)Ga-labeled DOTA-peptides and (68)Ga-labeled radiopharmaceuticals for positron emission tomography: current status of research, clinical applications, and future perspectives. Seminars in nuclear medicine. 2011;41:314-21. doi:10.1053/j.semnuclmed.2011.02.001.

37. Virgolini I, Ambrosini V, Bomanji JB, Baum RP, Fanti S, Gabriel M, et al. Procedure guidelines for PET/CT tumour imaging with 68Ga-DOTA-conjugated peptides: 68Ga-DOTA-TOC, 68Ga-DOTA-NOC, 68Ga-DOTA-TATE. European journal of nuclear medicine and molecular imaging. 2010;37:2004-10. doi:10.1007/s00259-010-1512-3.

38. Ujula T, Salomäki S, Autio A, Luoto P, Tolvanen T, Lehikoinen P, et al. 68Ga-Chloride PET Reveals Human Pancreatic Adenocarcinoma Xenografts in Rats—Comparison with FDG. Molecular Imaging and Biology. 2010;12:259-68. doi:10.1007/s11307-009-0267-3.

39. von Forstner C, Egberts J-H, Ammerpohl O, Niedzielska D, Buchert R, Mikecz P, et al. Gene Expression Patterns and Tumor Uptake of 18F-FDG, 18F-FLT, and 18F-FEC in PET/MRI of an Orthotopic Mouse Xenotransplantation Model of Pancreatic Cancer. Journal of Nuclear Medicine. 2008;49:1362-70.

doi:10.2967/jnumed.107.050021.

40. Shah N, Zhai G, Knowles JA, Stockard CR, Grizzle WE, Fineberg N, et al. (18)F-FDG PET/CT imaging detects therapy efficacy of anti-EMMPRIN antibody and gemcitabine in orthotopic pancreatic tumor xenografts. Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging. 2012;14:237-44. doi:10.1007/s11307-011-0491-5.

41. Abraham SC, Wilentz RE, Yeo CJ, Sohn TA, Cameron JL, Boitnott JK, et al. Pancreaticoduodenectomy (Whipple resections) in patients without malignancy: are they all 'chronic pancreatitis'? The American journal of surgical pathology. 2003;27:110-20.

42. Dong X, Zhan YC, Jiang RY, Xie QP, Peng JP, Wang J, et al. The Potential Effect of Proteasome Inhibitor PS-341 on Severe Acute Pancreatitis Detected by Positron Emission Tomography in ICR Mice. Journal of Surgical Research. 2010;162:193-202. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2009.06.011.

XII.3. Discussion

La surexpression des récepteurs de NT a été mise en évidence pour la première fois en 1998 par Reubi et al. dans 75 à 88% des échantillons de PDAC humains issus de résection chirurgicale ou de biopsies par une technique d'autoradiographie. Cette technique a l'avantage de détecter seulement les récepteurs fonctionnels exprimés au niveau de la membrane cellulaire. Les récepteurs de la NT étaient plus souvent exprimés dans des tumeurs bien différenciées que dans des tumeurs peu différenciées. De plus, les auteurs ont également rapporté que l'expression des récepteurs de la NT n'a pas été détectée dans le pancréas humain normal, dans la pancréatite chronique, ainsi que dans les tumeurs pancréatiques endocrines (J. C. Reubi *et al.*, 1998).

En 2011, Wang et al. ont étudié une série de coupes de tissus issues de patients n'ayant reçu aucune chimiothérapie et/ou radiothérapie au moment de l'ablation chirurgicale. Ils ont montré pour la première fois la co-expression de NT et NTR1 dans la majorité des PDAC étudiés (32/40) en immunohistochimie, indiquant que la présence concomitante de NT et NTR1 pourrait réguler la croissance et le développement des PDAC (Ji-Gang Wang *et al.*, 2011), comme cela a pu être décrit, en immunohistochimie également, chez 60% des patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire de stade 1 (Alifano *et al.*, 2010b).

Ces données ont été étendues par Körner et al. en 2015 montrant en autoradiographie que le NTR1 est surexprimé dans les lésions PanIn de haut grade (Korner *et al.*, 2015). Tous ces résultats sont en faveur d'une forte implication du complexe NT/NTR1 dans la transformation des lésions pré-cancéreuses en carcinome, comme déjà décrit dans les adénocarcinomes coliques (Gui *et al.*, 2008) ou les adénocarcinomes de la prostate (Swift *et al.*, 2010).

L'imagerie moléculaire TEP avec du ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 spécifique des lésions cancéreuses voire précancéreuses de PDAC pourrait permettre de discriminer les formes focales de pancréatite formant des masses et les néoplasies intra-épithéliales pancréatiques (PanIN) avant qu'elles ne deviennent un carcinome. Ce diagnostic différentiel pourrait permettre de détecter plus précocement un PDAC ou de ne pas réaliser une intervention chirurgicale inutile sur une masse bénigne pour suspicion de cancer sous-jacent.

Körner et al. ont détecté du NTR1 dans des métastases hépatiques d'adénocarcinome pancréatique (Korner *et al.*, 2015). Ce récepteur semble être impliqué dans la croissance de la tumeur primitive et l'extension métastatique et pourrait être un facteur de mauvais pronostic, comme dans le cancer mammaire canalaire invasif du sein (S. Dupouy *et al.*, 2009). L'imagerie TEP avec du ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 pourrait donc permettre aussi d'améliorer la stadification de la tumeur en détectant les métastases.

Dans notre étude, l'expression du NTR1 a été confirmée dans 56% des échantillons de TMA issus d'une cohorte de patients opérés à l'hôpital Beaujon (Clichy, France) entre 2000 et 2004. Cette fréquence est inférieure aux valeurs rapportées précédemment dans la littérature, l'immunohistochimie est une technique moins sensible que l'autoradiographie, ce qui peut peut-être expliquer cette différence de fréquence.

De façon intéressante, Korner et al. ont observé une absence d'expression du NTR1 chez un patient traité par chimiothérapie à la gemcitabine avant résection chirurgicale, à contrario un autre patient traité par chimiothérapie avait une expression de NTR1 élevée.

Des études complémentaires seraient donc nécessaires pour mieux comprendre la relation entre expression du NTR1 et thérapie.

Peu d'analogues de la neurotensine radiomarqués, stabilisés contre la dégradation enzymatique *in vivo* par des modifications de la séquence peptidique, ont été testés chez des patients. Tous ont été bien tolérés. Ils ont présenté des pharmacocinétiques plus ou moins favorables, avec bien souvent une accumulation élevée non spécifique de la radioactivité dans la région intestinale ainsi qu'une accumulation rénale moyenne (Buchegger *et al.*, 2003, M. Gabriel *et al.*, 2011). De plus, ces études ont montré l'importance de bien sélectionner les patients éligibles à l'imagerie car pour le ^{99m}Tc-NT-XI évalué en 2003 chez quatre patients atteints de PDAC, seule une tumeur qui présentait une forte expression du récepteur de la NT a été visualisée (Buchegger *et al.*, 2003). L'autre étude clinique utilisant la ^{99m}Tc-Démotensine VI testée chez des patients atteints de PDAC, de cancer du poumon SCLC et NSCLC ou d'adénocarcinome du côlon a permis de visualiser uniquement des métastases cérébrales. Les auteurs ont alors conclu que des études supplémentaires étaient nécessaires pour mieux étudier la stabilité du radiotraceur et mieux caractériser les récepteurs pour lesquels leur ligand avait une affinité (M. Gabriel *et al.*, 2011). De la même manière, pour l'^{111}In-MP2530, c'est la stabilité du composé qui a été mise en cause, car la seule tumeur du pancréas positive pour l'expression du NTR1 (1 patient/5 patients) validée en autoradiographie après résection chirurgicale, n'a pu être détectée en imagerie.

Parmi ces radiotraceurs étant allés jusqu'en phase clinique, celui qui présentait les meilleurs résultats précliniques d'imagerie était le [^{99m}Tc]NT XI : 1h30 après injection, il présentait une captation tumorale de 3.9 %ID/g et une rétention rénale du traceur de 14.6%ID/g dans le modèle HT29 (Bruehlmeier *et al.*, 2002). Cependant cet analogue entrainait une accumulation élevée au niveau intestinal (1.3 %ID/g) et hépatique (2 %ID/g), se traduisant chez les patients par un bruit de fond sur les images, laissant craindre un risque de toxicité pour des applications thérapeutiques (Buchegger *et al.*, 2003).

Le ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 permet quant à lui, l'obtention d'images bien contrastées dans des temps courts seulement 45 min après injection, grâce à une faible accumulation du traceur dans les organes sains et notamment dans la région intestinale. Les données de biodistributions obtenues 1h après injection du ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 ont montré une captation tumorale de 5.28 %ID/g dans le modèle de xénogreffe AsPC1 avec une rétention rénale du traceur de 5.38 %ID/g ainsi qu'une très faible fixation dans le pancréas de 0.22 %ID/g, l'organe d'intérêt de notre étude.

Nous avons choisi d'utiliser un modèle de tumeur orthotopique qui imite au mieux la présentation clinique du cancer du pancréas chez les patients et permet aux tumeurs de se développer dans leur microenvironnement natif.
En plus de sa sensibilité de détection tumorale élevée et de sa spécificité pour le NTR1, le ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 a démontré une faible captation en cas d'inflammation pancréatique dans un modèle animal de pancréatite aiguë expérimentale induite par la cearuléine qui rappelle les manifestations cliniques de la pancréatite aiguë sévère.

XII.4. Conclusion

^{68}Ga-DOTA-NT20.3 a un profil de pharmacocinétique et de biodistribution très favorable, ce qui se traduit par des images TEP de très bons contrastes tumeur/organes sains chez des souris porteuses soit d'une xénogreffe sous-cutanée soit d'une tumeur orthotopique humaine de PDAC mimant mieux la détection d'une lésion cancéreuse *in situ*. De plus, contrairement au ^{18}F-FDG, le ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 est capable de discriminer le PDAC d'une pancréatite aiguë expérimentale induite par la cearuléine, dans des modèles murins. Le radiotraceur ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 semble donc être un bon candidat pour l'imagerie TEP de la surexpression du NTR1 dans l'adénocarcinome pancréatique exocrine humain et pourrait bénéficier aux patients suspectés de PDAC. De plus, le ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 pourrait aider à mieux définir la population de patients qui pourraient bénéficier d'une radiothérapie ciblée avec le DOTA-NT20.3 marqué au lutétium-177.

XIII. Conclusions et perspectives sur les analogues radiomarqués de la bombésine

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre VIII.5, les effets indésirables du ^{177}Lu-AMBA injecté à forte dose chez des patients atteints de cancer de la prostate ont stoppé le développement clinique des agonistes au profit des antagonistes. Néanmoins, notre étude préclinique réalisée à l'aide du ^{68}Ga-AMBA en imagerie TEP a prouvé que ce radiotraceur est un bon outil d'imagerie non invasive qui peut permettre de détecter des modèles de cancer du sein humain dépendant des œstrogènes de manière sensible, là où le ^{18}F-FDG peut manquer de sensibilité. Le rapport de captation du ^{68}Ga-AMBA entre la tumeur et le bruit de fond est élevé et plus reproductible que l'imagerie au ^{18}F-FDG. Il permet de suivre l'efficacité d'une hormothérapie connue et pourrait permettre par la suite d'évaluer de nouveaux traitements ou combinaison de traitements en phase de développement préclinique, voire mieux comprendre le lien entre les différentes voies de signalisation comme celles du GRPR, des ER et de l'EGFR.

En effet, des études récentes montrent que l'activation du GRPR entraîne des réponses de croissance tumorale fréquemment médiée par la transactivation d'EGFR ou HER2 (X. Li *et al.*, 2010, Moody *et al.*, 2016, S. M. Thomas *et al.*, 2005). En 2016, Woody et al. ont montré que des ligands antagonistes de la bombésine, de la neurotensine et de la cholécystokinine, tous ligands de RCPG, inhibaient la croissance tumorale de cellules du cancer du poumon et augmentaient la cytotoxicité du gefitinib, un inhibiteur de tyrosine kinase de l'EGFR. Ils ont ainsi proposé un schéma explicatif de la capacité des peptides analogues des RCPG à réguler la transactivation de EGFR aboutissant à la croissance tumorale (Moody *et al.*, 2016). Nous pourrions ainsi envisager de traiter des souris porteuses de tumeurs ZR75-1 par une combinaison de tamoxifène ou d'antagonistes de la bombésine avec du géfitinib un inhibiteur de l'EGFR et de suivre l'efficacité de ce traitement à l'aide de l'imagerie TEP au ^{68}Ga-AMBA.

Une étude récente confirme que les tumeurs ER+ représentent la majorité des cas de cancer du sein (81% selon Stoykow et al.) (Christian Stoykow *et al.*, 2016b). Nous avons vu que les patientes atteintes de cancer du sein ER+ seraient un groupe cible potentiel pour l'imagerie ou la radiothérapie ciblée avec des radioligands du GRPR si nous disposions d'un ligand utilisable en clinique, dépourvu d'effets secondaires importants comme un antagoniste.

Les données obtenues dans des études précliniques d'autoradiographie quantitative sur coupes de tumeurs humaines, et les premiers résultats d'imagerie TEP en clinique avec ^{68}Ga-NODAGA-JR11 ou de thérapie ciblée avec ^{177}Lu-DOTA-JR11 ont donné des résultats très encourageants et montrent le potentiel des antagonistes de la somatostatine radiomarqués pour l'imagerie et la

thérapie des tumeurs neuroendocrines (Fani *et al.*, 2017, Nicolas *et al.*, 2017). Les effets indésirables rapportés lors de l'évaluation clinique de ^{177}Lu-AMBA chez des patients atteints de cancer de la prostate, pourraient être ainsi évités avec les antagonistes du GRPR au lieu des agonistes (Cescato *et al.*, 2008).

Depuis 2009, des antagonistes du GRPR ont été développés par différentes équipes. Malgré leur manque d'internalisation (que l'on voyait au départ comme un défaut) et leur affinité relativement faible pour les récepteurs GRPR, ils démontrent des propriétés de ciblage tumoral supérieures aux agonistes et notamment à l'AMBA dans des modèles de cancer de la prostate (Mansi *et al.*, 2009). Ils ont l'avantage de rester plus longtemps sur la tumeur : l'antagoniste RM2 marqué avec de l'indium non radioactif natIn-RM2 se lie au GRPR avec une affinité élevée (IC50 9.3±3.3 nM).). Sa fixation tumorale est spécifique et prolongée dans un modèle de tumeurs PC3 (14.1%ID / g à 1h, 13.6%ID/g à 2h *ex vivo* pour le ^{68}Ga-RM2) (Mansi *et al.*, 2011).

Ces deux dernières années, des résultats prometteurs ont été obtenus en clinique avec des dérivés d'antagonistes GRPR radiomarqués : le ^{68}Ga-SB3 a été bien toléré par les patients mais n'a permis de détecter que 50% (4/8) des cancers du sein tous types confondus à des stades avancés de la maladie (Maina *et al.*, 2016). Le NeoBOMB1, un peptide dérivé du SB3 marqué avec du gallium froid (natGa-NeoBOMB1) a montré une très bonne affinité pour le GRPR avec une IC50 de 1,17 ± 0,06 nmol/L. Marqué au gallium-67, le ^{67}Ga-NeoBOMB1 présente une très bonne stabilité plasmatique de 95% 5 min après injection, et de 90% 30 min après injection. Injecté à des souris porteuses de tumeurs de la prostate PC3, sa captation tumorale (12,4 ± 2,3 %ID/g) est optimale 2h après injection avec cependant une fixation dans le pancréas de 22,7 ± 3,3 %ID/g et une rétention dans les reins et le foie de 5,7 ± 2,4 et 8,3 ± 1,8% ID / g, respectivement, conséquence de son excrétion rénale et hépatobiliaire. Une biodistribution quasi identique a été retrouvée avec le ^{177}Lu-NeoBOMB1 (S. U. Dalm *et al.*, 2017a, Nock *et al.*, 2017).

En parallèle, le ^{68}Ga-RM2 a été utile pour localiser les récidives de cancer de la prostate dans la majorité des cas (C. Stoykow *et al.*, 2016a, Wieser *et al.*, 2017) ou a été utilisé avec succès pour une stadification initiale avant traitement chez quinze patientes atteintes d'un carcinome mammaire primitif. La TEP/TDM au ^{68}Ga-RM2 a montré une forte fixation par rapport au tissu mammaire normal (défini comme TEP-positif) dans 13 tumeurs sur 18. Toutes les tumeurs primaires positives en TEP étaient ER et PR positives (13/13). Le SUVmax moyen des tumeurs ER+ était de 10,6 ± 6,0 par rapport à 2,3 ± 1,0 dans les tumeurs ER- (p = 0,016).

La TEP/TDM au ^{68}Ga-RM2 a détecté des ganglions lymphatiques mammaires (n = 8), une métastase ganglionnaire axillaire controlatérale (vérifiée par biopsie) et une métastase osseuse (n = 1; non détectée sur la scintigraphie osseuse et la TDM).

Le statut du récepteur des estrogènes est habituellement déjà connu au moment de la stadification du cancer du sein grâce au diagnostic initial par biopsie, il parait donc possible d'utiliser la TEP à l'aide d'un radiotraceur du GRPR pour la stadification initiale des tumeurs primaires ER+. D'autre part, si la corrélation entre la liaison au GRPR et l'expression ER dans le cancer du sein est également vérifiée, la TEP au GRPR pourrait également être utile pour suivre l'évolution du statut ER et donc l'efficacité des traitements, au cours du temps.

Le statut ER de cancers du sein peut être évalué en imagerie TEP avec du ^{18}F-FES (^{18}F-fluoroestradiol), ligand spécifique des ER, avec une sensibilité globale de 84% pour la détection des cancers du sein ER-positif (van Kruchten *et al.*, 2013). La fixation tumorale du ^{68}Ga-RM2 montre une corrélation avec l'expression de ER (Spearman $\rho = 0{,}70$, $p = 0{,}0013$) du même ordre que celle rapporté avec la ^{18}F-FES (Christian Stoykow *et al.*, 2016b). Les avantages possibles de la TEP/TDM avec du ^{68}Ga-RM2 par rapport à la ^{18}F-FES seraient une biodistribution plus favorable pour la stadification de la tumeur en raison d'un marquage beaucoup plus faible au niveau intestinal et hépatique. De plus, le ^{68}Ga-RM2 se liant au GRPR, il est moins susceptible que la ^{18}F-FES d'être affecté par les œstrogènes endogènes, les concentrations sériques de globuline liant les hormones sexuelles et les traitements par anti-oestrogènes. Cependant, il reste à voir si et dans quelle mesure ces facteurs affectent l'expression du GRPR et ainsi la fixation du ^{68}Ga-RM2 comme condition préalable à l'utilisation possible de ce traceur en imagerie TEP pour le suivi du traitement.

Ainsi, nous comptons comparer les propriétés *in vivo* du ^{68}Ga-NeoBOMB1 ou du ^{68}Ga-RM2 et du ^{68}Ga-AMBA à l'aide de l'imagerie TEP dans nos modèles de cancers du sein dépendants des estrogènes exprimant le GRPR pour évaluer l'efficacité de ces radiotraceurs pour le suivi des traitements.

XIV. Conclusions et perspectives sur les analogues radiomarqués de la neurotensine

Le ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 a un profil de pharmacocinétique et de biodistribution très favorable, ce qui se traduit par des images TEP de très bons contrastes tumeur/organes sains chez des souris porteuses soit d'une xénogreffe sous-cutanée soit d'une tumeur orthotopique humaine de PDAC mimant mieux la détection d'une lésion cancéreuse *in situ*. De plus, contrairement au ^{18}F-FDG, le ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 est capable de discriminer le PDAC d'une pancréatite aiguë expérimentale induite par la cearuléine, dans des modèles murins.

Comme Von Forstner et al. nous avons obtenu une faible captation de ^{18}F-FDG dans les tumeurs orthotopiques de PDAC (von Forstner *et al.*, 2008). Une seule étude a réussi à utiliser la TEP au ^{18}F-FDG pour suivre l'effet précoce d'une thérapie combinée dans un modèle de cancer pancréatique orthotopique utilisant la lignée MIA PaCa-2 (Shah *et al.*, 2012). Nous comptons tester maintenant l'efficacité de ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 à suivre de nouvelles thérapeutiques et notamment de voir si, après traitement à la gemcitabine, la fixation du traceur et également l'expression du NTR1 est diminuée.

Le radiotraceur ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 semble donc être un bon candidat pour l'imagerie TEP de la surexpression du NTR1 dans l'adénocarcinome pancréatique exocrine humain et pourrait bénéficier aux patients susceptibles de développer un PDAC.

Comme pour le développement des analogues radiomarqués de la bombésine, plusieurs équipes s'intéressent au développement d'analogues antagonistes de la neurotensine. Comme nous l'avons vu pour les analogues de la bombésine, les antagonistes des GPCR ont été décrits comme ayant une fixation et une rétention tumorales supérieures à celles des agonistes, ce qui serait favorable à la radiothérapie ciblée (Fani *et al.*, 2017). Schulz et al. ont modifié l'antagoniste connu des NTRs le SR142948A (Gully *et al.*, 1997) par l'ajout d'un chélate DOTA et d'un groupement espaceur aboutissant au composé 3BP-227 (Schulz *et al.*, 2016). Son profil de biodistribution, après marquage à l'indium-111, chez des souris porteuses de tumeurs HT29 a confirmé une accumulation tumorale élevée et une faible captation dans les tissus normaux, conduisant à des rapports tumeurs/reins très favorables (3,26) 20 h après l'injection. Pourtant, même si 3h après injection du radiotraceur, 19%ID/g était retrouvé dans la tumeur, une grosse activité résiduelle était présente dans le sang (7%ID/g), accompagnée d'une accumulation au niveau des reins, de l'intestin et du foie de 2 à 5%ID/g, ne permettant pas des images avec un bon contraste tumeurs/organes sains suggérant que ce peptide antagoniste n'est pas compatible avec une imagerie TEP au gallium-68 en moins d'une heure après l'injection.
Radiomarqué au lutétium-177, ce peptide est un candidat prometteur pour la radiothérapie ciblée, avec un profil préliminaire favorable dans la tumeur HT29 et un fort potentiel de translation en clinique (Schulz *et al.*, 2017). Baum et al. viennent d'ailleurs de rapporter la première preuve clinique de la faisabilité du traitement de patients atteints de PDAC en utilisant le ^{177}Lu-3BP-227 (R. P. Baum *et al.*, 2017).

Ainsi, le ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 pourrait aider à mieux définir la population de patients suqceptibles de bénéficier d'une radiothérapie ciblée, par exemple avec le DOTA-NT20.3 marqué ^{177}Lu ou bien

encore avec un antagoniste du NTR1 marqué au ^{177}Lu, le 3BP-227.

XIV.1. Projet FluoNTep

Lors de l'appel à amorces de collaboration du Work Package « Agent d'imagerie moléculaire » nous avons présenté un projet intitulé « FluoNTep : Sonde bimodale analogue de la NeuroTensine pour l'imagerie TEP et la chirurgie du cancer du pancréas guidée par FLUOrescence » qui a été financé en 2017 par FranceLifeImaging pour 2 ans. (Porteurs du projet : Victor Goncalves, MCF, ICMUB et **Aurélie Prignon** IE, LIMP)

Chez les patients opérés d'un PDAC, les résections incomplètes laissent en place un reliquat microscopique qui présente un risque de récurrence supérieur à 80% (*Rau et al. 2012*). Ceci est dû en partie à la difficulté d'évaluer les marges tumorales en per-opératoire. La chirurgie du cancer guidée par fluorescence (FGS), est une technique récemment introduite en clinique. Associée à une sonde fluorescente spécifique, elle permet d'identifier avec plus de précision l'extension locale de la tumeur et de ses métastases, invisibles à l'œil nu.
L'objectif de ce projet collaboratif est de développer à partir du peptide DOTA-NT20.3 un ensemble de sondes d'imagerie bimodales (Fluo et TEP) ciblant le NTR1 et de démontrer chez le petit animal leur intérêt potentiel pour l'imagerie et la chirurgie de patients atteints de cancer du pancréas. L'intérêt serait double : radioactive la sonde permettrait de diagnostiquer et dresser le bilan d'extension de la maladie en TEP et fluorescente elle faciliterait l'exérèse de la tumeur grâce à la détection peropératoire de la tumeur et de ses métastases. En effet, la détection peropératoire de la radioactivité présente des difficultés en termes de radioprotection pour le personnel et particulièrement pour les mains du chirurgien.

La TEP permet le diagnostic de nombreuses tumeurs mais sa résolution spatiale est limitée. En revanche, l'imagerie par fluorescence optique a une résolution spatiale très élevée. Cette technique souffre cependant d'une faible profondeur de pénétration des tissus ce qui la rend incompatible avec les techniques d'imagerie du corps entier mais en fait une technique précieuse pour le développement d'agents d'imagerie per opératoire. Certains fluorophores disposent déjà de l'AMM, d'autres font l'objet d'évaluations cliniques, c'est le cas du cetuximab-IRDye 800CW en cours d'essai chez des patients atteints d'adénocarcinome pancréatique et bénéficiant d'une chirurgie (essai n°NCT02736578, phase I/II démarré en avril 2016 et terminé en juillet 2017, résultats non disponibles).
La conception d'une même sonde bimodale TEP et fluorescente pourrait combiner les avantages des deux techniques d'imagerie et permettre une approche théranostique. Ainsi, la distribution de la

sonde pour l'imagerie TEP pré-opératoire sera identique à la distribution de la sonde optique en per-opératoire et la sélection des patients pouvant bénéficier d'une chirurgie sera facilitée. Cette approche est particulièrement intéressante car la modification, même très légère, d'un conjugué peptidique peut avoir des conséquences majeures sur l'affinité et la biodistribution. Notre démarche permettra de moduler le système à la fois par le choix du chélate, du fluorophore et de la structure chimique pour converger vers l'agent d'imagerie optimal.

XIV.2. Projet NeuroTEPsine

Nous avons par ailleurs répondu à un appel à manisfestation d'intérêts lancé par Medicen pour le développement de biomarqueurs pour le diagnostic précoce du cancer du pancréas exocrine. Partenaires : groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière/ Université Paris VI ; Dr Jean-Baptiste Bachet et Dr Jéremy Augustin. Groupe Hospitalier Est parisien : Tenon/St-Antoine/ Université Paris VI Pr Jean-Noël Talbot, Dr Sona Balogova, Dr Magali Svrcek et Aurélie Prignon.

Nos objectifs sont d'une part de déterminer le pourcentage réel de patients PDAC surexprimant le NTR1 pour mieux guider les objectifs d'une étude clinique utilisant un traceur TEP analogue de la neurotensine et convaincre l'industriel de l'intérêt de ce traceur TEP dans cette indication, décision GO/NO GO. D'autre part, nous voulons vérifier si la chimiothérapie et/ou la radiothérapie avant la résection chirurgicale ou la biopsie peuvent influencer l'expression du NTR1.

Ceci permettrait de préciser dans quelles indications proposer une étude clinique pour évaluer le potentiel de ^{68}Ga-DOTA-NT20.3 pour le diagnostic du PDAC. Une prévalence forte de l'expression du récepteur permettrait la caractérisation des anomalies du pancréas du fait de la bonne spécificité du peptide (que n'a pas le ^{18}F-FDG). Une prévalence plus faible ferait limiter l'indication à la stadification et au suivi des PDAC une fois démontrée la surexpression du NTR1. Ces études permettraient également de déterminer si le degré d'expression du NTR1 est un facteur de mauvais pronostic dans l'adénocarcinome pancréatique et si celui-ci est corrélé au grade et à la survie.

Bibliographie

Abdel-Hafiz HA (2017) Epigenetic Mechanisms of Tamoxifen Resistance in Luminal Breast Cancer. *Diseases* 5(3):16.

Abiraj K, Mansi R, Tamma ML, Fani M, Forrer F, Nicolas G, Cescato R, Reubi JC & Maecke HR (2011) Bombesin antagonist-based radioligands for translational nuclear imaging of gastrin-releasing peptide receptor-positive tumors. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 52(12):1970-1978.

Achilefu S, Srinivasan A, Schmidt MA, Jimenez HN, Bugaj JE & Erion JL (2003) Novel bioactive and stable neurotensin peptide analogues capable of delivering radiopharmaceuticals and molecular beacons to tumors. *Journal of medicinal chemistry* 46(15):3403-3411.

Akizawa H, Arano Y, Mifune M, Iwado A, Saito Y, Mukai T, Uehara T, Ono M, Fujioka Y, Ogawa K, Kiso Y & Saji H (2001) Effect of molecular charges on renal uptake of 111In-DTPA-conjugated peptides. *Nuclear medicine and biology* 28(7):761-768.

Akizawa H, Arano Y, Uezono T, Ono M, Fujioka Y, Uehara T, Yokoyama A, Akaji K, Kiso Y, Koizumi M & Saji H (1998) Renal metabolism of 111In-DTPA-D-Phe1-octreotide in vivo. *Bioconjugate chemistry* 9(6):662-670.

Akizawa H, Saito M, Tsukamoto I, Ohkura T, Shimizu T, Kitamura Y, Mifune M, Saito Y, Arano Y & Saji H (2007) Effect of carboxyl-group of D-glutamic acid or gamma-carboxy-D-glutamic acid as N-terminal amino acid of (111)in-diethylenetriaminepentaacetic acid-octreotide on accumulation of radioactivity in kidney. *Biol Pharm Bull* 30(11):2226-2228.

Al-Bader M, Ford C, Al-Ayadhy B & Francis I (2011) Analysis of estrogen receptor isoforms and variants in breast cancer cell lines. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2(3):537-544.

Alberto R, Schibli R, Egli A, Schubiger AP, Abram U & Kaden TA (1998) A Novel Organometallic Aqua Complex of Technetium for the Labeling of Biomolecules: Synthesis of [99mTc(OH2)3(CO)3]+ from [99mTcO4]- in Aqueous Solution and Its Reaction with a Bifunctional Ligand. *Journal of the American Chemical Society* 120(31):7987-7988.

Albrecht M, Doroszewicz J, Gillen S, Gomes I, Wilhelm B, Stief T & Aumuller G (2004) 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(1):82-94.

Alexanderson E, Mannting F, Gomez-Martin D, Fermon S & Meave A (2004) Technetium-99m-Sestamibi SPECT myocardial perfusion imaging in patients with complete left bundle branch block. *Archives of medical research* 35(2):150-156.

Alifano M, Loi M, Camilleri-Broet S, Dupouy S, Regnard JF & Forgez P (2010a) Neurotensin expression and outcome of malignant pleural mesothelioma. *Biochimie* 92(2):164-170.

Alifano M, Souaze F, Dupouy S, Camilleri-Broet S, Younes M, Ahmed-Zaid SM, Takahashi T, Cancellieri A, Damiani S, Boaron M, Broet P, Miller LD, Gespach C, Regnard JF & Forgez P (2010b) Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16(17):4401-4410.

Alshoukr F, Rosant C, Maes V, Abdelhak J, Raguin O, Burg S, Sarda L, Barbet J, Tourwe D, Pelaprat D & Gruaz-Guyon A (2009) Novel neurotensin analogues for radioisotope targeting to neurotensin receptor-positive tumors. *Bioconjugate chemistry* 20(8):1602-1610.

Amir E, Miller N, Geddie W, Freedman O, Kassam F, Simmons C, Oldfield M, Dranitsaris G, Tomlinson G, Laupacis A, Tannock IF & Clemons M (2012) Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 30(6):587-592.

Amorino GP, Deeble PD & Parsons SJ (2007) Neurotensin stimulates mitogenesis of prostate cancer cells through a novel c-Src/Stat5b pathway. *Oncogene* 26(5):745-756.

Amouroux G, Pan J, Jenni S, Zhang C, Zhang Z, Hundal-Jabal N, Colpo N, Liu Z, Benard F & Lin

KS (2015) Imaging Bradykinin B1 Receptor with 68Ga-Labeled [des-Arg10]Kallidin Derivatives: Effect of the Linker on Biodistribution and Tumor Uptake. *Molecular pharmaceutics* 12(8):2879-2888.

Ananias HJK, Yu Z, Hoving HD, Rosati S, Dierckx RA, Wang F, Yan Y, Chen X, Pruim J, Lub-de Hooge MN, Helfrich W, Elsinga PH & de Jong IJ (2013) Application of 99mTechnetium-HYNIC(tricine/TPPTS)-Aca-Bombesin(7-14) SPECT/CT in prostate cancer patients: A first-in-man study. *Nuclear medicine and biology* 40(7):933-938.

Anastasi A, Erspamer V & Bucci M (1971) Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombina and Alytes. *Experientia* 27(2):166-167.

Anger HO & Gottschalk A (1963) Localization of Brain Tumors with the Positron Scintillation Camera. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 4:326-330.

Antunes P, Ginj M, Walter MA, Chen J, Reubi JC & Maecke HR (2007) Influence of different spacers on the biological profile of a DOTA-somatostatin analogue. *Bioconjugate chemistry* 18(1):84-92.

Aprikian AG, Tremblay L, Han K & Chevalier S (1997) Bombesin stimulates the motility of human prostate-carcinoma cells through tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and of integrin-associated proteins. *International journal of cancer* 72(3):498-504.

Asti M, De Pietri G, Fraternali A, Grassi E, Sghedoni R, Fioroni F, Roesch F, Versari A & Salvo D (2008) Validation of (68)Ge/(68)Ga generator processing by chemical purification for routine clinical application of (68)Ga-DOTATOC. *Nuclear medicine and biology* 35(6):721-724.

Avril S, Muzic RF, Plecha D, Traughber BJ, Vinayak S & Avril N (2016) (18)F-FDG PET/CT for Monitoring of Treatment Response in Breast Cancer. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 57(Suppl 1):34S-39S.

Ayala-Sarmiento AE, Martinez-Fong D & Segovia J (2015) The Internalization of Neurotensin by the Low-Affinity Neurotensin Receptors (NTSR2 and vNTSR2) Activates ERK 1/2 in Glioma Cells and Allows Neurotensin-Polyplex Transfection of tGAS1. *Cellular and molecular neurobiology* 35(6):785-795.

Bakirtzi K, Hatziapostolou M, Karagiannides I, Polytarchou C, Jaeger S, Iliopoulos D & Pothoulakis C (2011) Neurotensin signaling activates microRNAs-21 and -155 and Akt, promotes tumor growth in mice, and is increased in human colon tumors. *Gastroenterology* 141(5):1749-1761 e1741.

Barber TW, Kalff V, Cherk MH, Yap KS, Evans P & Kelly MJ (2011) 18 F-FDG PET/CT influences management in patients with known or suspected pancreatic cancer. *Internal medicine journal* 41(11):776-783.

Bardeesy N & DePinho RA (2002) Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature reviews. Cancer* 2(12):897-909.

Barone R, Van Der Smissen P, Devuyst O, Beaujean V, Pauwels S, Courtoy PJ & Jamar F (2005) Endocytosis of the somatostatin analogue, octreotide, by the proximal tubule-derived opossum kidney (OK) cell line. *Kidney Int* 67(3):969-976.

Barroso S, Richard F, Nicolas-Etheve D, Reversat JL, Bernassau JM, Kitabgi P & Labbe-Jullie C (2000) Identification of residues involved in neurotensin binding and modeling of the agonist binding site in neurotensin receptor 1. *J Biol Chem* 275(1):328-336.

Bartholdi MF, Wu JM, Pu H, Troncoso P, Eden PA & Feldman RI (1998) In situ hybridization for gastrin-releasing peptide receptor (GRP receptor) expression in prostatic carcinoma. *International journal of cancer* 79(1):82-90.

Baum R, Prasad V, Mutloka N, Frischknecht M, Maecke H & Reubi J (2007) Molecular imaging of bombesin receptors in various tumors by Ga-68 AMBA PET/CT: First results. *Journal of Nuclear Medicine* 48(supplement 2):79P.

Baum RP, Singh A, Schuchardt C, Kulkarni HR, Klette I, Wiessalla S, Osterkamp F, Reineke U &

Smerling C (2017) (177)Lu-3BP-227 for neurotensin receptor 1-targeted therapy of metastatic pancreatic adenocarcinoma - first clinical results. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 10.2967/jnumed.117.193847.

Baxendale IR, Cheung S, Kitching MO, Ley SV & Shearman JW (2013) The synthesis of neurotensin antagonist SR 48692 for prostate cancer research. *Bioorganic & medicinal chemistry* 21(14):4378-4387.

Behe M, Becker W, Gotthardt M, Angerstein C & Behr TM (2003) Improved kinetic stability of DTPA- dGlu as compared with conventional monofunctional DTPA in chelating indium and yttrium: preclinical and initial clinical evaluation of radiometal labelled minigastrin derivatives. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 30(8):1140-1146.

Beraud-Dufour S, Coppola T, Massa F & Mazella J (2009) Neurotensin receptor-2 and -3 are crucial for the anti-apoptotic effect of neurotensin on pancreatic beta-TC3 cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41(12):2398-2402.

Bergmann R, Scheunemann M, Heichert C, Mading P, Wittrisch H, Kretzschmar M, Rodig H, Tourwe D, Iterbeke K, Chavatte K, Zips D, Reubi JC & Johannsen B (2002) Biodistribution and catabolism of (18)F-labeled neurotensin(8-13) analogs. *Nuclear medicine and biology* 29(1):61-72.

Berry DJ, Ma Y, Ballinger JR, Tavaré R, Koers A, Sunassee K, Zhou T, Nawaz S, Mullen GED, Hider RC & Blower PJ (2011) Efficient bifunctional gallium-68 chelators for positron emission tomography: tris(hydroxypyridinone) ligands. *Chemical communications (Cambridge, England)* 47(25):7068-7070.

Bockaert J & Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO journal* 18(7):1723-1729.

Bodei L, Cremonesi M, Ferrari M, Pacifici M, Grana CM, Bartolomei M, Baio SM, Sansovini M & Paganelli G (2008) Long-term evaluation of renal toxicity after peptide receptor radionuclide therapy with 90Y-DOTATOC and 177Lu-DOTATATE: the role of associated risk factors. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 35(10):1847-1856.

Bologna M, Festuccia C, Muzi P, Biordi L & Ciomei M (1989) Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer* 63(9):1714-1720.

Boonstra MC, de Geus SWL, Prevoo HAJM, Hawinkels LJAC, van de Velde CJH, Kuppen PJK, Vahrmeijer AL & Sier CFM (2016) Selecting Targets for Tumor Imaging: An Overview of Cancer-Associated Membrane Proteins. *Biomarkers in Cancer* 8:119-133.

Botto JM, Chabry J, Nouel D, Paquet M, Seguela P, Vincent JP, Beaudet A & Mazella J (1997) Identification in the rat neurotensin receptor of amino-acid residues critical for the binding of neurotensin. *Brain research* 46(1-2):311-317.

Bouwmeester H, Snapper J, Ronken E, Kruse CG & van Ree JM (2003) Effects of neonatal amygdala lesions on [125I] neurotensin binding in specific brain areas of adult rat. *The European journal of neuroscience* 17(6):1319-1322.

Breeman WA, de Jong M, de Blois E, Bernard BF, Konijnenberg M & Krenning EP (2005) Radiolabelling DOTA-peptides with 68Ga. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 32(4):478-485.

Bruehlmeier M, Garayoa EG, Blanc A, Holzer B, Gergely S, Tourwe D, Schubiger PA & Blauenstein P (2002) Stabilization of neurotensin analogues: effect on peptide catabolism, biodistribution and tumor binding. *Nuclear medicine and biology* 29(3):321-327.

Buchegger F, Bonvin F, Kosinski M, Schaffland AO, Prior J, Reubi JC, Blauenstein P, Tourwe D, Garcia Garayoa E & Bischof Delaloye A (2003) Radiolabeled neurotensin analog, 99mTc-NT-XI, evaluated in ductal pancreatic adenocarcinoma patients. *J Nucl Med* 44(10):1649-1654.

Buchmann I, Henze M, Engelbrecht S, Eisenhut M, Runz A, Schafer M, Schilling T, Haufe S, Herrmann T & Haberkorn U (2007) Comparison of 68Ga-DOTATOC PET and 111In-DTPAOC (Octreoscan) SPECT in patients with neuroendocrine tumours. *European journal*

of nuclear medicine and molecular imaging 34(10):1617-1626.
Buck AC, Schirrmeister HH, Guhlmann CA, Diederichs CG, Shen C, Buchmann I, Kotzerke J, Birk D, Mattfeldt T & Reske SN (2001) Ki-67 immunostaining in pancreatic cancer and chronic active pancreatitis: does in vivo FDG uptake correlate with proliferative activity? *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 42(5):721-725.
Cagnolini A, Chen J, Ramos K, Skedzielewski TM, Lantry LE, Nunn AD, Swenson RE & Linder KE (2010) 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. *Applied radiation and isotopes : including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine* 68(12):2285-2292.
Callery MP, Chang KJ, Fishman EK, Talamonti MS, William Traverso L & Linehan DC (2009) Pretreatment assessment of resectable and borderline resectable pancreatic cancer: expert consensus statement. *Annals of surgical oncology* 16(7):1727-1733.
Cameron DA, Ritchie AA, Langdon S, Anderson TJ & Miller WR (1997) Tamoxifen induced apoptosis in ZR-75 breast cancer xenografts antedates tumour regression. *Breast cancer research and treatment* 45(2):99-107.
Canto MI, Hruban RH, Fishman EK, Kamel IR, Schulick R, Zhang Z, Topazian M, Takahashi N, Fletcher J, Petersen G, Klein AP, Axilbund J, Griffin C, Syngal S, Saltzman JR, Mortele KJ, Lee J, Tamm E, Vikram R, Bhosale P, Margolis D, Farrell J, Goggins M & American Cancer of the Pancreas Screening C (2012) Frequent detection of pancreatic lesions in asymptomatic high-risk individuals. *Gastroenterology* 142(4):796-804; quiz e714-795.
Carraway R & Leeman SE (1973) The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *The Journal of biological chemistry* 248(19):6854-6861.
Carraway R & Leeman SE (1975) The amino acid sequence of a hypothalamic peptide, neurotensin. *The Journal of biological chemistry* 250(5):1907-1911.
Carraway RE & Plona AM (2006) Involvement of neurotensin in cancer growth: evidence, mechanisms and development of diagnostic tools. *Peptides* 27(10):2445-2460.
Cescato R, Maina T, Nock B, Nikolopoulou A, Charalambidis D, Piccand V & Reubi JC (2008) Bombesin receptor antagonists may be preferable to agonists for tumor targeting. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 49(2):318-326.
Chabry J, Labbe-Jullie C, Gully D, Kitabgi P, Vincent JP & Mazella J (1994) Stable expression of the cloned rat brain neurotensin receptor into fibroblasts: binding properties, photoaffinity labeling, transduction mechanisms, and internalization. *Journal of neurochemistry* 63(1):19-27.
Chalon P, Vita N, Kaghad M, Guillemot M, Bonnin J, Delpech B, Le Fur G, Ferrara P & Caput D (1996) Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site. *FEBS letters* 386(2-3):91-94.
Chen J, Feng W, Arunachalam T, Metcalfe E, Nunn A & Linder K (2007) Preparation and in vitro binding of 67Ga-AMBA, comparison to 177Lu-AMBA. *Journal of Nuclear Medicine* 48(supplement 2):306P.
Chen J, Linder KE, Cagnolini A, Metcalfe E, Raju N, Tweedle MF & Swenson RE (2008) Synthesis, stabilization and formulation of [177Lu]Lu-AMBA, a systemic radiotherapeutic agent for Gastrin Releasing Peptide receptor positive tumors. *Applied radiation and isotopes : including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine* 66(4):497-505.
Chikamoto A, Inoue R, Komohara Y, Sakamaki K, Hashimoto D, Shiraishi S, Takamori H, Yamashita YI, Yoshida N, Yamanaka T, Yamashita Y & Baba H (2017) Preoperative High Maximum Standardized Uptake Value in Association with Glucose Transporter 1 Predicts Poor Prognosis in Pancreatic Cancer. *Annals of surgical oncology* 24(7):2040-2046.
Choi M, Heilbrun LK, Venkatramanamoorthy R, Lawhorn-Crews JM, Zalupski MM & Shields AF (2010) Using (18)F Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography (FDG PET) to Monitor Clinical Outcomes in Patients Treated with Neoadjuvant Chemo-Radiotherapy for

Locally Advanced Pancreatic Cancer. *American journal of clinical oncology* 33(3):10.1097/COC.1090b1013e3181a1076a1090b.

Christensen EI, Birn H, Verroust P & Moestrup SK (1998) Megalin-mediated endocytosis in renal proximal tubule. *Ren Fail* 20(2):191-199.

Chung GG, Zerkowski MP, Ghosh S, Camp RL & Rimm DL (2007) Quantitative analysis of estrogen receptor heterogeneity in breast cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 87(7):662-669.

Cives M & Strosberg J (2017) Radionuclide Therapy for Neuroendocrine Tumors. *Current oncology reports* 19(2):9.

Cochet A, Dygai-Cochet I, Riedinger JM, Humbert O, Berriolo-Riedinger A, Toubeau M, Guiu S, Coutant C, Coudert B, Fumoleau P & Brunotte F (2014) (1)(8)F-FDG PET/CT provides powerful prognostic stratification in the primary staging of large breast cancer when compared with conventional explorations. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 41(3):428-437.

Constantinides C, Lazaris AC, Haritopoulos KN, Pantazopoulos D, Chrisofos M & Giannopoulos A (2003) Immunohistochemical detection of gastrin releasing peptide in patients with prostate cancer. *World journal of urology* 21(3):183-187.

Coppola T, Béraud-Dufour S, Antoine A, Vincent J-P & Mazella J (2008) Neurotensin protects pancreatic beta cells from apoptosis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40(10):2296-2302.

Czernin J, Allen-Auerbach M & Schelbert HR (2007) Improvements in cancer staging with PET/CT: literature-based evidence as of September 2006. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 48 Suppl 1:78S-88S.

Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J & Shi B (2015) Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American Journal of Cancer Research* 5(10):2929-2943.

Dalm SU, Bakker IL, de Blois E, Doeswijk GN, Konijnenberg MW, Orlandi F, Barbato D, Tedesco M, Maina T, Nock BA & de Jong M (2017a) 68Ga/177Lu-NeoBOMB1, a Novel Radiolabeled GRPR Antagonist for Theranostic Use in Oncology. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 58(2):293-299.

Dalm SU, Sieuwerts AM, Look MP, Melis M, van Deurzen CH, Foekens JA, de Jong M & Martens JW (2015) Clinical Relevance of Targeting the Gastrin-Releasing Peptide Receptor, Somatostatin Receptor 2, or Chemokine C-X-C Motif Receptor 4 in Breast Cancer for Imaging and Therapy. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 56(10):1487-1493.

Dalm SU, Verzijlbergen JF & De Jong M (2017b) Review: Receptor Targeted Nuclear Imaging of Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 18(2):260.

Dam JH, Olsen BB, Baun C, Hoilund-Carlsen PF & Thisgaard H (2016) In Vivo Evaluation of a Bombesin Analogue Labeled with Ga-68 and Co-55/57. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging* 18(3):368-376.

de Aguiar Ferreira C, Fuscaldi LL, Townsend DM, Rubello D & de Barros ALB (2017) Radiolabeled bombesin derivatives for preclinical oncological imaging. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 87:58-72.

De Cicco C, Gilardi L, Botteri E, Fracassi SL, Di Dia GA, Botta F, Prisco G, Lombardo D, Rotmensz N, Veronesi U & Paganelli G (2013) Is [18F] fluorodeoxyglucose uptake by the primary tumor a prognostic factor in breast cancer? *Breast* 22(1):39-43.

de Jong M, Barone R, Krenning E, Bernard B, Melis M, Visser T, Gekle M, Willnow TE, Walrand S, Jamar F & Pauwels S (2005) Megalin is essential for renal proximal tubule reabsorption of (111)In-DTPA-octreotide. *J Nucl Med* 46(10):1696-1700.

De Vincentis G, Remediani S, Varvarigou AD, Di Santo G, Iori F, Laurenti C & Scopinaro F (2004) Role of 99mTc-bombesin scan in diagnosis and staging of prostate cancer. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 19(1):81-84.

De Vincentis G, Scopinaro F, Varvarigou A, Ussof W, Schillaci O, Archimandritis S, Corleto V, Longo F & Delle Fave G (2002) Phase I trial of technetium [Leu13] bombesin as cancer seeking agent: possible scintigraphic guide for surgery? *Tumori* 88(3):S28-30.

de Visser M, Janssen PJ, Srinivasan A, Reubi JC, Waser B, Erion JL, Schmidt MA, Krenning EP & de Jong M (2003) Stabilised 111In-labelled DTPA- and DOTA-conjugated neurotensin analogues for imaging and therapy of exocrine pancreatic cancer. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 30(8):1134-1139.

Decristoforo C, Knopp R, von Guggenberg E, Rupprich M, Dreger T, Hess A, Virgolini I & Haubner R (2007) A fully automated synthesis for the preparation of 68Ga-labelled peptides. *Nuclear medicine communications* 28(11):870-875.

Diederichs CG, Staib L, Vogel J, Glasbrenner B, Glatting G, Brambs HJ, Beger HG & Reske SN (2000) Values and limitations of 18F-fluorodeoxyglucose-positron-emission tomography with preoperative evaluation of patients with pancreatic masses. *Pancreas* 20(2):109-116.

Dolais-Kitabgi J, Kitabgi P, Brazeau P & Freychet P (1979) Effect of neurotensin on insulin, glucagon, and somatostatin release from isolated pancreatic islets. *Endocrinology* 105(1):256-260.

Dude I, Zhang Z, Rousseau J, Hundal-Jabal N, Colpo N, Merkens H, Lin K-S & Bénard F (2017) Evaluation of agonist and antagonist radioligands for somatostatin receptor imaging of breast cancer using positron emission tomography. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry* 2(1):4.

Duncan JR, Stephenson MT, Wu HP & Anderson CJ (1997) Indium-111-diethylenetriaminepentaacetic acid-octreotide is delivered in vivo to pancreatic, tumor cell, renal, and hepatocyte lysosomes. *Cancer research* 57(4):659-671.

Duncan JR & Welch MJ (1993) Intracellular metabolism of indium-111-DTPA-labeled receptor targeted proteins. *J Nucl Med* 34(10):1728-1738.

Dupouy S, Doan VK, Wu Z, Mourra N, Liu J, De Wever O, Llorca FP, Cayre A, Kouchkar A, Gompel A & Forgez P (2014) Activation of EGFR, HER2 and HER3 by neurotensin/neurotensin receptor 1 renders breast tumors aggressive yet highly responsive to lapatinib and metformin in mice. *Oncotarget* 5(18):8235-8251.

Dupouy S, Mourra N, Doan VK, Gompel A, Alifano M & Forgez P (2011a) The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. *Biochimie* 93(9):1369-1378.

Dupouy S, Mourra N, Doan VK, Gompel A, Alifano M & Forgez P (2011b) The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. *Biochimie* 93(9):1369-1378.

Dupouy S, Viardot-Foucault V, Alifano M, Souaze F, Plu-Bureau G, Chaouat M, Lavaur A, Hugol D, Gespach C, Gompel A & Forgez P (2009) The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression. *PloS one* 4(1):e4223.

Eder M, Krivoshein AV, Backer M, Backer JM, Haberkorn U & Eisenhut M (2010) 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. *Nuclear medicine and biology* 37(4):405-412.

Eder M, Wangler B, Knackmuss S, LeGall F, Little M, Haberkorn U, Mier W & Eisenhut M (2008) Tetrafluorophenolate of HBED-CC: a versatile conjugation agent for 68Ga-labeled small recombinant antibodies. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 35(10):1878-1886.

Egawa S, Takeda K, Fukuyama S, Motoi F, Sunamura M & Matsuno S (2004) Clinicopathological aspects of small pancreatic cancer. *Pancreas* 28(3):235-240.

Ehlers RA, Kim S, Zhang Y, Ethridge RT, Murrilo C, Hellmich MR, Evans DB, Townsend CM, Jr. & Mark Evers B (2000) Gut peptide receptor expression in human pancreatic cancers. *Annals of surgery* 231(6):838-848.

Elek J, Pinzon W, Park KH & Narayanan R (2000) Relevant genomics of neurotensin receptor in

cancer. *Anticancer research* 20(1A):53-58.
Fani M, Maecke HR & Okarvi SM (2012) Radiolabeled Peptides: Valuable Tools for the Detection and Treatment of Cancer. *Theranostics* 2(5):481-501.
Fani M, Nicolas GP & Wild D (2017) Somatostatin Receptor Antagonists for Imaging and Therapy. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 58(Suppl 2):61S-66S.
Fernstrom MH, Mirski MA, Carraway RE & Leeman SE (1981) Immunoreactive neurotensin levels in pancreas: elevation in diabetic rats and mice. *Metabolism: clinical and experimental* 30(9):853-855.
Ferris HA, Carroll RE, Lorimer DL & Benya RV (1997) Location and Characterization of the Human GRP Receptor Expressed by Gastrointestinal Epithelial Cells. *Peptides* 18(5):663-672.
Festuccia C, Angelucci A, Gravina G, Eleuterio E, Vicentini C & Bologna M (2002) Bombesin-dependent pro-MMP-9 activation in prostatic cancer cells requires beta1 integrin engagement. *Experimental cell research* 280(1):1-11.
Ford CH, Al-Bader M, Al-Ayadhi B & Francis I (2011) Reassessment of estrogen receptor expression in human breast cancer cell lines. *Anticancer research* 31(2):521-527.
Fournier P, Dumulon-Perreault V, Ait-Mohand S, Tremblay S, Benard F, Lecomte R & Guerin B (2012) Novel radiolabeled peptides for breast and prostate tumor PET imaging: (64)Cu/and (68)Ga/NOTA-PEG-[D-Tyr(6),betaAla(11),Thi(13),Nle(14)]BBN(6-14). *Bioconjugate chemistry* 23(8):1687-1693.
Fox J, Maddalena ME, Wedeking P, Chen J, Wang N, Linder K, Nunn A & Lantry L (2007) Comparative biodistributions of 111In, 67Ga and 177Lu-AMBA in PC-3 tumor bearing mice. *Journal of Nuclear Medicine* 48(supplement 2):79P.
Froidevaux S, Calame-Christe M, Tanner H & Eberle AN (2005) Melanoma targeting with DOTA-alpha-melanocyte-stimulating hormone analogs: structural parameters affecting tumor uptake and kidney uptake. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 46(5):887-895.
Froidevaux S, Eberle AN, Christe M, Sumanovski L, Heppeler A, Schmitt JS, Eisenwiener K, Beglinger C & Macke HR (2002) Neuroendocrine tumor targeting: study of novel gallium-labeled somatostatin radiopeptides in a rat pancreatic tumor model. *International journal of cancer* 98(6):930-937.
Fueger BJ, Czernin J, Hildebrandt I, Tran C, Halpern BS, Stout D, Phelps ME & Weber WA (2006) Impact of animal handling on the results of 18F-FDG PET studies in mice. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 47(6):999-1006.
Gabriel M, Decristoforo C, Kendler D, Dobrozemsky G, Heute D, Uprimny C, Kovacs P, Von Guggenberg E, Bale R & Virgolini IJ (2007) 68Ga-DOTA-Tyr3-Octreotide PET in Neuroendocrine Tumors: Comparison with Somatostatin Receptor Scintigraphy and CT. *Journal of Nuclear Medicine* 48(4):508-518.
Gabriel M, Decristoforo C, Woll E, Eisterer W, Nock B, Maina T, Moncayo R & Virgolini I (2011) [99mTc]demotensin VI: biodistribution and initial clinical results in tumor patients of a pilot/phase I study. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 26(5):557-563.
Gallagher BM, Ansari A, Atkins H, Casella V, Christman DR, Fowler JS, Ido T, MacGregor RR, Som P, Wan CN, Wolf AP, Kuhl DE & Reivich M (1977) Radiopharmaceuticals XXVII. 18F-labeled 2-deoxy-2-fluoro-d-glucose as a radiopharmaceutical for measuring regional myocardial glucose metabolism in vivo: tissue distribution and imaging studies in animals. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 18(10):990-996.
Garcia-Garayoa E, Allemann-Tannahill L, Blauenstein P, Willmann M, Carrel-Remy N, Tourwe D, Iterbeke K, Conrath P & Schubiger PA (2001) In vitro and in vivo evaluation of new radiolabeled neurotensin(8-13) analogues with high affinity for NT1 receptors. *Nuclear medicine and biology* 28(1):75-84.

Garcia-Garayoa E, Blauenstein P, Blanc A, Maes V, Tourwe D & Schubiger PA (2009) A stable neurotensin-based radiopharmaceutical for targeted imaging and therapy of neurotensin receptor-positive tumours. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 36(1):37-47.

Garcia-Garayoa E, Maes V, Blauenstein P, Blanc A, Hohn A, Tourwe D & Schubiger PA (2006) Double-stabilized neurotensin analogues as potential radiopharmaceuticals for NTR-positive tumors. *Nuclear medicine and biology* 33(4):495-503.

Garcia Garayoa E, Ruegg D, Blauenstein P, Zwimpfer M, Khan IU, Maes V, Blanc A, Beck-Sickinger AG, Tourwe DA & Schubiger PA (2007) Chemical and biological characterization of new Re(CO)3/[99mTc](CO)3 bombesin analogues. *Nuclear medicine and biology* 34(1):17-28.

Geisler S, Berod A, Zahm DS & Rostene W (2006) Brain neurotensin, psychostimulants, and stress--emphasis on neuroanatomical substrates. *Peptides* 27(10):2364-2384.

George AJ, Hannan RD & Thomas WG (2013) Unravelling the molecular complexity of GPCR-mediated EGFR transactivation using functional genomics approaches. *The FEBS journal* 280(21):5258-5268.

Giacchetti S, Gauville C, de Cremoux P, Bertin L, Berthon P, Abita JP, Cuttitta F & Calvo F (1990) Characterization, in some human breast cancer cell lines, of gastrin-releasing peptide-like receptors which are absent in normal breast epithelial cells. *International journal of cancer* 46(2):293-298.

Ginj M, Zhang H, Waser B, Cescato R, Wild D, Wang X, Erchegyi J, Rivier J, Macke HR & Reubi JC (2006) Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for in vivo peptide receptor targeting of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(44):16436-16441.

Goldenberg A, Masui H, Divgi C, Kamrath H, Pentlow K & Mendelsohn J (1989) Imaging of human tumor xenografts with an indium-111-labeled anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *J Natl Cancer Inst* 81(21):1616-1625.

Gonzalez N, Moody TW, Igarashi H, Ito T & Jensen RT (2008) Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 15(1):58-64.

Gotthardt M, Behe MP, Beuter D, Battmann A, Bauhofer A, Schurrat T, Schipper M, Pollum H, Oyen WJ & Behr TM (2006) Improved tumour detection by gastrin receptor scintigraphy in patients with metastasised medullary thyroid carcinoma. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 33(11):1273-1279.

Gotthardt M, van Eerd-Vismale J, Oyen WJ, de Jong M, Zhang H, Rolleman E, Maecke HR, Behe M & Boerman O (2007) Indication for different mechanisms of kidney uptake of radiolabeled peptides. *J Nucl Med* 48(4):596-601.

Gourni E, Mansi R, Jamous M, Waser B, Smerling C, Burian A, Buchegger F, Reubi JC & Maecke HR (2014) N-terminal modifications improve the receptor affinity and pharmacokinetics of radiolabeled peptidic gastrin-releasing peptide receptor antagonists: examples of 68Ga- and 64Cu-labeled peptides for PET imaging. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 55(10):1719-1725.

Granier C, van Rietschoten J, Kitabgi P, Poustis C & Freychet P (1982) Synthesis and characterization of neurotensin analogues for structure/activity relationship studies. Acetyl-neurotensin-(8--13) is the shortest analogue with full binding and pharmacological activities. *European journal of biochemistry / FEBS* 124(1):117-124.

Groheux D, Sanna A, Majdoub M, de Cremoux P, Giacchetti S, Teixeira L, Espie M, Merlet P, de Roquancourt A, Visvikis D, Hatt M, Resche-Rigon M & Hindie E (2015) Baseline Tumor 18F-FDG Uptake and Modifications After 2 Cycles of Neoadjuvant Chemotherapy Are Prognostic of Outcome in ER+/HER2- Breast Cancer. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 56(6):824-831.

Gugger M & Reubi JC (1999) Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic

human breast. *The American journal of pathology* 155(6):2067-2076.
Guha S, Rey O & Rozengurt E (2002) Neurotensin induces protein kinase C-dependent protein kinase D activation and DNA synthesis in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. *Cancer research* 62(6):1632-1640.
Gui X, Guzman G, Dobner PR & Kadkol SS (2008) Increased neurotensin receptor-1 expression during progression of colonic adenocarcinoma. *Peptides* 29(9):1609-1615.
Guillermet-Guibert J, Lahlou H, Pyronnet S, Bousquet C & Susini C (Somatostatin receptors as tools for diagnosis and therapy: Molecular aspects. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 19(4):535-551.
Gullo L, Pezzilli R, Tomassetti P & de Giorgio R (1998) Plasma cholecystokinin and neurotensin after an ordinary meal in humans. A prolonged time study. *Gastroenterologie clinique et biologique* 22(1):25-28.
Gully D, Canton M, Boigegrain R, Jeanjean F, Molimard JC, Poncelet M, Gueudet C, Heaulme M, Leyris R, Brouard A & et al. (1993) Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(1):65-69.
Gully D, Labeeuw B, Boigegrain R, Oury-Donat F, Bachy A, Poncelet M, Steinberg R, Suaud-Chagny MF, Santucci V, Vita N, Pecceu F, Labbe-Jullie C, Kitabgi P, Soubrie P, Le Fur G & Maffrand JP (1997) Biochemical and pharmacological activities of SR 142948A, a new potent neurotensin receptor antagonist. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 280(2):802-812.
Gunasekera SW, King LJ & Lavender PJ (1972) The behaviour of tracer gallium-67 towards serum proteins. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 39(2):401-406.
Hajri A, Koenig M, Balboni G & Damge C (1996) Expression and characterization of gastrin-releasing peptide receptor in normal and cancerous pancreas. *Pancreas* 12(1):25-35.
Halmos G, Wittliff JL & Schally AV (1995) Characterization of bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in human breast cancer and their relationship to steroid receptor expression. *Cancer research* 55(2):280-287.
Hamacher K, Coenen HH & Stocklin G (1986) Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 27(2):235-238.
Hamidian Jahromi A, Sangster G, Zibari G, Martin B, Chu Q, Takalkar A, Shi R & Shokouh-Amiri H (2013) Accuracy of multi-detector computed tomography, fluorodeoxyglucose positron emission tomography-CT, and CA 19-9 levels in detecting recurrent pancreatic adenocarcinoma. *JOP : Journal of the pancreas* 14(4):466-468.
Hammer RA, Leeman SE, Carraway R & Williams RH (1980) Isolation of human intestinal neurotensin. *The Journal of biological chemistry* 255(6):2476-2480.
Hammond PJ, Wade AF, Gwilliam ME, Peters AM, Myers MJ, Gilbey SG, Bloom SR & Calam J (1993) Amino acid infusion blocks renal tubular uptake of an indium-labelled somatostatin analogue. *Br J Cancer* 67(6):1437-1439.
Han L, Jiang L, Tan H, Chen L, Hu P & Shi H (2014) An atypical case of IgG4-related sclerosing pancreatitis on PET/CT imaging. *Clinical nuclear medicine* 39(3):e236-238.
Hart CD, Sanna G, Siclari O, Biganzoli L & Di Leo A (2015) Defining optimal duration and predicting benefit from chemotherapy in patients with luminal-like subtypes. *Breast* 24 Suppl 2:S136-142.
Harterich S, Koschatzky S, Einsiedel J & Gmeiner P (2008) Novel insights into GPCR-peptide interactions: mutations in extracellular loop 1, ligand backbone methylations and molecular modeling of neurotensin receptor 1. *Bioorganic & medicinal chemistry* 16(20):9359-9368.
Hashimoto K, Kyoda Y, Tanaka T, Maeda T, Kobayashi K, Uchida K, Kitamura H, Hirata K, Tsukamoto T & Masumori N (2015) The potential of neurotensin secreted from neuroendocrine tumor cells to promote gelsolin-mediated invasiveness of prostate

adenocarcinoma cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 95(3):283-295.
Hellstrom PM, Nylander G & Rosell S (1982) Effects of neurotensin on the transit of gastrointestinal contents in the rat. *Acta physiologica Scandinavica* 115(2):239-243.
Helmstaedter V, Taugner C, Feurle GE & Forssmann WG (1977) Localization of neurotensin-immunoreactive cells in the small intestine of man and various mammals. *Histochemistry* 53(1):35-41.
Herholz K & Heiss WD (2004) Positron emission tomography in clinical neurology. *Molecular Imaging & Biology* 6(4):239-269.
Hermanson GT (1996) 2 - The Chemistry of Reactive Groups. *Bioconjugate Techniques,* Academic Press, San Diegohttps://doi.org/10.1016/B978-012342335-1/50003-8. p 137-166.
Herzig MC, Chapman WG, Sheridan A, Rake JB & Woynarowski JM (1999) Neurotensin receptor-mediated inhibition of pancreatic cancer cell growth by the neurotensin antagonist SR 48692. *Anticancer research* 19(1A):213-219.
Heyl DL, Sefler AM, He JX, Sawyer TK, Wustrow DJ, Akunne HC, Davis MD, Pugsley TA, Heffner TG, Corbin AE & et al. (1994) Structure-activity and conformational studies of a series of modified C-terminal hexapeptide neurotensin analogues. *International journal of peptide and protein research* 44(3):233-238.
Hicks RJ, Binns D & Stabin MG (2001) Pattern of uptake and excretion of (18)F-FDG in the lactating breast. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 42(8):1238-1242.
Hillairet De Boisferon M, Raguin O, Thiercelin C, Dussaillant M, Rostene W, Barbet J, Pelegrin A & Gruaz-Guyon A (2002) Improved tumor selectivity of radiolabeled peptides by receptor and antigen dual targeting in the neurotensin receptor model. *Bioconjugate chemistry* 13(3):654-662.
Hoffman R (1999) Orthotopic Metastatic Mouse Models for Anticancer Drug Discovery and Evaluation: a Bridge to the Clinic. *Invest New Drugs* 17(4):343-360.
Holzapfel K, Reiser-Erkan C, Fingerle AA, Erkan M, Eiber MJ, Rummeny EJ, Friess H, Kleeff J & Gaa J (2011) Comparison of diffusion-weighted MR imaging and multidetector-row CT in the detection of liver metastases in patients operated for pancreatic cancer. *Abdominal imaging* 36(2):179-184.
Hruban RH, Goggins M, Parsons J & Kern SE (2000) Progression Model for Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research* 6(8):2969-2972.
Huguet F, Girard N, Guerche CS, Hennequin C, Mornex F & Azria D (2009) Chemoradiotherapy in the management of locally advanced pancreatic carcinoma: a qualitative systematic review. *J Clin Oncol* 27(13):2269-2277.
Humbert O, Berriolo-Riedinger A, Cochet A, Gauthier M, Charon-Barra C, Guiu S, Desmoulins I, Toubeau M, Dygai-Cochet I, Coutant C, Fumoleau P & Brunotte F (2014) Prognostic relevance at 5 years of the early monitoring of neoadjuvant chemotherapy using (18)F-FDG PET in luminal HER2-negative breast cancer. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 41(3):416-427.
Ido T, Wan CN, Fowler JS & Wolf AP (1977) Fluorination with molecular fluorine. A convenient synthesis of 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *The Journal of Organic Chemistry* 42(13):2341-2342.
Imai H, Doi R, Kanazawa H, Kamo N, Koizumi M, Masui T, Iwanaga Y, Kawaguchi Y, Takada Y, Isoda H & Uemoto S (2010) Preoperative assessment of para-aortic lymph node metastasis in patients with pancreatic cancer. *International journal of clinical oncology* 15(3):294-300.
Imdahl A, Nitzsche E, Krautmann F, Hogerle S, Boos S, Einert A, Sontheimer J & Farthmann EH (1999) Evaluation of positron emission tomography with 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose for the differentiation of chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *The British journal of surgery* 86(2):194-199.
Ito M, Shien T, Kaji M, Mizoo T, Iwamoto T, Nogami T, Motoki T, Taira N, Doihara H & Miyoshi

S (2015) Correlation between 18F-fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography/computed Tomography and Clinicopathological Features in Invasive Ductal Carcinoma of the Breast. *Acta medica Okayama* 69(6):333-338.

Iwase K, Evers BM, Hellmich MR, Kim HJ, Higashide S, Gully D, Thompson JC & Townsend CM, Jr. (1997) Inhibition of neurotensin-induced pancreatic carcinoma growth by a nonpeptide neurotensin receptor antagonist, SR48692. *Cancer* 79(9):1787-1793.

Janssen PJ, de Visser M, Verwijnen SM, Bernard BF, Srinivasan A, Erion JL, Breeman WA, Vulto AG, Krenning EP & de Jong M (2007) Five Stabilized 111In-labeled neurotensin analogs in nude mice bearing HT29 tumors. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 22(3):374-381.

Jensen RT, Battey JF, Spindel ER & Benya RV (2008) International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacological reviews* 60(1):1-42.

Jensen RT & Moody TW (2013) Chapter 161 - Bombesin-Related Peptides A2 - Kastin, Abba J. *Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition),* Academic Press, Bostonhttps://doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00161-5. p 1188-1196.

Jones HA, Clark RJ, Rhodes CG, Schofield JB, Krausz T & Haslett C (1994) In vivo measurement of neutrophil activity in experimental lung inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 149(6):1635-1639.

Kato K, Nihashi T, Ikeda M, Abe S, Iwano S, Itoh S, Shimamoto K & Naganawa S (2013) Limited efficacy of (18)F-FDG PET/CT for differentiation between metastasis-free pancreatic cancer and mass-forming pancreatitis. *Clinical nuclear medicine* 38(6):417-421.

Khosravi Shahi P & Diaz Munoz de la Espada VM (2005) [Pancreatic adenocarcinoma: therapeutical update]. *An Med Interna* 22(8):390-394.

Kitabgi P (2002) Targeting neurotensin receptors with agonists and antagonists for therapeutic purposes. *Current opinion in drug discovery & development* 5(5):764-776.

Kitabgi P (2006a) Functional domains of the subtype 1 neurotensin receptor (NTS1). *Peptides* 27(10):2461-2468.

Kitabgi P (2006b) Functional domains of the subtype 1 neurotensin receptor (NTS1). *Peptides* 27(10):2461-2468.

Kitabgi P (2006c) Inactivation of neurotensin and neuromedin N by Zn metallopeptidases. *Peptides* 27(10):2515-2522.

Kitabgi P, Carraway R & Leeman SE (1976) Isolation of a tridecapeptide from bovine intestinal tissue and its partial characterization as neurotensin. *The Journal of biological chemistry* 251(22):7053-7058.

Kitabgi P, Carraway R, Van Rietschoten J, Granier C, Morgat JL, Menez A, Leeman S & Freychet P (1977) Neurotensin: specific binding to synaptic membranes from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(5):1846-1850.

Kitabgi P, Checler F, Mazella J & Vincent JP (1985) Pharmacology and biochemistry of neurotensin receptors. *Reviews in clinical & basic pharmacology* 5(3-4):397-486.

Kitabgi P, Poustis C, Granier C, Van Rietschoten J, Rivier J, Morgat JL & Freychet P (1980) Neurotensin binding to extraneural and neural receptors: comparison with biological activity and structure--activity relationships. *Molecular pharmacology* 18(1):11-19.

Kleeff J, Reiser C, Hinz U, Bachmann J, Debus J, Jaeger D, Friess H & Buchler MW (2007) Surgery for recurrent pancreatic ductal adenocarcinoma. *Annals of surgery* 245(4):566-572.

Koop B, Reske Sven N & Neumaier B (2007) Labelling of a monoclonal antibody with 68Ga using three DTPA-based bifunctional ligands and their in vitro evaluation for application in radioimmunotherapy. in *Radiochimica Acta*), p 39.

Korner M, Waser B, Strobel O, Buchler M & Reubi JC (2015) Neurotensin receptors in pancreatic ductal carcinomas. *EJNMMI research* 5:17.

Koumarianou E, Mikolajczak R, Pawlak D, Zikos X, Bouziotis P, Garnuszek P, Karczmarczyk U, Maurin M & Archimandritis SC (2009) Comparative study on DOTA-derivatized bombesin

analog labeled with 90Y and 177Lu: in vitro and in vivo evaluation. *Nuclear medicine and biology* 36(6):591-603.

Kristensen CA, Hamberg LM, Hunter GJ, Roberge S, Kierstead D, Wolf GL & Jain RK (1999) Changes in Vascularization of Human Breast Cancer Xenografts Responding to Antiestrogen Therapy. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 1(6):518-525.

Kubota R, Yamada S, Kubota K, Ishiwata K, Tamahashi N & Ido T (1992) Intratumoral distribution of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in vivo: high accumulation in macrophages and granulation tissues studied by microautoradiography. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 33(11):1972-1980.

Kuhl DE & Edwards RQ (1963) Image Separation Radioisotope Scanning. *Radiology* 80(4):653-662.

Kumar R, Chauhan A, Zhuang H, Chandra P, Schnall M & Alavi A (2006) Clinicopathologic factors associated with false negative FDG-PET in primary breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 98(3):267-274.

Kumar R, Halanaik D & Malhotra A (2010) Clinical applications of positron emission tomography-computed tomography in oncology. *Indian journal of cancer* 47(2):100-119.

Kurland BF, Gadi VK, Specht JM, Allison KH, Livingston RB, Rodler ET, Peterson LM, Schubert EK, Chai X, Mankoff DA & Linden HM (2012) Feasibility study of FDG PET as an indicator of early response to aromatase inhibitors and trastuzumab in a heterogeneous group of breast cancer patients. *EJNMMI research* 2(1):34.

Labbe-Jullie C, Barroso S, Nicolas-Eteve D, Reversat JL, Botto JM, Mazella J, Bernassau JM & Kitabgi P (1998) Mutagenesis and modeling of the neurotensin receptor NTR1. Identification of residues that are critical for binding SR 48692, a nonpeptide neurotensin antagonist. *The Journal of biological chemistry* 273(26):16351-16357.

Labbe-Jullie C, Botto JM, Mas MV, Chabry J, Mazella J, Vincent JP, Gully D, Maffrand JP & Kitabgi P (1995) [3H]SR 48692, the first nonpeptide neurotensin antagonist radioligand: characterization of binding properties and evidence for distinct agonist and antagonist binding domains on the rat neurotensin receptor. *Molecular pharmacology* 47(5):1050-1056.

Lang C, Maschauer S, Hubner H, Gmeiner P & Prante O (2013) Synthesis and evaluation of a (18)F-labeled diarylpyrazole glycoconjugate for the imaging of NTS1-positive tumors. *Journal of medicinal chemistry* 56(22):9361-9365.

Lantry LE, Cappelletti E, Maddalena ME, Fox JS, Feng W, Chen J, Thomas R, Eaton SM, Bogdan NJ, Arunachalam T, Reubi JC, Raju N, Metcalfe EC, Lattuada L, Linder KE, Swenson RE, Tweedle MF & Nunn AD (2006) 177Lu-AMBA: Synthesis and characterization of a selective 177Lu-labeled GRP-R agonist for systemic radiotherapy of prostate cancer. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 47(7):1144-1152.

Laukkanen MO, Gutkind JS & Castellone MD (2015) Sonic Hedgehog in SCLC. *Aging (Albany NY)* 7(9):605-606.

Law IK, Murphy JE, Bakirtzi K, Bunnett NW & Pothoulakis C (2012) Neurotensin-induced proinflammatory signaling in human colonocytes is regulated by beta-arrestins and endothelin-converting enzyme-1-dependent endocytosis and resensitization of neurotensin receptor 1. *The Journal of biological chemistry* 287(18):15066-15075.

Lee KH, Ko BH, Paik JY, Jung KH, Choe YS, Choi Y & Kim BT (2005) Effects of anesthetic agents and fasting duration on 18F-FDG biodistribution and insulin levels in tumor-bearing mice. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 46(9):1531-1536.

Lefrancois S, Zeng J, Hassan AJ, Canuel M & Morales CR (2003) The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *The EMBO journal* 22(24):6430-6437.

Lennon AM, Wolfgang CL, Canto MI, Klein AP, Herman JM, Goggins M, Fishman EK, Kamel I, Weiss MJ, Diaz LA, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B & Hruban RH (2014) The

Early Detection of Pancreatic Cancer: What Will it Take to Diagnose and Treat Curable Pancreatic Neoplasia? *Cancer research* 74(13):3381-3389.

Lerch MM & Gorelick FS (2013) Models of Acute and Chronic Pancreatitis. *Gastroenterology* 144(6):1180-1193.

Li S & Tian B (2017) Acute pancreatitis in patients with pancreatic cancer: Timing of surgery and survival duration. *Medicine* 96(3):e5908.

Li X, Lv Y, Yuan A, Yi S, Ma Y & Li Z (2010) Gastrin-releasing peptide promotes the growth of HepG2 cells via EGFR-independent ERK1/2 activation. *Oncology reports* 24(2):441-448.

Lin KM, Hsu CH, Chang WS, Chen CT, Lee TW & Chen CT (2008) Human breast tumor cells express multimodal imaging reporter genes. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging* 10(5):253-263.

Lin NU, Guo H, Yap JT, Mayer IA, Falkson CI, Hobday TJ, Dees EC, Richardson AL, Nanda R, Rimawi MF, Ryabin N, Najita JS, Barry WT, Arteaga CL, Wolff AC, Krop IE, Winer EP & Van den Abbeele AD (2015) Phase II Study of Lapatinib in Combination With Trastuzumab in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastatic Breast Cancer: Clinical Outcomes and Predictive Value of Early [18F]Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Imaging (TBCRC 003). *J Clin Oncol* 33(24):2623-2631.

Linder KE, Metcalfe E, Arunachalam T, Chen J, Eaton SM, Feng W, Fan H, Raju N, Cagnolini A, Lantry LE, Nunn AD & Swenson RE (2009) In vitro and in vivo metabolism of Lu-AMBA, a GRP-receptor binding compound, and the synthesis and characterization of its metabolites. *Bioconjugate chemistry* 20(6):1171-1178.

Liu C-Y, Wu C-Y, Petrossian K, Huang T-T, Tseng L-M & Chen S (2017) Treatment for the endocrine resistant breast cancer: Current options and future perspectives. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 172(Supplement C):166-175.

Liu S (2008) Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Adv Drug Deliv Rev* 60(12):1347-1370.

Liu Y (2014) Role of FDG PET-CT in evaluation of locoregional nodal disease for initial staging of breast cancer. *World journal of clinical oncology* 5(5):982-989.

Liu Z, Yan Y, Liu S, Wang F & Chen X (2009) (18)F, (64)Cu, and (68)Ga labeled RGD-bombesin heterodimeric peptides for PET imaging of breast cancer. *Bioconjugate chemistry* 20(5):1016-1025.

Lumachi F, Brunello A, Maruzzo M, Basso U & Basso SM (2013) Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *Current medicinal chemistry* 20(5):596-604.

Maddalena ME, Fox J, Chen J, Feng W, Cagnolini A, Linder KE, Tweedle MF, Nunn AD & Lantry LE (2009) 177Lu-AMBA biodistribution, radiotherapeutic efficacy, imaging, and autoradiography in prostate cancer models with low GRP-R expression. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 50(12):2017-2024.

Maecke HR, Hofmann, M., and Haberkorn, U (2005) (68)Ga-labeled peptides in tumor imaging. *J. Nucl. Med. 46 Suppl* 1:172S-178S.

Maes V, Garcia-Garayoa E, Blauenstein P & Tourwe D (2006) Novel 99mTc-labeled neurotensin analogues with optimized biodistribution properties. *Journal of medicinal chemistry* 49(5):1833-1836.

Maina T, Bergsma H, Kulkarni HR, Mueller D, Charalambidis D, Krenning EP, Nock BA, de Jong M & Baum RP (2016) Preclinical and first clinical experience with the gastrin-releasing peptide receptor-antagonist [(6)(8)Ga]SB3 and PET/CT. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 43(5):964-973.

Maina T, Nikolopoulou A, Stathopoulou E, Galanis AS, Cordopatis P & Nock BA (2007) [99mTc]Demotensin 5 and 6 in the NTS1-R-targeted imaging of tumours: synthesis and preclinical results. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 34(11):1804-1814.

Maina T, Nock B, Nikolopoulou A, Sotiriou P, Loudos G, Maintas D, Cordopatis P & Chiotellis E (2002) [99mTc]Demotate, a new 99mTc-based [Tyr3]octreotate analogue for the detection

of somatostatin receptor-positive tumours: synthesis and preclinical results. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 29(6):742-753.

Mankoff DA, Link JM, Linden HM, Sundararajan L & Krohn KA (2008) Tumor receptor imaging. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 49 Suppl 2:149S-163S.

Mansi R, Wang X, Forrer F, Kneifel S, Tamma ML, Waser B, Cescato R, Reubi JC & Maecke HR (2009) Evaluation of a 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid-conjugated bombesin-based radioantagonist for the labeling with single-photon emission computed tomography, positron emission tomography, and therapeutic radionuclides. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15(16):5240-5249.

Mansi R, Wang X, Forrer F, Waser B, Cescato R, Graham K, Borkowski S, Reubi JC & Maecke HR (2011) Development of a potent DOTA-conjugated bombesin antagonist for targeting GRPr-positive tumours. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 38(1):97-107.

Maoret JJ, Anini Y, Rouyer-Fessard C, Gully D & Laburthe M (1999) Neurotensin and a non-peptide neurotensin receptor antagonist control human colon cancer cell growth in cell culture and in cells xenografted into nude mice. *International journal of cancer* 80(3):448-454.

Mark Evers B (2006) Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues. *Peptides* 27(10):2424-2433.

Markwalder R & Reubi JC (1999) Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. *Cancer research* 59(5):1152-1159.

Martin S, Navarro V, Vincent JP & Mazella J (2002) Neurotensin receptor-1 and -3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. *Gastroenterology* 123(4):1135-1143.

Maschauer S, Einsiedel J, Hocke C, Hübner H, Kuwert T, Gmeiner P & Prante O (2010) Synthesis of a (68)Ga-Labeled Peptoid–Peptide Hybrid for Imaging of Neurotensin Receptor Expression in Vivo. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 1(5):224-228.

Massa F, Devader C, Beraud-Dufour S, Brau F, Coppola T & Mazella J (2013) Focal adhesion kinase dependent activation of the PI3 kinase pathway by the functional soluble form of neurotensin receptor-3 in HT29 cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45(5):952-959.

Massa F, Tormo A, Beraud-Dufour S, Coppola T & Mazella J (2011) Neurotensin-induced Erk1/2 phosphorylation and growth of human colonic cancer cells are independent from growth factors receptors activation. *Biochemical and biophysical research communications* 414(1):118-122.

Mather SJ, Nock BA, Maina T, Gibson V, Ellison D, Murray I, Sobnack R, Colebrook S, Wan S, Halberrt G, Szysko T, Powles T & Avril N (2014) GRP receptor imaging of prostate cancer using [(99m)Tc]Demobesin 4: a first-in-man study. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging* 16(6):888-895.

Maynard J, Ricketts SA, Gendrin C, Dudley P & Davies BR (2013) 2-Deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose positron emission tomography demonstrates target inhibition with the potential to predict anti-tumour activity following treatment with the AKT inhibitor AZD5363. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging* 15(4):476-485.

Mazella J, Béraud-Dufour S, Devader C, Massa F & Coppola T (2012) Neurotensin and its receptors in the control of glucose homeostasis. *Frontiers in Endocrinology* 3:143.

Mazella J, Botto JM, Guillemare E, Coppola T, Sarret P & Vincent JP (1996) Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J Neurosci* 16(18):5613-5620.

McDonald TJ, Jornvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR & Mutt V (1979)

Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochemical and biophysical research communications* 90(1):227-233.
Melis M, Krenning EP, Bernard BF, Barone R, Visser TJ & de Jong M (2005) Localisation and mechanism of renal retention of radiolabelled somatostatin analogues. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 32(10):1136-1143.
Melis M, Krenning EP, Bernard BF, de Visser M, Rolleman E & de Jong M (2007) Renal uptake and retention of radiolabeled somatostatin, bombesin, neurotensin, minigastrin and CCK analogues: species and gender differences. *Nuclear medicine and biology* 34(6):633-641.
Meyer GJ, Macke H, Schuhmacher J, Knapp WH & Hofmann M (2004) 68Ga-labelled DOTA-derivatised peptide ligands. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 31(8):1097-1104.
Mier W, Zitzmann S, Kramer S, Reed J, Knapp EM, Altmann A, Eisenhut M & Haberkorn U (2007) Influence of chelate conjugation on a newly identified tumor-targeting peptide. *J Nucl Med* 48(9):1545-1552.
Mijatovic T, Gailly P, Mathieu V, De Neve N, Yeaton P, Kiss R & Decaestecker C (2007) Neurotensin is a versatile modulator of in vitro human pancreatic ductal adenocarcinoma cell (PDAC) migration. *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology* 29(4):315-326.
Minamino N, Kangawa K & Matsuo H (1983) Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochemical and biophysical research communications* 114(2):541-548.
Moestrup SK, Cui S, Vorum H, Bregengard C, Bjorn SE, Norris K, Gliemann J & Christensen EI (1995) Evidence that epithelial glycoprotein 330/megalin mediates uptake of polybasic drugs. *J Clin Invest* 96(3):1404-1413.
Mogensen CE & Solling (1977) Studies on renal tubular protein reabsorption: partial and near complete inhibition by certain amino acids. *Scand J Clin Lab Invest* 37(6):477-486.
Mojtahedi A, Thamake S, Tworowska I, Ranganathan D & Delpassand ES (2014) The value of (68)Ga-DOTATATE PET/CT in diagnosis and management of neuroendocrine tumors compared to current FDA approved imaging modalities: a review of literature. *American journal of nuclear medicine and molecular imaging* 4(5):426-434.
Moody TW, Chan D, Fahrenkrug J & Jensen RT (2003) Neuropeptides as autocrine growth factors in cancer cells. *Current pharmaceutical design* 9(6):495-509.
Moody TW, Chiles J, Casibang M, Moody E, Chan D & Davis TP (2001) SR48692 is a neurotensin receptor antagonist which inhibits the growth of small cell lung cancer cells. *Peptides* 22(1):109-115.
Moody TW, Moreno P & Jensen RT (2015) Neuropeptides as lung cancer growth factors. *Peptides* 72:106-111.
Moody TW, Nuche-Berenguer B, Nakamura T & Jensen RT (2016) EGFR Transactivation by Peptide G Protein-Coupled Receptors in Cancer. *Current drug targets* 17(5):520-528.
Morgat C, MacGrogan G, Brouste V, Velasco V, Sevenet N, Bonnefoi H, Fernandez P, Debled M & Hindie E (2017) Expression of Gastrin-Releasing Peptide Receptor in Breast Cancer and Its Association with Pathologic, Biologic, and Clinical Parameters: A Study of 1,432 Primary Tumors. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 58(9):1401-1407.
Morgat C, Mishra AK, Varshney R, Allard M, Fernandez P & Hindie E (2014) Targeting neuropeptide receptors for cancer imaging and therapy: perspectives with bombesin, neurotensin, and neuropeptide-Y receptors. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 55(10):1650-1657.
Mortimer JE, Dehdashti F, Siegel BA, Trinkaus K, Katzenellenbogen JA & Welch MJ (2001) Metabolic flare: indicator of hormone responsiveness in advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 19(11):2797-2803.
Mosskin M, von Holst H, Ericson K & Noren G (1986) The blood tumour barrier in intracranial

tumours studied with X-ray computed tomography and positron emission tomography using 68-Ga-EDTA. *Neuroradiology* 28(3):259-263.

Mueller D, Klette I, Baum RP, Gottschaldt M, Schultz MK & Breeman WA (2012) Simplified NaCl based (68)Ga concentration and labeling procedure for rapid synthesis of (68)Ga radiopharmaceuticals in high radiochemical purity. *Bioconjugate chemistry* 23(8):1712-1717.

Myers RM, Shearman JW, Kitching MO, Ramos-Montoya A, Neal DE & Ley SV (2009) Cancer, chemistry, and the cell: molecules that interact with the neurotensin receptors. *ACS chemical biology* 4(7):503-525.

Na Y, Choi J-W, Kasala D, Hong J, Oh E, Li Y, Jung S-J, Kim SW & Yun C-O (2015) Potent antitumor effect of neurotensin receptor-targeted oncolytic adenovirus co-expressing decorin and Wnt antagonist in an orthotopic pancreatic tumor model. *Journal of Controlled Release* 220(Part B):766-782.

Nagalla SR, Barry BJ, Creswick KC, Eden P, Taylor JT & Spindel ER (1995) Cloning of a receptor for amphibian [Phe13]bombesin distinct from the receptor for gastrin-releasing peptide: identification of a fourth bombesin receptor subtype (BB4). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(13):6205-6209.

Nagasaki S, Nakamura Y, Maekawa T, Akahira J, Miki Y, Suzuki T, Ishidoya S, Arai Y & Sasano H (2012) Immunohistochemical analysis of gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) and possible regulation by estrogen receptor betacx in human prostate carcinoma. *Neoplasma* 59(2):224-232.

Nalin L, Selvaraju RK, Velikyan I, Berglund M, Andreasson S, Wikstrand A, Ryden A, Lubberink M, Kandeel F, Nyman G, Korsgren O, Eriksson O & Jensen-Waern M (2014) Positron emission tomography imaging of the glucagon-like peptide-1 receptor in healthy and streptozotocin-induced diabetic pigs. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 41(9):1800-1810.

Nanabala R, Anees MK, Sasikumar A, Joy A & Pillai MRA (2016) Preparation of [68Ga]PSMA-11 for PET–CT imaging using a manual synthesis module and organic matrix based 68Ge/68Ga generator. *Nuclear medicine and biology* 43(8):463-469.

Nicolas GP, Beykan S, Bouterfa H, Kaufmann J, Bauman A, Lassmann M, Reubi JC, Rivier JEF, Maecke HR, Fani M & Wild D (2017) Safety, Biodistribution, and Radiation Dosimetry of 68Ga-OPS202 (68Ga-NODAGA-JR11) in Patients with Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors: A Prospective Phase I Imaging Study. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 10.2967/jnumed.117.199737.

Nielsen MS, Jacobsen C, Olivecrona G, Gliemann J & Petersen CM (1999) Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase. *The Journal of biological chemistry* 274(13):8832-8836.

Nock BA, Kaloudi A, Lymperis E, Giarika A, Kulkarni HR, Klette I, Singh A, Krenning EP, de Jong M, Maina T & Baum RP (2017) Theranostic Perspectives in Prostate Cancer with the Gastrin-Releasing Peptide Receptor Antagonist NeoBOMB1: Preclinical and First Clinical Results. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 58(1):75-80.

Nock BA, Nikolopoulou A, Reubi JC, Maes V, Conrath P, Tourwe D & Maina T (2006) Toward stable N4-modified neurotensins for NTS1-receptor-targeted tumor imaging with 99mTc. *Journal of medicinal chemistry* 49(15):4767-4776.

Ocejo-Garcia M, Ahmed SI, Coulson JM & Woll PJ (2001) Use of RT-PCR to detect co-expression of neuropeptides and their receptors in lung cancer. *Lung cancer* 33(1):1-9.

Onthank DC, Liu S, Silva PJ, Barrett JA, Harris TD, Robinson SP & Edwards DS (2004) 90Y and 111In complexes of a DOTA-conjugated integrin alpha v beta 3 receptor antagonist: different but biologically equivalent. *Bioconjugate chemistry* 15(2):235-241.

Pakzad F, Groves AM & Ell PJ (2006) The role of positron emission tomography in the management of pancreatic cancer. *Seminars in nuclear medicine* 36(3):248-256.

Pan D, Xu YP, Yang RH, Wang L, Chen F, Luo S, Yang M & Yan Y (2014) A new (68)Ga-labeled

BBN peptide with a hydrophilic linker for GRPR-targeted tumor imaging. *Amino Acids* 46(6):1481-1489.

Pan JA & Salerno M (2016) Clinical Utility and Future Applications of PET/CT and PET/CMR in Cardiology. *Diagnostics* 6(3):32.

Pang YP, Cusack B, Groshan K & Richelson E (1996) Proposed ligand binding site of the transmembrane receptor for neurotensin(8-13). *The Journal of biological chemistry* 271(25):15060-15068.

Pannal P (1997) cancer and clinical biochemistry *1ère edition ACB London 1997*.

Paquette M, Ouellet R, Archambault M, Croteau E, Lecomte R & Benard F (2012a) [18F]-fluoroestradiol quantitative PET imaging to differentiate ER+ and ERalpha-knockdown breast tumors in mice. *Nuclear medicine and biology* 39(1):57-64.

Paquette M, Tremblay S, Benard F & Lecomte R (2012b) Quantitative hormone therapy follow-up in an ER+/ERalphaKD mouse tumor model using FDG and [11C]-methionine PET imaging. *EJNMMI research* 2(1):61.

Parry JJ, Andrews R & Rogers BE (2007) MicroPET imaging of breast cancer using radiolabeled bombesin analogs targeting the gastrin-releasing peptide receptor. *Breast cancer research and treatment* 101(2):175-183.

Parsons CM, Sutcliffe JL & Bold RJ (2008) Preoperative evaluation of pancreatic adenocarcinoma. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery* 15(4):429-435.

Pelaprat D (2006) Interactions between neurotensin receptors and G proteins. *Peptides* 27(10):2476-2487.

Phelps ME, Hoffman EJ, Mullani NA & Ter-Pogossian MM (1975) Application of annihilation coincidence detection to transaxial reconstruction tomography. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 16(3):210-224.

Phelps ME, Huang SC, Hoffman EJ, Selin C, Sokoloff L & Kuhl DE (1979) Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: validation of method. *Annals of neurology* 6(5):371-388.

Piva R, Ticconi F, Ceriani V, Scalorbi F, Fiz F, Capitanio S, Bauckneht M, Cittadini G, Sambuceti G & Morbelli S (2017) Comparative diagnostic accuracy of 18F-FDG PET/CT for breast cancer recurrence. *Breast cancer (Dove Medical Press)* 9:461-471.

Polak JM, Sullivan SN, Bloom SR, Buchan AMJ, Facer P, Brown MR & Pearse AGE (1977) Specific localisation of neurotensin to the N cell in human intestine by radioimmunoassay and immunocytochemistry. *Nature* 270(5633):183-184.

Popp E, Schneider A, Vogel P, Teschendorf P & Bottiger BW (2007) Time course of the hypothermic response to continuously administered neurotensin. *Neuropeptides* 41(5):349-354.

Prasanphanich AF, Retzloff L, Lane SR, Nanda PK, Sieckman GL, Rold TL, Ma L, Figueroa SD, Sublett SV, Hoffman TJ & Smith CJ (2009) In vitro and in vivo analysis of [(64)Cu-NO2A-8-Aoc-BBN(7-14)NH(2)]: a site-directed radiopharmaceutical for positron-emission tomography imaging of T-47D human breast cancer tumors. *Nuclear medicine and biology* 36(2):171-181.

Ray Banerjee S, Chen Z, Pullambhatla M, Lisok A, Chen J, Mease RC & Pomper MG (2016) Preclinical Comparative Study of 68Ga-Labeled DOTA, NOTA, and HBED-CC Chelated Radiotracers for Targeting PSMA. *Bioconjugate chemistry* 27(6):1447-1455.

Reile H, Armatis PE & Schally AV (1994) Characterization of high-affinity receptors for bombesin/gastrin releasing peptide on the human prostate cancer cell lines PC-3 and DU-145: internalization of receptor bound 125I-(Tyr4) bombesin by tumor cells. *The Prostate* 25(1):29-38.

Reinecke M (1985) Neurotensin. Immunohistochemical localization in central and peripheral nervous system and in endocrine cells and its functional role as neurotransmitter and endocrine hormone. *Progress in histochemistry and cytochemistry* 16(1):1-172.

Reivich M, Kuhl D, Wolf A, Greenberg J, Phelps M, Ido T, Casella V, Fowler J, Gallagher B,

Hoffman E, Alavi A & Sokoloff L (1977) Measurement of local cerebral glucose metabolism in man with 18F-2-fluoro-2-deoxy-d-glucose. *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum* 64:190-191.

Reubi C, Gugger M & Waser B (2002a) Co-expressed peptide receptors in breast cancer as a molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 29(7):855-862.

Reubi JC (2003) Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev* 24(4):389-427.

Reubi JC, Waser B, Friess H, Buchler M & Laissue J (1998) Neurotensin receptors: a new marker for human ductal pancreatic adenocarcinoma. *Gut* 42(4):546-550.

Reubi JC, Waser B, Schaer JC & Laissue JA (1999) Neurotensin receptors in human neoplasms: high incidence in Ewing's sarcomas. *International journal of cancer* 82(2):213-218.

Reubi JC, Waser B, Schaer JC & Laissue JA (2001) Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *European journal of nuclear medicine* 28(7):836-846.

Reubi JC, Wenger S, Schmuckli-Maurer J, Schaer JC & Gugger M (2002b) 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). *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 8(4):1139-1146.

Richter S, Wuest M, Bergman CN, Krieger S, Rogers BE & Wuest F (2016) Metabolically Stabilized (68)Ga-NOTA-Bombesin for PET Imaging of Prostate Cancer and Influence of Protease Inhibitor Phosphoramidon. *Molecular pharmaceutics* 13(4):1347-1357.

Rizzieri D (2016) Zevalin® (ibritumomab tiuxetan): After more than a decade of treatment experience, what have we learned? *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 105(Supplement C):5-17.

Rösch F (2013) Past, present and future of 68Ge/68Ga generators. *Applied Radiation and Isotopes* 76(Supplement C):24-30.

Roselli S, Pundavela J, Demont Y, Faulkner S, Keene S, Attia J, Jiang CC, Zhang XD, Walker MM & Hondermarck H (2015) Sortilin is associated with breast cancer aggressiveness and contributes to tumor cell adhesion and invasion. *Oncotarget* 6(12):10473-10486.

Rostene WH & Alexander MJ (1997) Neurotensin and neuroendocrine regulation. *Frontiers in neuroendocrinology* 18(2):115-173.

Saada S, Marget P, Fauchais AL, Lise MC, Chemin G, Sindou P, Martel C, Delpy L, Vidal E, Jaccard A, Troutaud D, Lalloue F & Jauberteau MO (2012) Differential expression of neurotensin and specific receptors, NTSR1 and NTSR2, in normal and malignant human B lymphocytes. *Journal of immunology* 189(11):5293-5303.

Sandrasegaran K, Nutakki K, Tahir B, Dhanabal A, Tann M & Cote GA (2013) Use of Diffusion-Weighted MRI to Differentiate Chronic Pancreatitis From Pancreatic Cancer. *American Journal of Roentgenology* 201(5):1002-1008.

Santhosh S, Bhattacharya A, Harisankar CN, Kochhar R & Mittal BR (2013a) Role of 18F-FDG PET/CT in the management of a case of autoimmune pancreatitis with extrapancreatic manifestations. *Clinical nuclear medicine* 38(11):e423-425.

Santhosh S, Mittal BR, Bhasin D, Srinivasan R, Rana S, Das A, Nada R, Bhattacharya A, Gupta R & Kapoor R (2013b) Role of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography in the characterization of pancreatic masses: Experience from tropics. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 28(2):255-261.

Santhosh S, Mittal BR, Bhasin D, Srinivasan R, Rana S, Das A, Nada R, Bhattacharya A, Gupta R & Kapoor R (2013c) Role of (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography in the characterization of pancreatic masses: experience from tropics. *Journal of gastroenterology and hepatology* 28(2):255-261.

Schottelius M, Rau F, Reubi JC, Schwaiger M & Wester HJ (2005) Modulation of pharmacokinetics of radioiodinated sugar-conjugated somatostatin analogues by variation of

peptide net charge and carbohydration chemistry. *Bioconjugate chemistry* 16(2):429-437.
Schottelius M & Wester HJ (2009) Molecular imaging targeting peptide receptors. *Methods* 48(2):161-177.
Schottelius M, Wester HJ, Reubi JC, Senekowitsch-Schmidtke R & Schwaiger M (2002) Improvement of pharmacokinetics of radioiodinated Tyr(3)-octreotide by conjugation with carbohydrates. *Bioconjugate chemistry* 13(5):1021-1030.
Schreiter NF, Brenner W, Nogami M, Buchert R, Huppertz A, Pape UF, Prasad V, Hamm B & Maurer MH (2012) Cost comparison of 111In-DTPA-octreotide scintigraphy and 68Ga-DOTATOC PET/CT for staging enteropancreatic neuroendocrine tumours. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 39(1):72-82.
Schroeder RP, van Weerden WM, Krenning EP, Bangma CH, Berndsen S, Grievink-de Ligt CH, Groen HC, Reneman S, de Blois E, Breeman WA & de Jong M (2011) Gastrin-releasing peptide receptor-based targeting using bombesin analogues is superior to metabolism-based targeting using choline for in vivo imaging of human prostate cancer xenografts. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 38(7):1257-1266.
Schroeder RPJ, Weerden WMv, Bangma C, Krenning EP & Jong Md (2009) Peptide receptor imaging of prostate cancer with radiolabelled bombesin analogues. *Methods* 48(2):200-204.
Schulz J, Rohracker M, Stiebler M, Goldschmidt J, Grosser OS, Osterkamp F, Pethe A, Reineke U, Smerling C & Amthauer H (2016) Comparative Evaluation of the Biodistribution Profiles of a Series of Nonpeptidic Neurotensin Receptor-1 Antagonists Reveals a Promising Candidate for Theranostic Applications. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 57(7):1120-1123.
Schulz J, Rohracker M, Stiebler M, Goldschmidt J, Stober F, Noriega M, Pethe A, Lukas M, Osterkamp F, Reineke U, Hohne A, Smerling C & Amthauer H (2017) Proof of Therapeutic Efficacy of a 177Lu-Labeled Neurotensin Receptor 1 Antagonist in a Colon Carcinoma Xenograft Model. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 58(6):936-941.
Scopinaro F, De Vincentis G, Corazziari E, Massa R, Osti M, Pallotta N, Covotta A, Remediani S, Paolo MD, Monteleone F & Varvarigou A (2004) Detection of colon cancer with 99mTc-labeled bombesin derivative (99mTc-leu13-BN1). *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 19(2):245-252.
Scopinaro F, De Vincentis G, Varvarigou AD, Laurenti C, Iori F, Remediani S, Chiarini S & Stella S (2003) 99mTc-bombesin detects prostate cancer and invasion of pelvic lymph nodes. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 30(10):1378-1382.
Scopinaro F, Varvarigou A, Ussof W, De Vincentis G, Archimandritis S, Evangelatos G, Corleto V, Pulcini A, Capoccetti F, Remediani S & Massa R (2002) Breast cancer takes up 99mTc bombesin. A preliminary report. *Tumori* 88(3):S25-28.
Sehgal I, Powers S, Huntley B, Powis G, Pittelkow M & Maihle NJ (1994) Neurotensin is an autocrine trophic factor stimulated by androgen withdrawal in human prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(11):4673-4677.
Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S & Cardoso F (2013) Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 24 Suppl 6:vi7-23.
Shah N, Zhai G, Knowles JA, Stockard CR, Grizzle WE, Fineberg N, Zhou T, Zinn KR, Rosenthal EL & Kim H (2012) (18)F-FDG PET/CT imaging detects therapy efficacy of anti-EMMPRIN antibody and gemcitabine in orthotopic pancreatic tumor xenografts. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging* 14(2):237-244.
Smith TA, Appleyard MV, Sharp S, Fleming IN, Murray K & Thompson AM (2013) Response to trastuzumab by HER2 expressing breast tumour xenografts is accompanied by decreased Hexokinase II, glut1 and [18F]-FDG incorporation and changes in 31P-NMR-detectable

phosphomonoesters. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 71(2):473-480.
Soluri A, Scopinaro F, De Vincentis G, Varvarigou A, Scafe R, Massa R, Schillaci O, Spanu A & David V (2003) 99MTC [13LEU] bombesin and a new gamma camera, the imaging probe, are able to guide mammotome breast biopsy. *Anticancer research* 23(3A):2139-2142.
Somai S, Gompel A, Rostene W & Forgez P (2002) Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 295(2):482-488.
Sonni I, Baratto L & Iagaru A (2017) Imaging of Prostate Cancer Using Gallium-68-Labeled Bombesin. *PET clinics* 12(2):159-171.
Souaze F, Dupouy S, Viardot-Foucault V, Bruyneel E, Attoub S, Gespach C, Gompel A & Forgez P (2006a) Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. *Cancer research* 66(12):6243-6249.
Souaze F & Forgez P (2006b) Molecular and cellular regulation of neurotensin receptor under acute and chronic agonist stimulation. *Peptides* 27(10):2493-2501.
Spang P, Herrmann C & Roesch F (2016) Bifunctional Gallium-68 Chelators: Past, Present, and Future. *Seminars in nuclear medicine* 46(5):373-394.
St-Gelais F, Jomphe C & Trudeau LE (2006) The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence? *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* 31(4):229-245.
Stahlman MT, Kasselberg AG, Orth DN & Gray ME (1985) Ontogeny of neuroendocrine cells in human fetal lung. II. An immunohistochemical study. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 52(1):52-60.
Stoykow C, Erbes T, Maecke HR, Bulla S, Bartholoma M, Mayer S, Drendel V, Bronsert P, Werner M, Gitsch G, Weber WA, Stickeler E & Meyer PT (2016a) Gastrin-releasing Peptide Receptor Imaging in Breast Cancer Using the Receptor Antagonist (68)Ga-RM2 And PET. *Theranostics* 6(10):1641-1650.
Stoykow C, Erbes T, Maecke HR, Bulla S, Bartholomä M, Mayer S, Drendel V, Bronsert P, Werner M, Gitsch G, Weber WA, Stickeler E & Meyer PT (2016b) Gastrin-releasing Peptide Receptor Imaging in Breast Cancer Using the Receptor Antagonist (68)Ga-RM2 And PET. *Theranostics* 6(10):1641-1650.
Strobel K, Heinrich S, Bhure U, Soyka J, Veit-Haibach P, Pestalozzi BC, Clavien PA & Hany TF (2008) Contrast-enhanced 18F-FDG PET/CT: 1-stop-shop imaging for assessing the resectability of pancreatic cancer. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 49(9):1408-1413.
Subik K, Lee J-F, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, Xing L, Hung M-C, Bonfiglio T, Hicks DG & Tang P (2010) The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer : Basic and Clinical Research* 4:35-41.
Sun X, Li Y, Liu T, Li Z, Zhang X & Chen X (2017) Peptide-based imaging agents for cancer detection(). *Advanced drug delivery reviews* 110-111:38-51.
Sun Y, Ma X, Zhang Z, Sun Z, Loft M, Ding B, Liu C, Xu L, Yang M, Jiang Y, Liu J, Xiao Y, Cheng Z & Hong X (2016) Preclinical Study on GRPR-Targeted 68Ga-Probes for PET Imaging of Prostate Cancer. *Bioconjugate chemistry* 27(8):1857-1864.
Sunday ME (1988) Tissue-specific Expression of the Mammalian Bombesin Gene. *Annals of the New York Academy of Sciences* 547(1):95-113.
Sung C, Shockley TR, Morrison PF, Dvorak HF, Yarmush ML & Dedrick RL (1992) Predicted and observed effects of antibody affinity and antigen density on monoclonal antibody uptake in solid tumors. *Cancer Res* 52(2):377-384.
Swift SL, Burns JE & Maitland NJ (2010) Altered expression of neurotensin receptors is associated with the differentiation state of prostate cancer. *Cancer research* 70(1):347-356.
Tanaka K, Masu M & Nakanishi S (1990) Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* 4(6):847-854.
Thomas R, Chen J, Roudier MM, Vessella RL, Lantry LE & Nunn AD (2008) In vitro binding

evaluation of 177Lu-AMBA, a novel 177Lu-labeled GRP-R agonist for systemic radiotherapy in human tissues. *Clinical & experimental metastasis* 26(2):105.

Thomas RP, Hellmich MR, Townsend JCM & Evers BM (2003) Role of Gastrointestinal Hormones in the Proliferation of Normal and Neoplastic Tissues. *Endocrine Reviews* 24(5):571-599.

Thomas SM, Grandis JR, Wentzel AL, Gooding WE, Lui VW & Siegfried JM (2005) Gastrin-releasing peptide receptor mediates activation of the epidermal growth factor receptor in lung cancer cells. *Neoplasia* 7(4):426-431.

Tornesello AL, Buonaguro L, Tornesello ML & Buonaguro FM (2017) New Insights in the Design of Bioactive Peptides and Chelating Agents for Imaging and Therapy in Oncology. *Molecules (Basel, Switzerland)* 22(8).

Trumpp-Kallmeyer S, Chini B, Mouillac B, Barberis C, Hoflack J & Hibert M (1995) Towards understanding the role of the first extracellular loop for the binding of peptide hormones to G-protein coupled receptors. *Pharmaceutica acta Helvetiae* 70(3):255-262.

Turner JT, James-Kracke MR & Camden JM (1990) Regulation of the neurotensin receptor and intracellular calcium mobilization in HT29 cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 253(3):1049-1056.

Uhl GR, Kuhar MJ & Snyder SH (1977) Neurotensin: immunohistochemical localization in rat central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(9):4059-4063.

Van de Wiele C, Dumont F, Vanden Broecke R, Oosterlinck W, Cocquyt V, Serreyn R, Peers S, Thornback J, Slegers G & Dierckx RA (2000) Technetium-99m RP527, a GRP analogue for visualisation of GRP receptor-expressing malignancies: a feasibility study. *European journal of nuclear medicine* 27(11):1694-1699.

Van de Wiele C, Phonteyne P, Pauwels P, Goethals I, Van den Broecke R, Cocquyt V & Dierckx RA (2008) Gastrin-releasing peptide receptor imaging in human breast carcinoma versus immunohistochemistry. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 49(2):260-264.

van Kouwen MC, Jansen JB, van Goor H, de Castro S, Oyen WJ & Drenth JP (2005) FDG-PET is able to detect pancreatic carcinoma in chronic pancreatitis. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 32(4):399-404.

van Kruchten M, de Vries EG, Brown M, de Vries EF, Glaudemans AW, Dierckx RA, Schroder CP & Hospers GA (2013) PET imaging of oestrogen receptors in patients with breast cancer. *The Lancet. Oncology* 14(11):e465-475.

Vandenbulcke F, Nouel D, Vincent JP, Mazella J & Beaudet A (2000) Ligand-induced internalization of neurotensin in transfected COS-7 cells: differential intracellular trafficking of ligand and receptor. *Journal of cell science* 113 (Pt 17):2963-2975.

Varasteh Z, Rosenstrom U, Velikyan I, Mitran B, Altai M, Honarvar H, Rosestedt M, Lindeberg G, Sorensen J, Larhed M, Tolmachev V & Orlova A (2014) The effect of mini-PEG-based spacer length on binding and pharmacokinetic properties of a 68Ga-labeled NOTA-conjugated antagonistic analog of bombesin. *Molecules (Basel, Switzerland)* 19(7):10455-10472.

Varasteh Z, Velikyan I, Lindeberg G, Sorensen J, Larhed M, Sandstrom M, Selvaraju RK, Malmberg J, Tolmachev V & Orlova A (2013) Synthesis and characterization of a high-affinity NOTA-conjugated bombesin antagonist for GRPR-targeted tumor imaging. *Bioconjugate chemistry* 24(7):1144-1153.

Vegt E, Wetzels JF, Russel FG, Masereeuw R, Boerman OC, van Eerd JE, Corstens FH & Oyen WJ (2006) Renal uptake of radiolabeled octreotide in human subjects is efficiently inhibited by succinylated gelatin. *J Nucl Med* 47(3):432-436.

Velikyan I (2013) Prospective of (6)(8)Ga-radiopharmaceutical development. *Theranostics* 4(1):47-80.

Velikyan I, Beyer GJ & Langstrom B (2004) Microwave-supported preparation of (68)Ga bioconjugates with high specific radioactivity. *Bioconjugate chemistry* 15(3):554-560.

Velikyan I, Maecke H & Langstrom B (2008) Convenient preparation of 68Ga-based PET-radiopharmaceuticals at room temperature. *Bioconjugate chemistry* 19(2):569-573.

Velikyan I, Rosenstrom U & Eriksson O (2017) Fully automated GMP production of [68Ga]Ga-DO3A-VS-Cys40-Exendin-4 for clinical use. *American journal of nuclear medicine and molecular imaging* 7(3):111-125.

Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH & Goggins M (Pancreatic cancer. *The Lancet* 378(9791):607-620.

Vincent JP, Mazella J & Kitabgi P (1999) Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends in pharmacological sciences* 20(7):302-309.

Vita N, Laurent P, Lefort S, Chalon P, Dumont X, Kaghad M, Gully D, Le Fur G, Ferrara P & Caput D (1993) Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor. *FEBS letters* 317(1-2):139-142.

Vita N, Oury-Donat F, Chalon P, Guillemot M, Kaghad M, Bachy A, Thurneyssen O, Garcia S, Poinot-Chazel C, Casellas P, Keane P, Le Fur G, Maffrand JP, Soubrie P, Caput D & Ferrara P (1998) Neurotensin is an antagonist of the human neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *European journal of pharmacology* 360(2-3):265-272.

von Forstner C, Egberts J-H, Ammerpohl O, Niedzielska D, Buchert R, Mikecz P, Schumacher U, Peldschus K, Adam G, Pilarsky C, Grutzmann R, Kalthoff H, Henze E & Brenner W (2008) Gene Expression Patterns and Tumor Uptake of 18F-FDG, 18F-FLT, and 18F-FEC in PET/MRI of an Orthotopic Mouse Xenotransplantation Model of Pancreatic Cancer. *Journal of Nuclear Medicine* 49(8):1362-1370.

Vranjesevic D, Schiepers C, Silverman DH, Quon A, Villalpando J, Dahlbom M, Phelps ME & Czernin J (2003) Relationship between 18F-FDG uptake and breast density in women with normal breast tissue. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 44(8):1238-1242.

Wahl RL, Henry CA & Ethier SP (1992) Serum glucose: effects on tumor and normal tissue accumulation of 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose in rodents with mammary carcinoma. *Radiology* 183(3):643-647.

Walker N, Lepee-Lorgeoux I, Fournier J, Betancur C, Rostene W, Ferrara P & Caput D (1998) Tissue distribution and cellular localization of the levocabastine-sensitive neurotensin receptor mRNA in adult rat brain. *Brain research* 57(2):193-200.

Wang J-G, Li N-N, Li H-N, Cui L & Wang P (2011) Pancreatic cancer bears overexpression of neurotensin and neurotensin receptor subtype-1 and SR 48692 counteracts neurotensin induced cell proliferation in human pancreatic ductal carcinoma cell line PANC-1. *Neuropeptides* 45(2):151-156.

Wang X-Y, Yang F, Jin C & Fu D-L (2014) Utility of PET/CT in diagnosis, staging, assessment of resectability and metabolic response of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 20(42):15580-15589.

Warburg O, Wind F & Negelein E (1927) THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *The Journal of general physiology* 8(6):519-530.

Weigel RJ & McDougall IR (2006) The role of radioactive iodine in the treatment of well-differentiated thyroid cancer. *Surgical oncology clinics of North America* 15(3):625-638.

Weiner RE & Thakur ML (2002) Radiolabeled peptides in the diagnosis and therapy of oncological diseases. *Applied radiation and isotopes : including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine* 57(5):749-763.

White JF, Noinaj N, Shibata Y, Love J, Kloss B, Xu F, Gvozdenovic-Jeremic J, Shah P, Shiloach J, Tate CG & Grisshammer R (2012) Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature* 490(7421):508-513.

Wieser G, Popp I, Christian Rischke H, Drendel V, Grosu AL, Bartholoma M, Weber WA, Mansi R, Wetterauer U, Schultze-Seemann W, Meyer PT & Jilg CA (2017) Diagnosis of recurrent prostate cancer with PET/CT imaging using the gastrin-releasing peptide receptor antagonist

68Ga-RM2: Preliminary results in patients with negative or inconclusive [18F]Fluoroethylcholine-PET/CT. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 44(9):1463-1472.

Wild D, Behe M, Wicki A, Storch D, Waser B, Gotthardt M, Keil B, Christofori G, Reubi JC & Macke HR (2006) [Lys40(Ahx-DTPA-111In)NH2]exendin-4, a very promising ligand for glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor targeting. *J Nucl Med* 47(12):2025-2033.

Wild D, Macke HR, Waser B, Reubi JC, Ginj M, Rasch H, Muller-Brand J & Hofmann M (2005) 68Ga-DOTANOC: a first compound for PET imaging with high affinity for somatostatin receptor subtypes 2 and 5. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 32(6):724.

Wood JG, Hoang HD, Bussjaeger LJ & Solomon TE (1988) Effect of neurotensin on pancreatic and gastric secretion and growth in rats. *Pancreas* 3(3):332-339.

Wu N, Kang CS, Sin I, Ren S, Liu D, Ruthengael VC, Lewis MR & Chong HS (2016) Promising bifunctional chelators for copper 64-PET imaging: practical (64)Cu radiolabeling and high in vitro and in vivo complex stability. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 21(2):177-184.

Wu Z, Martinez-Fong D, Trédaniel J & Forgez P (2012) Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy. *Frontiers in Endocrinology* 3:184.

Yamamoto T, Sugiura T, Mizuno T, Okamura Y, Aramaki T, Endo M & Uesaka K (2015) Preoperative FDG-PET predicts early recurrence and a poor prognosis after resection of pancreatic adenocarcinoma. *Annals of surgical oncology* 22(2):677-684.

Younes M, Wu Z, Dupouy S, Lupo AM, Mourra N, Takahashi T, Flejou JF, Tredaniel J, Regnard JF, Damotte D, Alifano M & Forgez P (2014) Neurotensin (NTS) and its receptor (NTSR1) causes EGFR, HER2 and HER3 over-expression and their autocrine/paracrine activation in lung tumors, confirming responsiveness to erlotinib. *Oncotarget* 5(18):8252-8269.

Zhang H, Schuhmacher J, Waser B, Wild D, Eisenhut M, Reubi JC & Maecke HR (2007) DOTA-PESIN, a DOTA-conjugated bombesin derivative designed for the imaging and targeted radionuclide treatment of bombesin receptor-positive tumours. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 34(8):1198-1208.

Zhernosekov KP, Filosofov DV, Baum RP, Aschoff P, Bihl H, Razbash AA, Jahn M, Jennewein M & Rosch F (2007) Processing of generator-produced 68Ga for medical application. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 48(10):1741-1748.

Ziegler SI (2005) Positron Emission Tomography: Principles, Technology, and Recent Developments. *Nuclear Physics A* 752:679-687.

Zimmerman BE, Cessna JT & Fitzgerald R (2008) Standardization of (68)Ge/(68)Ga Using Three Liquid Scintillation Counting Based Methods. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology* 113(5):265-280.

Zoller M, Schuhmacher J, Reed J, Maier-Borst W & Matzku S (1992) Establishment and characterization of monoclonal antibodies against an octahedral gallium chelate suitable for immunoscintigraphy with PET. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 33(7):1366-1372.