

Université de Sherbrooke

Le ^{68}Ga -4HMSA, un traceur pour l'imagerie de l'inflammation

Par
Shigufa Kahn Ali
Département de Médecine Nucléaire et Radiobiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès Sciences (M.Sc.)
en Sciences des Radiations et Imagerie Biomédicale

Sherbrooke, Québec, Canada
Juillet 2021

Membres du jury d'évaluation
Brigitte Guérin, Directrice de maîtrise, Dép. de Médecine Nucléaire et Radiobiologie
Benoît Paquette, Dép. de Médecine Nucléaire et Radiobiologie
Pierre Lavigne, Dép. de Biochimie et génomique fonctionnelle

©Shigufa Kahn Ali, 2021

Résumé

Le ^{68}Ga -4HMSA, un traceur pour l'imagerie de l'inflammation

Par

Shigufa Kahn Ali

Programmes des Sciences des radiations et imagerie biomédicale

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en Sciences des radiations et imagerie biomédicale, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Plusieurs études réalisées sur l'inflammation démontrent qu'elle serait la cause possible de plusieurs maladies, dont certains types de cancers. Présentement, le ^{67}Ga -citrate est le traceur par excellence utilisé de routine en médecine nucléaire pour l'imagerie de l'inflammation et des infections. Les principaux désavantages associés au ^{67}Ga sont sa demi-vie très longue et son manque de spécificité. Le ^{68}Ga pourrait remplacer avantageusement le ^{67}Ga pour l'imagerie. En effet, ce radionucléide a démontré beaucoup de potentiel pour l'imagerie TEP (tomographie par émission par positron) en offrant une meilleure résolution spatiale en plus d'avoir une courte demi-vie.

Cette étude fait suite au développement d'un outil d'imagerie par l'équipe du Pre Guérin qui est un chélateur sidérophore pour l'imagerie de l'inflammation. Le chélateur bifonctionnel possède 4 bras *N*-hydroxy-*N*-méthyl succinamide (4HMSA) qui a prouvé avoir une meilleure cinétique de marquage et stabilité *in vivo* comparativement à d'autres chélateurs analogues (DOTA et NOTA). Cette étude compare ce nouveau chélateur avec le ^{68}Ga -citrate qui est utilisé de routine pour l'imagerie de l'inflammation et des infections chez le petit animal. Le 4HMSA et le citrate ont été marqués au ^{68}Ga et les 2 traceurs seront comparés au niveau de leur captation de l'inflammation à la patte grâce aux images TEP ainsi que leur biodistribution. L'hypothèse de recherche est que le ^{68}Ga -4HMSA soit aussi efficace que le ^{68}Ga -citrate en ayant un profil pharmacocinétique plus favorable et une dosimétrie inférieure. Nos objectifs étaient de valider le potentiel du ^{68}Ga -4HMSA en le comparant avec le ^{68}Ga -Citrate, obtenir le profil de biodistribution des deux traceurs et finalement de démontrer que le ratio cible/non-cible à l'inflammation est meilleur avec le ^{68}Ga -4HMSA. Les résultats ont permis de conclure que le ^{68}Ga -4HMSA est aussi efficace que le ^{68}Ga -Citrate pour visualiser l'inflammation tout en ayant un meilleur profil de biodistribution et une dosimétrie améliorée.

Mots clés : ^{68}Ga -4HMSA, sidérophore, radiotraceur, tomographie par émission de positron (TEP), inflammation

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	ii
Liste des figures.....	v
Liste des abréviations	vi
INTRODUCTION.....	1
1. Inflammation.....	1
1.1 Inflammation aiguë.....	2
1.2 Inflammation chronique	5
2. Principe général de l'imagerie TEP	6
2.1 Avantages et applications de l'imagerie TEP.....	7
2.2 Radiotraceurs pour l'imagerie de l'inflammation	8
3. Les radioisotopes du gallium	9
3.1 ⁶⁷ Ga-citrate	10
3.2 Gallium 68.....	11
4. Sidérophores	12
LES OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	16
ARTICLE I.....	16
DISCUSSION	56
1. 4HMSA.....	57
2. Biodistribution	58
3. Imagerie TEP	58
4. Protéines plasmatiques.....	59
5. Sidérophores	60
CONCLUSION	61

PERSPECTIVE D'AVENIR.....	62
RÉFÉRENCES.....	63

LISTE DES FIGURES

Figure 1: La migration des leucocytes hors de la circulation sanguine schématisée en 3 grandes étapes

Figure 2: Illustration du principe de la TEP

Figure 3: Les différents biomarqueurs de l'imagerie de l'inflammation TEP dans les foyers inflammatoires

Figure 4: Structure chimique du gallium citrate

Figure 5: Structure chimique du chélateur 4HMSA

Figure 6: Différents types de sidérophores provenant de différents microorganismes

Figure 7: Schéma du mécanisme proposé du trafic du fer induit par NGAL

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4HMSA	Quatre <i>N</i> -hydroxy- <i>N</i> -methyl succinamide
%DI/g	Pourcentage de dose injectée par gramme de tissu
¹⁸ F	Fluor-18
¹⁸ [F]FDG, FDG	2-désoxy-2-[¹⁸ F]-fluoro-D-glucose
⁶⁷ Ga	Gallium 67
⁶⁸ Ga	Gallium 68
GaCl ₃	Chlorure de gallium (III)
⁶⁸ Ge	Germanium 68
^{99m} Tc	Technétium-99 métastable
AMA	Activité molaire apparente
α, alpha	Particule alpha
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMIDE	Amide's a Medical Imaging Data Examiner
AVC	Accident vasculaire cérébral
β, bêta	Particule bêta
CFA	Complete Freund's adjuvant
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
CT	TDM tomodensitométrie
DFO	Déféroxamine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOTA	Acide 1,4,7,10-tétrazacyclododécane- <i>N,N',N'',N'''</i> -tétraacétique
DTPA	Acide diéthylènetriaminepentaacétique
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
Fe	Fer
FOXE	Ferrioxamine E
γ, gamma	Particule gamma
HCl	Acide hydrochlorique
HMDM	Human Monocyte-Derived Macrophage
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukine
IR	Infra-rouge
ITLC	Instant thin layer chromatography
ITLC-SG	ITLC-silica gel
keV	Kilo-électron-volt
Lcn2	Lipocalin-2
LC/MS	Liquid chromatography/mass spectroscopy
LPS	Lipopolysaccharide
MBq	Megabecquerel
MeOH	Méthanol
MHz	Mégahertz
NADPH	Forme réduite de Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaCl	Chlorure de sodium

NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NMR	Nuclear magnetic resonance
NO	Monoxyde d'azote
NOTA	Acide 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
RCY	Radiochemical yield
RF	Retention factor
ROI	Region of interest (région d'intérêt)
ROS	Reactive oxygen species (dérivé réactif de l'oxygène)
RPM	Revolutions per minute
RT	Retention time
SPECT	Single-photon emission computed tomography
SSTR	Somatostatin receptors
TAFC	Triacetylfusarinine C
TAC	Time activity curve
TATE	Octréotate
TDM	Tomodensitométrie
TEMP	Tomographie par émission monophotonique
TEP	Tomographie par émission de positrons
THF	Tétrahydrofurane
TOC	Edotreotide
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TFA	Trifluoroacetic acid
TLC	Thin layer chromatography
UPLC	Ultra-performance liquid chromatography
VAP	Vascular adhesion protein
VCAM	Vascular cell adhesion protein
^{89}Zr	Zirconium 89

INTRODUCTION

1. Inflammation

L'inflammation est une réaction du système immunitaire qui a pour objectif de défendre l'hôte contre les agents pathogènes (Wu *et al.*, 2013). Malgré le fait qu'il est essentiel pour la défense de l'hôte, une inflammation prolongée ou une réponse inflammatoire inappropriée peut causer des dommages aux tissus sains environnants, et selon plusieurs (Ujula, 2011), (Wu *et al.*, 2013) et (Coussens et Werb, 2010), c'est ce qui serait la source de plusieurs maladies et cancers. En effet, lors d'une lésion qui est suivie d'une cicatrisation de la plaie, la prolifération cellulaire est activée pendant que le tissu se régénère. Une fois la cicatrisation complétée, l'inflammation et la prolifération sont normalement supprimées, dans le cas contraire, les cellules continueront de proliférer ce qui endommage leur ADN et pourrait mener au développement de cancer (Coussens et Werb, 2010). Il est maintenant clair que ce n'est pas seulement la prolifération des cellules qui causerait le cancer, mais bien la prolifération en continu des cellules dans un environnement riche en cellules inflammatoires, facteurs de croissances et des agents qui favorisent les dommages à l'ADN (Coussens et Werb, 2010). En effet, il a été démontré dans plusieurs études qu'une inflammation chronique non traitée peut mener au développement du cancer et cette interaction complexe entre ces deux phénomènes n'est pas totalement encore comprise (Marx, 2004). On peut dire qu'une tumeur est comme une plaie qui n'a pas guéri (Dvorak, 1986). L'inflammation est un phénomène encore très étudié étant donné qu'on ne comprend pas encore tous les aspects de celle-ci. Dans l'objectif de développer un traceur pour l'inflammation, il est bien important de comprendre ce qu'est l'inflammation et comment elle contribue aux processus physiologiques et pathologiques comme la cicatrisation d'une plaie par exemple ou lors d'une infection.

1.1 Inflammation aiguë

Il y a deux types d'inflammation, l'inflammation aiguë survient dans les minutes qui suivent le dommage. C'est un processus qui prend de quelques heures à quelques jours pour la réparation du tissu. Les cellules impliquées lors d'une inflammation aiguë sont celles du système immunitaire inné, tels que les neutrophiles qui sont les premiers recrutés au site d'inflammation durant les premières 6 à 24 heures (Kumar *et al.*, 2015), suivi des monocytes qui seront différenciés en macrophages qui sont guidés par les facteurs chimiotactiques après 24 à 48 heures (Coussens et Werb, 2010). En effet, les neutrophiles sont beaucoup plus nombreux dans le sang que les monocytes et ils répondent plus rapidement aux chimiokines en s'attachant plus fermement aux molécules d'adhésion présentes à la surface de l'endothélium. Après la migration, les neutrophiles ont une courte demi-vie ce qui fait en sorte qu'ils s'élimineront par apoptose après 24 à 48 heures alors que les monocytes survivront plus longtemps (Kumar *et al.*, 2012). Une fois les macrophages activés, ils deviennent la source principale de cytokines et facteurs de croissance ce qui affecte l'endothélium, les cellules épithéliales et mésenchymateuses dans l'environnement local (Coussens et Werb, 2010).

Plusieurs événements surviennent durant une inflammation aiguë, des événements cellulaires où il y a le recrutement des neutrophiles et leur activation. Également des changements dans la vascularisation notamment, une vasodilatation des vaisseaux ainsi qu'une augmentation de la perméabilité vasculaire. Il a été démontré que ces changements de conditions lors d'une réaction inflammatoire tels que l'augmentation du flux sanguin, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et des globules blancs favorisaient l'accumulation des agents d'imagerie au site d'inflammation (Boerman *et al.*, 2001). Ces changements permettent la sortie de l'eau et des molécules des vaisseaux vers les tissus (oedème). Un autre événement très important est la migration des leucocytes de la circulation vers les tissus aussi appelés la diapédèse présentée à la figure 1. Ce mécanisme à 3 étapes permet le passage des cellules comme les leucocytes à travers la paroi de l'endothélium. Pour que ce passage ait lieu, plusieurs étapes préliminaires sont nécessaires. Tout d'abord, le roulement des leucocytes sur la paroi vasculaire a lieu. Ce processus est en fait un

attachement et un détachement consécutif avec des molécules spécifiques d'adhésion activées, les sélectines (L-sélectines, E-sélectines et P-sélectines). Les P-sélectines, qui sont normalement absentes sur la paroi vasculaire, vont être exposées à la surface cellulaire durant la phase initiale de l'inflammation et interagiront avec les ligands des leucocytes. Ces ligands sont des résidus fucosylés du déterminant sialyl Lewis x (SLe^x) (Beekhuizen et Furth, 1998). La liaison des sélectines à leurs ligands se fait très rapidement ce qui permet aux leucocytes en mouvement d'être capturés rapidement dans le sang et de se lier temporairement à l'endothélium (roulement). La sélectine E, sera exprimée à la surface qu'après activation par les cytokines inflammatoires comme TNF- α et IL-1 (Beekhuizen et Furth, 1998). Le roulement est une étape cruciale et il est encore plus important qu'il soit lent. Localement, il y a une augmentation du volume sanguin, ce qui ralentit la vitesse du roulement et permet aux leucocytes de rouler sur la paroi de l'endothélium afin d'avoir une bonne adhérence. À la suite du roulement des leucocytes, les molécules pro-inflammatoires et les chimiokines présentes à la surface de l'endothélium permettront à celles-ci d'être encore plus activées et par le fait même, activent les intégrines pour l'étape de l'adhésion. Les intégrines $\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_4\beta_7$ se lieront aux molécules d'adhésion ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), ICAM-2 et VCAM-1 exprimées à la surface de l'endothélium au site d'inflammation. Pour ce qui est de la dernière étape de la migration des leucocytes à travers la membrane, les molécules d'adhésion impliquées sont appelées PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1). Ce qui est particulier de cette molécule est qu'elle est exprimée à la surface des leucocytes et elle est présente en grand nombre à la surface de l'endothélium au site de jonctions intercellulaires, ce qui suggère donc que PECAM-1 interagit avec lui-même (Beekhuizen et Furth, 1998). Cependant, les leucocytes ne sont pas les seuls à utiliser cette voie, en effet, les cellules tumorales transloqueront de la circulation, par diapédèse à partir du site de la tumeur primaire vers d'autres sites par un mécanisme semblable (Beekhuizen et Furth, 1998).

Figure 1: La migration des leucocytes hors de la circulation sanguine schématisée en 3 grandes étapes

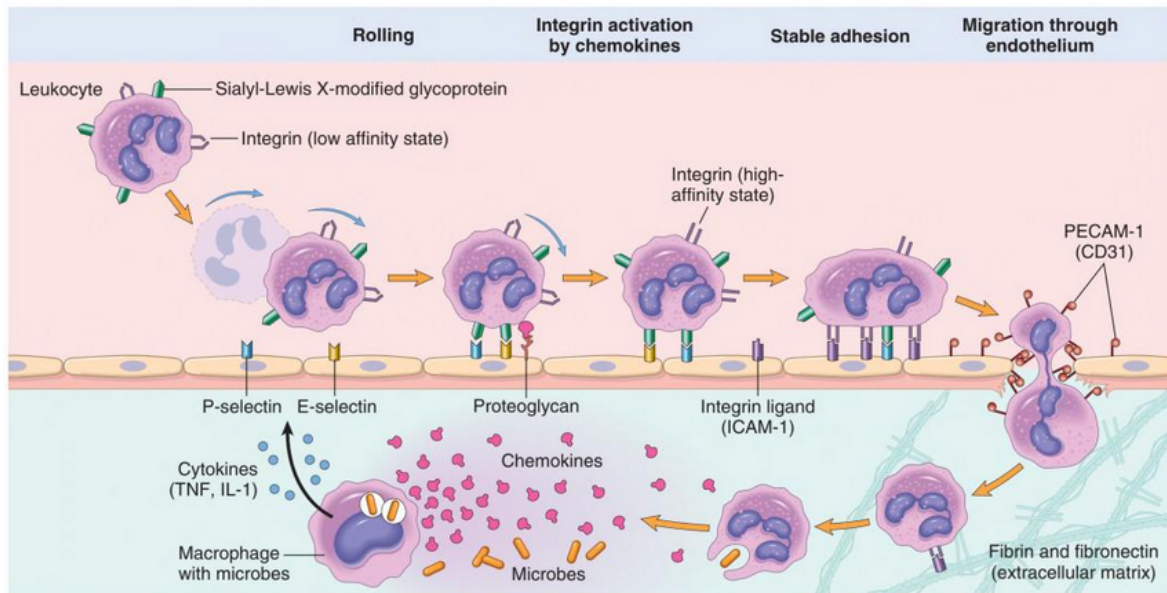


Image tirée de: Kumar, V., Abul, A. et Aster, J. (2015) Robins and Cotran Pathologic basis of disease. Canada: Elsevier (9th edition), 70-100.

Une fois arrivées au site d'inflammation, les molécules concernées (cytokines, chimiokines, interférons, interleukines, facteurs de croissance, etc.) reconnaissent l'agent pathogène et procéderont à son élimination puisque les cellules inflammatoires expriment une variété de récepteurs qui reconnaissent les stimuli des pathogènes et délivreront des signaux d'activation. L'élimination en soi se fait soit par phagocytose grâce aux macrophages ou soit par d'autres mécanismes de dégradation qui utilisent les lysosomes et la libération de différents agents (ROS, enzymes, NADPH, NO) (Kumar *et al.*, 2015). L'inflammation diminue en partie parce que les médiateurs ne sont produits que de manière transitoire et ont généralement une courte demi-vie. Cependant, l'inflammation doit être régulée de manière active et rigoureuse puisqu'elle a la capacité d'endommager les tissus dans le cas contraire. Alors, pendant que l'inflammation se développe, des signaux d'arrêt sont également déclenchés ce qui permet le passage de la forme pro-inflammatoire à la forme anti-inflammatoire par l'entremise de la production des cytokines anti-inflammatoires telles que TGF β , IL-10, et plusieurs autres (Kumar *et al.*, 2015). On s'attend à trois types de résultats suite à une réaction inflammatoire: 1) une résolution complète se produit avec la

régénération des cellules natives et la restauration à la normalité; 2) la cicatrisation par remplacement du tissu conjonctif (fibrose) se produit après une destruction substantielle des tissus; et 3) une progression vers une inflammation chronique (Kumar *et al.*, 2015).

1.2 Inflammation chronique

Le deuxième type d'inflammation est l'inflammation chronique qui est une phase anormale d'inflammation active qui se caractérise principalement par sa persistance dans le temps où la destruction des tissus et la cicatrisation (guérison) surviennent simultanément. En effet, elle peut durer des semaines, des mois voire même des années d'où l'utilisation du terme « chronique ». Elle peut être causée par plusieurs facteurs, comme une infection qui persiste, une maladie auto-immune ou bien une exposition prolongée à des substances exogènes ou endogènes qui ont un potentiel toxique. Une inflammation chronique se caractérise par une infiltration des cellules inflammatoires mononucléées, dont les macrophages, les lymphocytes et les cellules plasmiques. L'inflammation qui persiste entraîne des dommages aux tissus environnants ainsi qu'une tentative de réparation par angiogenèse et fibrose. L'inflammation chronique fait appel au système immunitaire inné et adaptatif et elle est médiée par les cytokines produites par les macrophages et les lymphocytes T et B activés qui indiquent la présence d'antigènes ce qui induit par le fait même une réponse immune humorale. Tous ces facteurs mènent à une activation des myofibroblastes et d'une déposition excessive de la matrice extracellulaire qui inclut le collagène de type I et II, la fibronectine, l'élastine, les protéoglycans et la lamine. Tous favorisent la formation de cicatrices fibrotiques permanentes ce qui résulte donc d'un dysfonctionnement de l'organe (Ptaschinski et Lukacs, 2007). Ce type d'inflammation qui est excessif joue un rôle critique dans le cancer, l'athérosclérose, les maladies cardiaques ainsi que certaines maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer par exemple. De plus, une inflammation prolongée et la fibrose qui l'accompagne provoquent des modifications pathologiques au cours de maladies infectieuses chroniques, métaboliques et autres (Kumar *et al.*, 2015).

2. Principe général de l'imagerie TEP

La tomographie par émission de positrons est une modalité d'imagerie utilisée en médecine nucléaire qui permet de voir la cinétique d'un traceur qui émet des positrons en fonction du temps. Ces émetteurs de positrons sont caractérisés par un excès de charge positive dans leurs noyaux. Ils se désintègrent vers un état stable par une transformation d'un proton en un neutron qui conduit à l'émission d'un neutrino et d'un positron. Celui-ci possède une charge opposée à un électron, mais possède la même masse. Une fois émis, le positron parcourt quelques millimètres dans les tissus, au cours desquels il perd toute son énergie cinétique. Quand le positron est au repos, il interagit avec un électron du milieu, suivant une réaction d'annihilation au cours de laquelle la masse des deux particules se transforme en deux photons gamma de 511 keV, émis dans des directions opposées chacune à 180° (de Dreuille *et al.*, 2004). Le principe de base de la TEP consiste justement à détecter ces deux photons de 511 keV pour déterminer le lieu d'annihilation présenté à la figure 2 et il est important de comprendre que l'information mesurée représente le lieu de l'annihilation et non le lieu où le positron a été émis (de Dreuille *et al.*, 2004).

Figure 2: Illustration du principe de la TEP

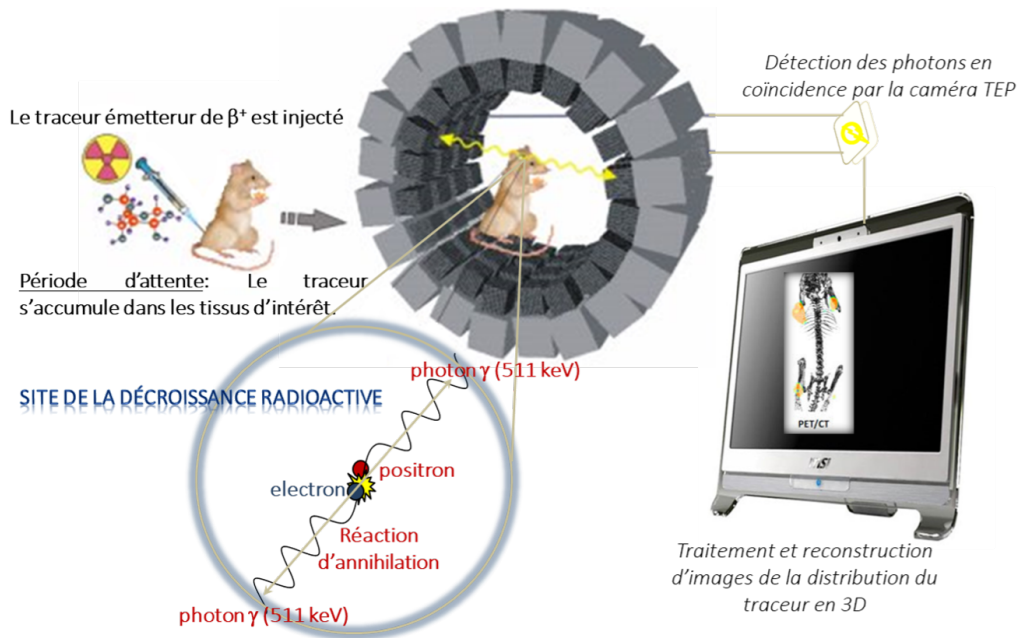


Image tirée du cours BCM502 par Brigitte Guérin

2.1 Avantages et application de l'imagerie TEP

L'imagerie TEP est une modalité d'imagerie qui a la capacité d'illustrer l'état fonctionnel de la maladie, qui est essentiel pour définir le pronostic et aider à choisir le bon traitement. Il permet d'obtenir une distribution quantitative en temps réel ainsi qu'une pharmacocinétique de l'agent marqué (Ujula, 2011). Comparativement aux autres techniques d'imagerie, la TEP a l'avantage d'avoir une sensibilité ainsi qu'une spécificité élevée et c'est pourquoi elle est devenue l'une des techniques d'imagerie moléculaire les plus utilisées en clinique (Wu *et al.*, 2013). Un autre grand avantage est qu'elle peut être combinée avec une image anatomique obtenue par TDM. Cette combinaison de modalité d'imagerie fournit une estimation plus précise des fonctions des organes ainsi que des anomalies dans les tissus permettant ainsi d'avoir une imagerie fonctionnelle moléculaire et anatomique de haute sensibilité simplifiant ainsi l'interprétation des données (Wu *et al.*, 2013; Ujula, 2011).

2.2 Radiotraceurs pour l'imagerie de l'inflammation

Un des traceurs les plus utilisés pour l'imagerie du cancer et de l'inflammation est 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose ([¹⁸F]FDG ou FDG) qui est un analogue du glucose. Son principe repose sur le fait que la consommation métabolique du glucose auprès des cellules cancéreuses et cellules inflammatoires actives est élevée et c'est cette consommation que le ¹⁸F-FDG détectera. Malgré son utilisation extensive pour la détection des tumeurs, celui-ci a tendance à donner des résultats faux négatifs, surtout chez les patients avec des cancers (Wu *et al.*, 2013; Ujula, 2011). Un autre désavantage du ¹⁸F-FDG est que c'est un traceur non spécifique puisqu'il n'est pas capable de différencier entre un développement de cancer, une tumeur bénigne ou un foyer inflammatoire (Roivainen *et al.*, 2012).

Les leucocytes radiomarqués (¹¹¹In-labeled oxine-chelator ou ^{99m}Tc-labeled hexamethylpropylene-amineoxime (HMPAO)-chelator) ont été utilisés comme « Gold standard » pour l'imagerie de l'inflammation pendant longtemps. Cependant, leur utilisation est limitée seulement à l'inflammation aiguë, puisque lors de l'inflammation chronique, l'accumulation de neutrophile au site d'inflammation est limitée, c'est pourquoi le marquage des leucocytes n'est pas une technique appropriée pour l'imagerie de l'inflammation chronique (Goldsmith and Vallabhajosula, 2009). De plus, la méthode est invasive et nécessite de travailler avec des grands volumes de sang des patients avec des possibilités de faux négatifs, de faibles comptes qui donnent des images de faible résolution ainsi des temps de captation qui peuvent aller jusqu'à 24 heures (AWJM Glaudemans *et al.*, 2015) ont fait en sorte que cette technique n'est dorénavant plus utilisée.

Plusieurs molécules sont actuellement en développement pour l'imagerie de l'inflammation. Certains sont des marqueurs membranaires des cellules inflammatoires comme ⁶⁸Ga-DOTA-TOC qui ciblent les récepteurs de la somatostatine (SSTR) alors que d'autres ciblent la paroi des vaisseaux sanguins comme ⁶⁸Ga-DOTAVAP-P1 ou ¹⁸F-4V qui lient les protéines d'adhésion endothéliale comme VAP-1 et VCAM-1 toutes présentées à la figure 3. Le problème avec tous ces traceurs est que certains disent être spécifiques, alors qu'en réalité, ces traceurs peuvent être utilisés autant pour la détection de l'inflammation que pour le cancer, ce qui rend le développement de traceur pour l'inflammation un grand défi

étant donné la similarité des mécanismes entre l'inflammation et le cancer (Coussens et Werb, 2010).

Figure 3: Les différents biomarqueurs de l'imagerie de l'inflammation TEP dans les foyers inflammatoires

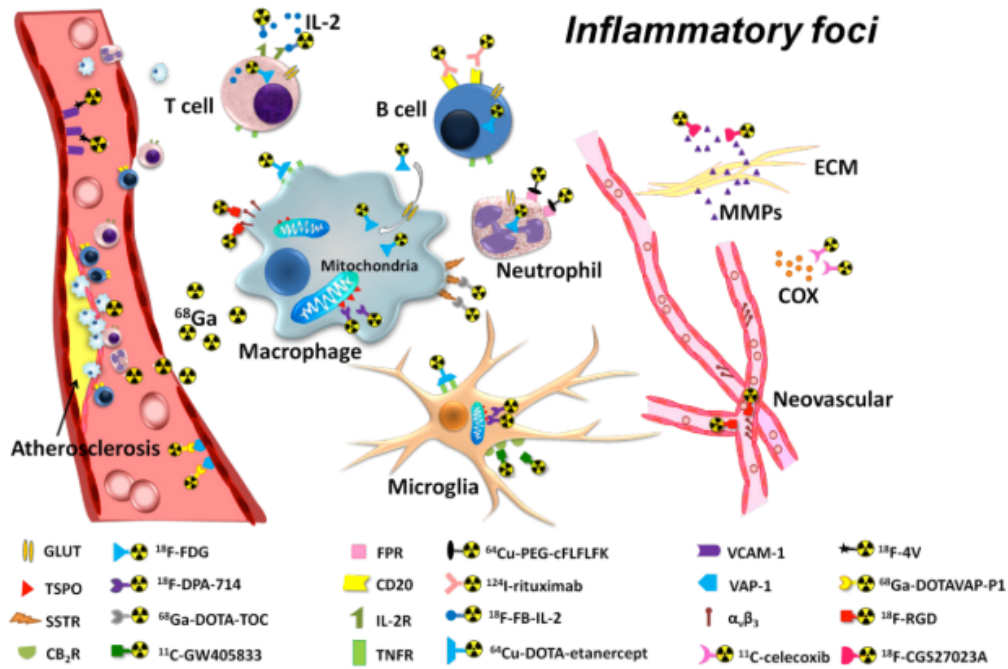


Image tirée de : Wu, C., Li, F., Niu, G., & Chen, X. (2013). PET imaging of inflammation biomarkers. *Theranostics*. <https://doi.org/10.7150/thno.6592>

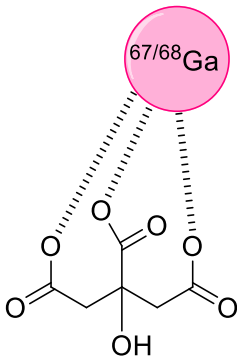
3. Les radioisotopes du gallium

Les 3 radioisotopes du gallium qui sont utilisés en médecine nucléaire sont le ^{66}Ga qui a une demi-vie de 9,5 heures, le ^{67}Ga qui a une demi-vie de 3,3 jours et le ^{68}Ga qui a une demi-vie de 67,71 minutes. Le ^{66}Ga et le ^{68}Ga se désintègrent en émettant des positrons (β^+) c'est pourquoi ils peuvent être utilisés pour l'imagerie TEP alors que le ^{67}Ga qui lui se désintègre par émission de rayons gamma est utilisé en imagerie TEMP (tomographie par émission monophotonique) (Ujula, 2011).

3.1 ^{67}Ga -citrate

Les premières études réalisées avec le ^{67}Ga -citrate sur des tumeurs ont débuté aux alentours des années 60 (Edwards and Hayes, 1969) et il a été rapidement reconnu que l'imagerie de l'inflammation était possible (Higasi et al., 1971; Lavender et al., 1971; Ito et al., 1971). Il est utilisé de routine en médecine nucléaire pour l'imagerie de l'inflammation et l'infection, cependant il possède plusieurs désavantages. La structure du traceur est présentée à la figure 4. L'activité pouvant être injectée est limitée en raison de sa longue demi-vie, soit de 3,3 jours et du large spectre de gamma émis par le ^{67}Ga , ce qui résulte d'une réduction de la qualité et de la résolution des images (Nanni *et al.*, 2010). Un autre désavantage du ^{67}Ga -citrate est son manque de spécificité ainsi que son accumulation dans les tissus qui est lente (Ujula, 2011). En effet, la captation du produit au site d'inflammation est optimale entre 48 et 72 heures suite à l'injection intraveineuse (Bekerman *et al.*, 1980) ce qui fait en sorte que l'imagerie par TEMP ne peut être faite que des jours suite à l'injection et que le diagnostic complet prend plusieurs jours, ce qui est désavantageux pour les patients.

Figure 4 : Structure chimique du gallium citrate



Source : Samia Ait-Mohand

Ce qui est reconnu dans la littérature est que le citrate est un chélateur faible et le mécanisme d'action proposé implique que le $^{67}\text{Ga}^{3+}$ est rapidement libéré et se liera aux protéines plasmatiques, entre autres la transferrine (Ujula, 2011). En fait, le gallium peut se lier à au moins quatre différentes molécules: la transferrine, la lactoferrine, la ferritine et les sidérophores. L'ordre d'affinité pour le gallium est comme suit: sidérophore > lactoferrine > transferrine (Hoffer, 1980). L'accumulation du ^{67}Ga au site d'inflammation a été démontrée

autant avec l'inflammation aiguë que chronique. Les leucocytes au site d'inflammation ou d'infection sécréteront des lactoferrines qui sont localisés et liés aux macrophages (Imberti, 2018). Le ^{67}Ga est donc transporté soit sous sa forme ionique ou liée aux récepteurs de la transferrine (CD71) et peuvent éventuellement quitter l'épithélium vasculaire au site d'inflammation et ensuite se lier à la lactoferrine qui a une grande affinité pour le gallium (Ryan et Fogelman, 2007). Une fois le gallium injecté, 10-25% seront excrétés par les reins dans les 24 heures qui suivent l'injection. Le restant de la dose injectée reste dans le corps et est également distribué dans le foie, les os, la moelle osseuse et les tissus mous (Hoffer, 1980) contribuant à augmenter la dose prise par les patients.

3.2 ^{68}Ga

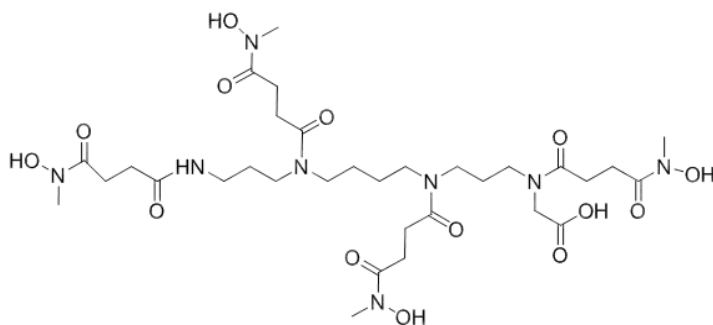
Pour contrer les nombreux désavantages qu'apporte l'utilisation du ^{67}Ga en imagerie, le ^{68}Ga s'avère être une option intéressante. Le ^{68}Ga est un radionucléide qui se désintègre en ^{68}Zn par émission de positrons (rendement β^+ : 89 %, $E_{\text{max}} = 1.89 \text{ MeV}$) avec une demi-vie plus courte de 68 minutes (Velikyan, 2005). Lorsque le positron entre en collision avec un électron, il est annihilé et deux photons d'une énergie de 511 keV chacun sont émis à 180° l'un de l'autre qui sont détectés par TEP (figure 2).

Le ^{68}Ga est de plus en plus utilisé en imagerie étant donné ses caractéristiques de désintégration favorable et sa courte demi-vie. De plus, le ^{68}Ga offre de meilleures options de marquage, un temps d'imagerie plus court sans que le patient aille besoin de préparation spéciale. L'imagerie par TEP offre une meilleure résolution spatiale comparativement à la SPECT, une meilleure dosimétrie et une possibilité de mieux quantifier l'accumulation du traceur (Voster et al., 2016). Un autre grand avantage du ^{68}Ga est qu'il est disponible à partir d'un générateur Germanium-68(^{68}Ge)/ ^{68}Ga ce qui permet d'y avoir un accès régulier (plusieurs éluions par jour) et relativement peu coûteux pour les centres qui n'ont pas accès à des cyclotrons.

L'ajout du ^{68}Ga dans des biomolécules nécessite la conjugaison à un chélateur bifonctionnel qui liera l'ion métallique en plus d'avoir un groupement fonctionnel qui est chimiquement actif. L'équipe de la professeure Guérin a développé un chélateur bifonctionnel, le 4HMSA qui possède 4 bras *N*-hydroxy-*N*-methyl succinamide, un noyau spermine et un groupement acide carboxylique pour sa bioconjugaison (Ait-Mohand *et al.*,

2017) présenté à la figure 5. Ce nouveau chélateur peut être utilisé avec le ^{68}Ga ainsi que le ^{89}Zr . Un avantage du 4HMSA est qu'il offre une cinétique de marquage très rapide à 20 °C à différents pH à comparer à ses analogues DOTA et NOTA en plus d'atteindre une complexation complète en 5 minutes. Ce nouveau chélateur offre une conjugaison facile aux peptides d'intérêt et montre une grande stabilité *in vivo* dans le plasma de souris (chez des souris balb/c) 2 heures après l'injection avec une activité résiduelle faible dans divers tissus. C'est pourquoi le ^{68}Ga -4HMSA possède un grand potentiel comme agent d'imagerie TEP.

Figure 5. Structure chimique du chélateur 4HMSA



4. Sidérophore

Une des caractéristiques intéressantes de ce chélateur est qu'il agit comme un sidérophore. Un sidérophore est une molécule de faible poids moléculaire (500-1500 Da) (Petrik *et al.*, 2012) qui a pour but de chélater le fer. Les sidérophores sont synthétisés par la plupart des microorganismes pour l'acquisition et le stockage du fer (Petrik *et al.*, 2014) (Figure). La raison pour laquelle on dit que le chélateur est un sidérophore est due à sa structure chimique et sa fonction, qui dans notre cas est de chélater le Fe^{3+} et le ^{68}Ga qui est chimiquement similaire au Fe^{3+} . Les différents sidérophores provenant de différents microorganismes sont présentés à la figure 6. Il a été démontré dans le passé que les sidérophores peuvent être radiomarqués avec le ^{68}Ga dans un modèle d'infection chez le rat à l'aide d'imagerie TEP (Petrik *et al.*, 2014).

Figure 6 : Différents types de sidérophores provenant de différents microorganismes

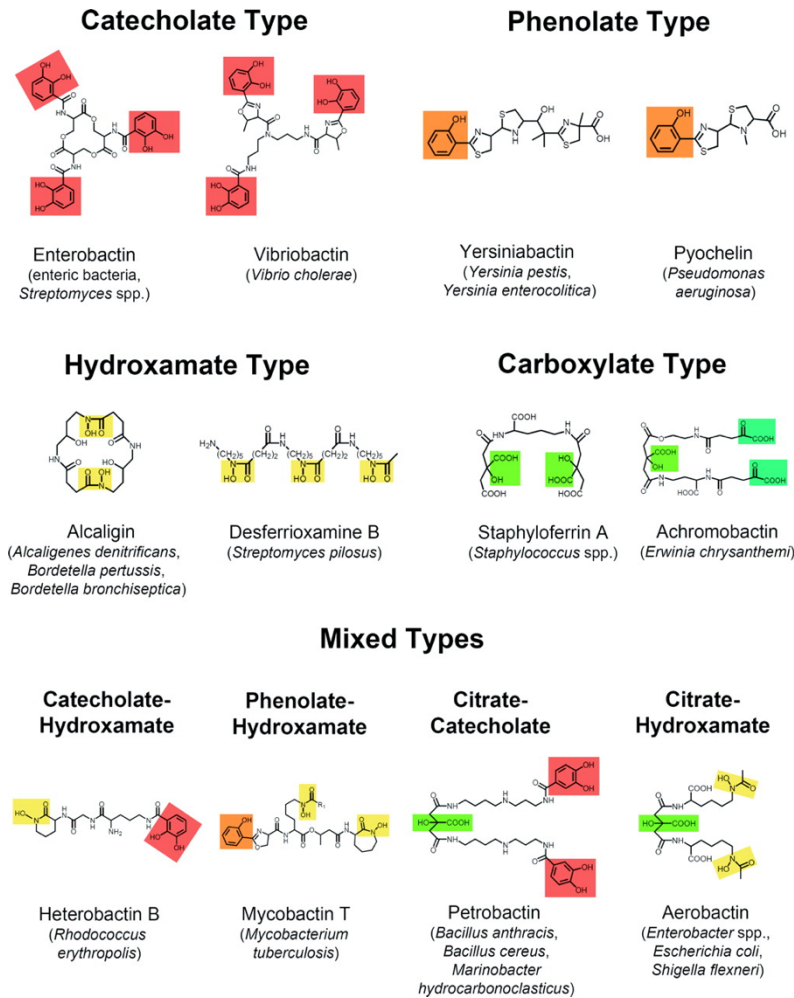


Image tirée de : Miethke, M., & Marahiel, M. A. (2007). Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 413–451.

Malgré la similarité entre le gallium et le fer, la différence majeure est que le Fe^{3+} sera réduit par une ferriréductase en Fe^{2+} dans la cellule, alors que le gallium n'est pas réduit. Il sera transporté sous forme de Ga^{3+} ou Ga^{3+} -chélate. De plus, le mécanisme d'internalisation de chaque métal semble être différent. Peu est connu et compris pour ce qui est de la mécanistique intracellulaire du gallium. Le mécanisme de ^{68}Ga -siderophores propose que son mode d'action repose sur le transport actif des transporteurs spécifiques et qu'il utilise la voie de nutrition des microorganismes qui potentiellement permettrait la captation du traceur dans les tissus infectés (Petrik *et al.*, 2014).

Un des plus grands défis pour une bactérie est l'acquisition de fer durant et après une infection au sein de l'hôte. Cette compétition pour le fer débute lorsque l'hôte sécrète des protéines qui lient le fer comme la lactoferrine par exemple. Lorsque les pathogènes sont privés d'une source de fer pour leur prolifération, ils biosynthétiseront des sidérophores qui permettront de prendre le fer des lactoferrines et autres protéines liant le fer et se l'approprier étant donné que les sidérophores ont une plus grande affinité pour le fer. L'hôte répondra en sécrétant du lipocaline 2 (Lcn2), aussi reconnu sous le nom de NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin), siderocaline ou 24p3, qui est une protéine de la famille des lipocalines produites par les neutrophiles, les cellules épithéliales ainsi que les macrophages (Saiga *et al.*, 2008). Lcn2 est entreposé dans les granules des neutrophiles et va être rapidement sécrété durant une infection. Il va se lier avec les sidérophores liés au fer et va empêcher les pathogènes d'acquérir le fer. Lcn2 possède 2 récepteurs de surface cellulaire qui sont le 24p3R et le megalin. Un mécanisme de la captation du fer modulé par le Lcn2 propose que le sidérophore-fer lié au Lcn2/NGAL se liera à un des deux récepteurs (24p3R ou megalin) et entrer dans la cellule dans un endosome acidifié pour promouvoir le relâchement du fer dans le cytoplasme de la cellule entraînant la régulation des gènes dépendant du fer présenté à la figure 7 (Schmidt-Ott *et al.*, 2007). Étant donné la similarité entre le fer et le gallium, et le fait que notre chélateur est un sidérophore, nous proposons que le mécanisme d'action du ^{68}Ga -4HMSA puisse utiliser une voie semblable à celle utilisant le Lcn2/NGAL pour l'internalisation du ^{68}Ga dans les cellules. De plus, dans une étude comparative faite avec la transferrine démontre que ces deux protéines de transport (la transferrine et le 24p3/Ngal) entrent dans la cellule par des mécanismes indépendants utilisant des récepteurs différents (Yang *et al.*, 2002).

Figure 7: Schéma du mécanisme proposé du trafic du fer induit par NGAL

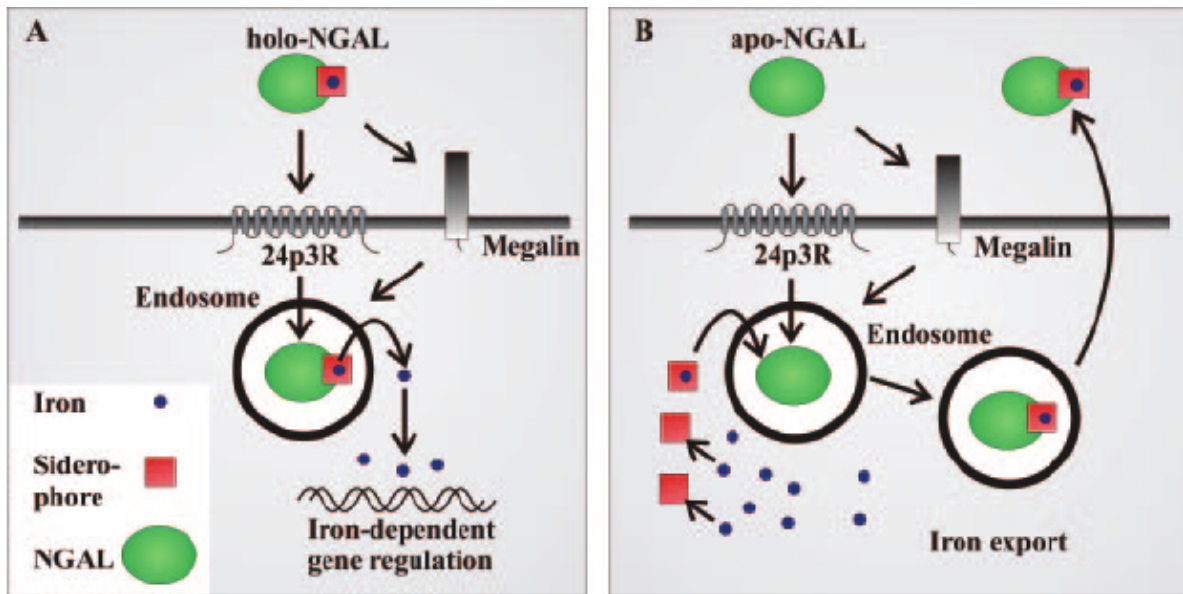


Image tirée de : Schmidt-Ott, K. M., Mori, K., Li, J. Y., Kalandadze, A., Cohen, D. J., Devarajan, P., & Barasch, J. (2007). Dual Action of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(2), 407–413.

LES OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

L'imagerie de l'inflammation est un domaine encore en développement où plusieurs traceurs ont démontré avoir du potentiel. L'inflammation étant un processus physiologique qui implique plusieurs étapes, protéines, molécules et mécanismes complexes en plus d'être associé à d'autres maladies tels les cancers, il devient difficile de développer un traceur spécifique à l'inflammation. Malgré le fait que certains traceurs sont dits être spécifiques, ils sont utilisés autant pour l'imagerie de l'inflammation que pour la détection de tumeur. Il est possible de visualiser l'inflammation avec plusieurs modalités d'imagerie et la plus populaire est l'imagerie TEP. La TEP est une modalité d'imagerie qui fait de plus en plus sa place dans le domaine biomédical étant donné ses nombreux avantages dont sa capacité d'évaluer quantitativement un processus physiologique et biochimique.

L'objectif de cette étude est de démontrer le potentiel du traceur sidérophore ^{68}Ga -4HMSA comme agent d'imagerie TEP spécifique à l'inflammation. En premier lieu, le traceur développé par le groupe du professeur Guérin sera comparé à un autre traceur utilisé en médecine nucléaire pour l'imagerie de l'inflammation, soit le ^{68}Ga -citrate. L'objectif spécifique est de prouver que le ^{68}Ga -4HMSA est aussi efficace que le ^{68}Ga -citrate pour l'imagerie TEP de l'inflammation tout en ayant une meilleure spécificité, une meilleure pharmacocinétique et une dose de radiation inférieure aux tissus non ciblés. Nous évaluerons d'abord le potentiel de ces deux traceurs à se lier aux protéines plasmatiques. Par la suite, le ^{68}Ga -4HMSA et le ^{68}Ga -citrate seront comparés à l'aide de l'imagerie TEP suivi d'études de biodistribution dans un modèle animal d'inflammation induite par l'adjuvant complet de Freund afin d'évaluer leur capacité à imager l'inflammation au niveau de la patte.

Article 1

[⁶⁸Ga]Ga-4HMSA a promising new PET tracer for imaging inflammation (Article 1)

Shigufa Kahn Ali^{1†}, Samia Ait-Mohand^{1†}, Véronique Dumulon-Perreault², Brigitte Guérin^{1,2*}

Statut de l'article: soumis dans *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Research* (EJNMMI Research)

Contribution de l'étudiante: Shigufa Kahn Ali a effectué les expériences *in vivo* et l'analyse des données. Elle a contribué à la préparation de la première version de l'article et révisé l'article sous la direction de Brigitte Guérin.

Résumé :

L'imagerie de l'inflammation est un défi depuis de nombreuses années. Les traceurs de l'imagerie de l'inflammation couramment utilisés en médecine nucléaire, tels que le [⁶⁷Ga]Ga-citrate et le 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose ([¹⁸F]FDG) ont montré plusieurs limitations. Avec la commercialisation des générateurs ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga et la capacité d'une production élevée de ⁶⁸Ga à partir d'un cyclotron, l'étude des traceurs de l'inflammation qui utilise le ⁶⁸Ga a démontré beaucoup de potentiel. Dans cette étude, nous présentons la synthèse de 4HMSA, un nouveau chélateur sidérophore acyclique et son utilisation comme nouvel agent d'imagerie de l'inflammation par tomographie par émission de positrons (TEP) en le comparant avec le [⁶⁸Ga]Ga-citrate. Les résultats ont permis de conclure que le [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA est une alternative intéressante au [⁶⁸Ga]Ga-citrate pour l'imagerie de l'inflammation étant donné qu'il offre des avantages supplémentaires en termes de dosimétrie qui est plus faible et ratio signal ciblé sur bruit plus élevé

[⁶⁸Ga]Ga-4HMSA a promising new PET tracer for imaging inflammation

Shigufa Kahn Ali^{1†}, Samia Ait-Mohand^{1†}, Véronique Dumulon-Perreault², Brigitte Guérin^{1,2*}

¹Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada.

²Sherbrooke Molecular Imaging Center (CIMS), CRCHUS, 3001, 12e Avenue Nord, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada.

†S.K.A. and S.A.-M. contributed equally

*Corresponding author:

Brigitte Guérin, Ph.D.

Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke (CIMS),

Department of Nuclear Medicine & Radiobiology

Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke

3001, 12th Avenue North

Sherbrooke, QC, Canada, J1H 5N4

Phone: (819) 820-6868 ext. 15285

Fax: (819) 829-3238

E-mail: Brigitte.Guerin2@USherbrooke.ca

ABSTRACT

Background. Imaging diagnosis of inflammation has been challenging for many years. Inflammation imaging agents commonly used in nuclear medicine, such as [^{67}Ga]Ga-citrate and 2-deoxy-2- [^{18}F]fluoro-D-glucose ([^{18}F]FDG) showed some limitations. Identification of a radiotracer with high specificity and low radiation dose is clinically important. With the commercialization of $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generators and the high ^{68}Ga cyclotron production capacity, the study of ^{68}Ga -based tracer for inflammation has increased and shown good potential. In the present work, we report the synthesis of 4HMSA, a new acyclic siderophore-like chelator, and its first investigation for ^{68}Ga complexation and as a new positron emission tomography (PET) imaging agent of inflammation in comparison to [^{68}Ga]Ga-citrate. **Results.** The present experimental studies show that the novel [^{68}Ga]Ga-4HMSA is stable allowing imaging of inflammation in a preclinical model of adjuvant- and pathogen-based inflammation involving intraplantar injection of complete Freund's adjuvant (CFA). We found that [^{68}Ga]Ga-4HMSA displayed similar uptake in the inflamed paw than [^{68}Ga]Ga-citrate, which are superior compared to those of contralateral (non-injected) paws at days 1-3 from PET imaging. [^{68}Ga]Ga-citrate accumulated in the upper body of the animal such as the liver, lungs and the heart, whereas the [^{68}Ga]Ga-4HMSA revealed low uptakes in the majority of the organs and was cleared relatively rapidly from blood circulation through the kidneys and bladder. **Conclusion.** The results highlight the potential of [^{68}Ga]Ga-HMSA as an interesting alternative to [^{68}Ga]Ga-citrate for inflammation imaging by PET. [^{68}Ga]Ga-HMSA offers additional advantages than [^{68}Ga]Ga-citrate in term of dosimetry and lower overall background activity.

Key Words: [^{68}Ga]Ga-4HMSA; Siderophore; Radiotracer; Positron emission tomography (PET); Inflammation; PET imaging

BACKGROUND

Inflammation plays a significant role in wide range of disease processes. The identification and the localization of inflammation is critical for the adequate treatment of patients. Consequently, the development of more sensitive radiotracer for molecular imaging of inflammation by positron emission tomography (PET) may provide new insights into the detection and the treatment at early stage disease (1). Although many radiopharmaceuticals including 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose ([¹⁸F]FDG) have received considerable attention in the field of inflammation imaging, no new candidate emerged as a promising agent. Over the past years, the development of ⁶⁸Ga-based tracers has increased considerably (2) and few of them have shown promising results in infection and inflammation imaging (3-6).

[⁶⁷Ga]Ga-citrate, the SPECT predecessor of [⁶⁸Ga]Ga-citrate was a prime radiotracer for imaging inflammation and infection of musculoskeletal origin (3) for over 40 years but several shortcomings limit its clinical application including poor image quality and resolution as well as its high energy gamma rays delaying imaging of up to 72 h. In contrast, the PET counterpart [⁶⁸Ga]Ga-citrate has a shorter physical half-life ($T_{1/2} = 67,71$ min) and improved imaging options such as shorter injection-to-imaging time, improved dosimetry, improved spatial resolution in terms of image quality (7). Another group of molecules that showed promising results for imaging infection and inflammation are ⁶⁸Ga-labeled siderophores (8-10). Siderophores are low molecular mass chelators with a very high affinity for ferric ions (Fe^{3+}) and are produced by almost all microorganisms (11). The similarity in coordination chemistry between Fe^{3+} and Ga^{3+} suggests the use of siderophore-like chelators for gallium radionuclides. Indeed, various siderophores can be labeled with ⁶⁸Ga and became a great interest for molecular imaging of inflammation using PET (11-14). With the

commercialization of $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generators and the high ^{68}Ga cyclotron production capacity (15-17), the study of ^{68}Ga -based tracer for inflammation has increased and shown good potential.

In our previous work, we reported the synthesis of *N*-methylhydroxamate derived from tetraaza- and triazamacrocycles, named DOTH₂A₂ and NOTHA₂ (18). **The promising results obtained with this new class of chelators** led us to become interested in whether spermine, a natural tetraamine, could be advantageously used as a template for preparing an acyclic **siderophore-like** chelator with four *N*-hydroxy-*N*-methyl succinamide pendant arms. Effectively, the new acyclic chelator named 4HMS allowed fast and highly selective labeling with ^{89}Zr revealing excellent imaging properties using PET compared to [^{89}Zr]Zr-DFO analogue (19). Therefore, we aimed to develop a bifunctional variant of the 4HMS for further evaluation and application in inflammation-based PET imaging. This new bifunctional chelator called 4HMSA is functionalized with a carboxylic acid group at one of the terminal amine in order to improve its solubility at physiologic pH (Figure 1).

In this present study, we present the synthesis of 4HMSA as well as the detailed chemical and radiochemical investigations as a [^{68}Ga]Ga-4HMSA PET tracer. In order to investigate the full potential of 4HMSA, we studied the radiolabeling performance under various chelator concentration and pH conditions in presence of [^{68}Ga]GaCl₃. The complexation properties and stability of the [^{68}Ga]Ga-4HMSA complex were examined and compared to that of [^{68}Ga]Ga-NOTA and [^{68}Ga]Ga-DOTA, which are the most widely applied chelating system for radiolabeling of biomolecules with ^{68}Ga . Apparent molar activity (AMA) was calculated and metal competition, transchelation with DTPA, Apo-transferrin and protein binding studies were also investigated. We validated [^{68}Ga]Ga-4HMSA complex as a new

inflammation PET tracer and compared it to [⁶⁸Ga]Ga-citrate in a preclinical model of adjuvant- and pathogen-based inflammation involving intraplantar injection of complete Freund's adjuvant (CFA). The aim of this study is to demonstrate that [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA is as effective as [⁶⁸Ga]Ga-citrate for PET imaging of inflammation while having a better specificity, pharmacokinetic and a lower dosimetry.

METHODS

General. ⁶⁸Ga was obtained from a commercially available generator system (Eckert & Ziegler Isotope Products Inc.), eluted and purified according to manufacturer's instructions. All starting compounds and reagents were used as obtained without further purification. Dry solvents were obtained commercially and used only where indicated. Diluted HCl for elution of ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator was prepared from HCl (trace metal) and water (Ultrapur®). Water (Ultrapur®) was also used for all radiochemical works, including the preparation of solutions of precursors and buffers. Hydrochloric acid (99.999%), Apo-transferrin (≥98.0%), DTPA (≥99%), were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Acetonitrile (HPLC grade, 99.9%) and High-purity water (Optima LC/MS, ultra-high-performance liquid chromatography ultraviolet grade, 0.03 mm filtered) were purchased from Fisher Scientific (Ottawa, ON, CA). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded in deuterated solvents on a Bruker Ascend 400 NMR instrument. The residual solvent peaks have been used as internal references. The peak multiplicities are described as follows: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), quin (quintet), m (multiplet), and br (broad). High-resolution mass spectrum (HRMS) was recorded on a Triple TOF 5600, ABSciex mass spectrometer. Analytical HPLC was performed on an Agilent 1200 system (Agilent Technologies, Mississauga, Ontario, Canada) equipped with a Zorbax Eclipse XDB C18 reversed-phase column (4.6 × 250 mm,

5 μ) and Agilent 1200 series diode array UV-vis (Agilent Technologies) using a linear gradient of 0–76% acetonitrile (TFA: 0.025%) in H₂O (TFA: 0.05%) over 23 min, 76–100% acetonitrile in water over 1 min, and 100–0% acetonitrile in water over 6 min with a flow rate of 1 mL/min. UPLC chromatograms were obtained from Waters UPLC H-Class equipped with an ELSD detector and a γ -counter from Eckert-Zeigler (Washington D.C. U.S.A.). The column used was a Waters BEH C18 column (2.1 x 50 mm) 1.7 μ m and eluent was a gradient of CH₃CN (0.05% AcOH)/H₂O (0.05% AcOH). Alburex-25 (Human plasma, USP) was supplied by Grifols Canada Ltd. (formerly Talecris), CSL Behring. Instant thin-layer chromatography paper (ITLC-SA) was acquired from Agilent Technology (Santa Clara, CA). All glassware was cleaned with chromic sulfuric acid (Fisher Scientific). The radio-TLC plates were scanned using an Instant Imager scanner (Bioscan, DC, U.S.A.). Radioactivity measurements were performed in an ionization chamber (CRC-25PET; Capintec) on the ⁶⁸Ga setting to control process efficiency. The labeling efficiency of [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA, [⁶⁸Ga]Ga-NOTA and [⁶⁸Ga]Ga-DOTA was assessed using ITLC-SG with 0.1M sodium citrate (pH=5) as eluant.

Preparation of [⁶⁸Ga]Ga-citrate

The ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator was eluted with 0.1 M HCl and the radioactivity was transferred to a cation exchange cartridge (CUBCX123). The cartridge was rinsed with 5 mL of physiological saline to remove potential ⁶⁸Ge residues. ⁶⁸Ga was eluted from the cartridge with 2 mL of sodium citrate solution (68 mM, pH 5.5). and then diluted with the 3 mL of saline solution in the product vial. The radiochemical purity of [⁶⁸Ga]Ga-citrate solution was evaluated in two solvent mixtures and two stationary phases (ITLC and Whatman paper n^o2 and compared with the retention time of the [⁶⁸Ga]GaCl₃.

Preparation of TriBoc spermine 3

The tri-Boc-protected spermine was **prepared** in a slightly **modified form of the procedure** described in the literature (20). Spermine (4.0 g, 20 mmol) was dissolved in 30 mL of CH₂Cl₂ at 0 °C. Ethyl trifluoroacetate (2.4 mL, 20 mmol) in 5 mL of CH₂Cl₂ was added dropwise and the mixture was then left stirring for 1 h at room temperature. After evaporation of the solvent, the crude residue was taken up in 60 mL of THF and NEt₃ (14.0 mL, 60 mmol) was added. A solution of (Boc)₂O (17.5 g, 60 mmol) in 20 mL of THF was added and the mixture was stirred for 3 h. After evaporation of the solvent, the residue obtained was taken up with 100 mL of 8/2 MeOH/H₂O mixture and Cs₂CO₃ (20.0 g, 62 mmol) was added and the whole mixture was heated to reflux for 3 h. The solvents were evaporated, and the residue treated with diisopropylether and aqueous solution HCl (0.5 N). The oily insoluble organic material in both aqueous and organic solvents was decanted from a three-layer system. After drying, the compound was obtained as a pale-yellow oil. The product **3** was used without further purification. Yellow oil. (50%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.33 (s, 27H), 1.38-1.34 (m, 4H), 1.55-1.52 (m, 2H), 1.84-1.75 (m, 2H), 2.81 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 3.00-2.96 (m, 2H), 3.18-3.07 (m, 6H), 3.28-3.25 (m, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 156.0, 99.7, 28.6, 28.21, 25.5.

Preparation of Benzyl N7, N12, N16 -tri(ter-butoxycarbonyl)-3,7,12,16

tetraazahexadecanoate 4 (21)

A solution of tri-Boc-spermine (6.0 g, 10 mmol), benzyl bromoacetate (1.9 mL, 12 mmol) and TEA (2.6 mL, 16.7 mmol) in THF (120 mL) was stirred at room temperature overnight. The precipitate was filtered off and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel chromatography (100% diethylether, then 10%

MeOH in CH₂Cl₂) to give **4** (5.3 g, 72%) as a pale yellow coloured viscous liquid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.44-1.48 (m, 31H), 1.64-1.73 (m, 4H), 2.72 (t, *J*=7.0, 2H), 3.10-3.26 (m, 10H), 3.44 (s, 2H), 5.16 (s, 2H), 7.32-7.37 (m, 5H). MS (LC-ESI-MS) *m/z*: calcd, (650.84); found, 651.51 (*M* + 1).

Preparation of Benzyl (3-((4-((3-aminopropyl)amino)butyl)amino)propyl) 5

A solution of 4 M HCl in dioxane (50 mL) was added to a stirring solution of **4** (3.0 g, 4.6 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL), under nitrogen, at 25 °C. After 2 h, the solution was concentrated in vacuo and co-evaporated with toluene (3 × 10 mL) to yield quantitatively compound **5** as a poly-HCl white salt. ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 1.62 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.15-1.95 (m, 4H), 3.12-2.90 (m, 12H), 3.95 (s, 2H), 5.12 (s, 2H), 7.22-7.37 (m, 5H). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ = 166.85, 134.51, 129.02, 128.89, 128.76, 128.62, 71.55, 70.71, 68.54, 60.27, 57.41, 47.42, 47.00, 44.52, 44.43, 43.21, 36.52, 23.72, 22.74, 22.49, 16.78. MS (LC-ESI-MS) *m/z*: calcd, (350.51); found, 351.29 (*M*+1).

Preparation of Benzyl 12,17,21-tris(4-((benzyloxy)(methyl)amino)-4-oxobutanoyl)-3-methyl-4,7-dioxo-1-phenyl-2-oxa-3,8,12,17,21-pentaazatricosan-23-oate 6

To a solution of **5** (0.5 g, 1.4 mmol) in DMF (5 mL) was added DIEA (1 mL, 5.7 mmol) and the mixture was left stirring for 1 hour at room temperature. *N*-methyl-*N* (benzyloxy) succinimide(**19**) (1.4 g, 5.7 mmol), DIEA (2 mL, 11.4 mmol) and HATU (2.2 g, 5.7 mmol) were stirred in dry DMF (10 mL) for 1 h. This solution was added at 0 °C to the first suspension and the reaction mixture was left stirring to room temperature for 24 h. The reaction mixture was washed with 10% NaHCO₃ solution, followed by water. The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄ and was then removed with a rotary evaporator. The crude product was purified by Biotage flash chromatography to yield to 83% of

protected 4HMSA **6** as a fluffy beige solid after solvent evaporation. Product purity was confirmed to be 100% by analytical reversed phase HPLC: retention time of 24.1 min. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.52–1.85 (m, 8H), 2.40–2.85 (m, 16H), 3.20–3.45 (m, 24H), 4.12–4.25 (m, 4H), 4.85–4.95 (m, 8H), 5.2 (M, 2H), 7.45–7.55(m, 24H), 8.50–7.50 (s broad, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): (mixture of rotamers), 174.12, 172.95, 172.93, 172.61, 172.57, 172.44, 172.39, 171.85, 169.44, 169.41, 169.32, 135.56, 135.52, 135.43, 135.11, 135.02, 134.61, 129.27, 129.08, 128.87, 128.68, 128.59, 128.56, 128.47, 128.45, 128.41, 128.38, 76.46, 67.45, 67.33, 66.94, 65.85, 50.83, 48.29, 47.52, 47.02, 46.70, 45.32, 45.19, 44.83, 43.51, 42.78, 42.60, 36.92, 36.21, 33.66, 30.58, 27.62, 27.50, 27.48, 27.35, 27.28, 27.24, 27.10, 27.04, 26.32, 26.17, 26.13, 26.09, 25.90, 25.73, 25.05, 25.00, 24.92. MS (LC-ESI-MS) m/z: calcd, (1227.5); found, 1228.6 (M + 1), 615.4 (M/2 + 1).

Preparation of 2-hydroxy-11,16,20-tris(4-(hydroxy(methyl)amino)-4-oxobutanoyl)-3,6-dioxo-2,7,11,16,20-pentaazadocosan-22-oic acid 7

A solution of protected 4HMSA **6** and 10% Pd/C (20% w/w) was suspended in methanol. The reaction mixture was purged with hydrogen gas at room temperature overnight. The crude was filtered and washed with methanol. The solvent was evaporated co-evaporated with diethyether to give quantitatively 4HMSA **7** as a white solid. The compound is very hygroscopic and must be kept under nitrogen at -20 °C. The HPLC chromatogram revealed a mixture of three conformational isomers or conformers in variable compositions. Product purity was confirmed to be 100% with a retention time of 11.0 min. ¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 1.42–1.75 (m, 8H), 2.35–2.75 (m, 18H), 2.85–3.38 (m, 24H), 3.85 (m, 1H), 4.17 (m, 1H) 7.71–7.92 (m, 1H), 9.80 (s broad, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO): (mixture of rotamers), 172.85, 172.73, 172.67, 172.01, 171.90, 171.89, 171.85, 171.59, 171.48, 171.43,

171.38, 49.06, 47.86, 45.18, 45.16, 44.86, 44.85, 37.84, 36.81, 36.60, 36.26, 36.18, 30.21, 30.26, 29.03, 29.02, 28.09, 28.07, 27.78, 27.71, 27.52, 27.48, 27.44, 27.26, 27.22, 27.19, 27.10, 27.06, 26.28, 25.21, 25.19, 25.11. MS (LC-ESI-MS) **m/z**: calcd, (777.8); found, 778.4 (M + 1), 390.0 (M/2 + 1).

Radiolabeling of 4HMSA

^{68}Ga was eluted from a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator using 0.1N HCl. The ^{68}Ga elution was pre-purified and concentrated on a CUBCX123 column. The purified $^{68}\text{Ga}^{3+}$ was obtained by eluting the column with a mixture of 12.5 μL of 5.5 M HCl and 500 μL of 5 M NaCl. To this eluate was slowly added a solution of 100-150 μL ammonium acetate buffer 1 M, pH = 4.5 and mixed by brief shaking, resulting in a pH ranging from 3.5-3.8. Varying amounts (0.03-10 nmol) of 4HMSA dissolved in water were mixed with 37-40 MBq of neutralized $^{68}\text{Ga}[\text{GaCl}_3]$ as described above. The labeling mixtures were allowed to react for 5-10 min at room temperature. The radiolabeling yield for $^{68}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-4HMSA}$ was confirmed by radio-TLC using 0.1 M sodium citrate (pH=5) as a mobile phase. In this system, free ^{68}Ga eluted with the solvent front while $^{68}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-4HMSA}$ complex remained at the origin.

Determination of apparent molar activity (AMA)

AMA (GBq/ μmol) of $^{68}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-4HMSA}$ was calculated in triplicate via titration of the chelator with purified $^{68}\text{Ga}[\text{GaCl}_3]$. Solutions of 4HMSA (150 μL in 4 mL polypropylene tube) at different concentrations ($1\text{--}12 \times 10^{-2}$ nmol) were prepared via serial dilution. $^{68}\text{Ga}[\text{GaCl}_3]$ solution was adjusted to a final pH of 3.5–3.8 with NH_4OAc buffer (1 M pH = 4.5) and added (22 μL , ~ 15 MBq) to each tube to give a total volume of 250 μL . In addition, a blank tube with ~ 15 MBq of $^{68}\text{Ga}[\text{GaCl}_3]$ in 250 μL of water was prepared. After mixing and incubation for 10 min at RT, the AMA was determined by measuring $^{68}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-4HMSA}$

labeling efficiency in each tube by TLC using 0.1 M sodium citrate (pH=5) as mobile phase. TLC plates were analyzed using a radio-TLC scanner. The percentages of complexation were plotted in function of amount of chelator (nmol) and the AMA was determined when >95% complexation was realized.

Comparative ⁶⁸Ga labeling of 4HMSA, DOTA, and NOTA

Concentration effect. A series of reactions was undertaken in which a solution of [⁶⁸Ga]GaCl₃ (approx. 25 MBq) was added to a solution of each chelator at a concentration in the range of 1 mM to 100 nM. The final pH of the reaction solution was 3.5-3.8 (using NH₄OAc buffer 1 M pH = 4.5). A side-by-side comparison was made of the ⁶⁸Ga-chelating efficiency of 4HMSA with NOTA and DOTA using instant thin layer chromatography (ITLC) at progressively lower chelator concentration. pH effect. A series of reactions was undertaken in which a solution of [⁶⁸Ga]GaCl₃ (approx. 25 MBq) was added to a solution of each chelator at 10 μM concentration. The final pH of the reaction solution was adjusted at 1-2, 2-3 and 3.5-3.8 using NH₄OAc buffer 1 M pH = 4.5. Labeling efficiency of [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA, [⁶⁸Ga]Ga-NOTA and [⁶⁸Ga]Ga-DOTA was measured at room temperature as a function of time.

Apo-transferrin challenge studies

Apo-transferrin (77 kDa) was diluted with 10 mM of sodium carbonate (pH 6.5–7) to reach a final concentration of 10 mg/mL. Apo-transferrin (10 equiv) (820 μL, ~1.3 × 10⁵ nM) was added to diluted [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA (820 μL, ~40 MBq). The solution was divided into four aliquots that were incubated at 37 °C for 30, 60 and 120 min. An aliquot was transferred to Amicon Ultra 0.5 mL 50 kDa filter (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and centrifuged at 7400G for 12 min. In this system, [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA has passed through the filter, while

Apo-transferrin and [⁶⁸Ga]Ga-apo-transferrin has remained on the filter. The radioactivity in each fraction was measured using a dose calibrator. The percentage of transchelation was then calculated. The study was performed in triplicate.

Transchelation studies using DTPA

4HMSA (100 µL, 100 µM) was labeled [⁶⁸Ga]GaCl₃ (15 MBq) at room temperature for 10 min and then incubated with 50 and 1000-fold excess of DTPA (200 µL of 5 and 50 mM), respectively, at a range of pH values (7.2) at 37 °C for a period of 80 min. To maintain the pH, 100 µL of sodium acetate buffer (0.5 M, pH ≈ 5.5) was added to the solutions. Each solution was prepared in triplicate, and the quality control was performed, as described above for different time points.

Transmetallation challenge studies

4HMSA (1 mL, 200 µM) were labeled with 100 MBq of neutralized [⁶⁸Ga]GaCl₃ diluted in 1 mL of water at room temperature for 10 min for a total volume of 2 mL. The chelator was then incubated with 10-fold excess of various metal salts at pH = 2.0 and 7.4. Each metal solution (200 µL) was added to 200 µL of [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA, and the solutions were incubated at 37 °C. To maintain the pH, sodium acetate buffer (0.1 M, pH ≈ 5.5) was added to the solutions. The samples were monitored for 60 min by radio-TLC to determine the percentage of the intact [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA. All the studies were done in triplicate.

Plasma stability studies

Plasma stability studies were realized as previously described by our group (18). Briefly, the study was carried out by incubating [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA (60 MBq in 200 µL PBS buffer) in 200 µL of human plasma and the solution was incubated at 37 °C for up to 2 h. The plasma

was then mixed twice with (1:1) acetonitrile to precipitate all the proteins. The samples were subjected to vortex mixing for 1 min and then centrifugation for 15 min at 6600 rpm. Plasma proteins were separated from the soluble component by ultracentrifugation and the radioactivity was counted. The supernatant fraction was assayed by radio-iTLC on C18 plates; free [^{68}Ga]GaCl₃ and [^{68}Ga]Ga-4HMSA were used as standards. The radio-TLCs were eluted with 0.1 M sodium citrate buffer at pH 5.5 using an Instant Imager system (Bioscan, DC, U.S.A.) for the radiodetection.

Protein binding in rodent plasma

[^{68}Ga]Ga-4HMSA (5 nmol / 250MBq) was incubated in fresh rat plasma (250 μl) and in PBS (250 μl) (control) at 37 °C for various time points (15, 30, 45, 60, and 120 min). The plasma was then mixed twice with (1:1) acetonitrile to precipitate all the proteins. The samples were subjected to vortex mixing for 1 min and then centrifugation for 15 min at 6600 rpm. Plasma proteins were separated from the soluble component by ultracentrifugation and the radioactivity was counted.

Animal studies

Animal experiments were performed in adult female BALB/c mice (Charles River Laboratories, Saint-Constant, QC, Canada). The animals were maintained in animal facility, under specific pathogen-free conditions. Housing and all procedures involving animals were performed according to the protocol approved by the Université de Sherbrooke Animal Care and Use Committee (protocol number: 413-16R).

Induction of inflammation

Mice were injected subcutaneously in the left footpad with 10 μ L of complete Freud adjuvant (CFA) solution (0.5 mg/mL), which contains components of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). The solution was made with a water-in-oil emulsion using the heat-killed mycobacteria in mineral oil with saline in a ratio of 1:1. The inflammation was studied from 1, 2, 3- and 7-days post-CFA administration.

PET Imaging studies

The animals were anaesthetized by inhalation of isoflurane (induction 2-2.5 %, maintained 1-1.5% oxygen flow 1-1.5 L/min) during *i.v.* injection and PET imaging procedures. A catheter was installed in the caudal vein for the administration of the radiotracer. The mouse was positioned in the field of view of the PET/CT scanner (Triumph/LabPET8™ platform (Gamma Medica, Northridge, CA), and a 45 min dynamic acquisition was acquired in the list mode followed immediately by the administration of either [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA or [⁶⁸Ga]Ga-citrate (~9 MBq, 0.2 mL). The dynamic acquisition was followed by 15 min CT scan. Static PET/CT images were acquired between 45 and 60 min after injection of [⁶⁸Ga]Ga-citrate for these mice groups: 2, 3- and 7-days post-inflammation. The images were reconstructed using the three-dimensional maximum likelihood estimation method algorithm, and analysis was performed using AMIDE software (22). To quantify the radiotracer uptake, regions of interest (ROIs) were drawn around organs. The ROI activity was expressed as percent injected dose per gram of tissue (% ID/g).

Biodistribution studies

Under isoflurane anesthesia (induction 2-2.5 %, maintained 1-1.5% oxygen flow 1-1.5L/min) the mice were injected via the caudal vein with either [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA or [⁶⁸Ga]Ga-citrate (~9 MBq, 0.2 mL). At 60 min post injection, the mice were euthanized by CO₂ inhalation under isoflurane anesthesia and the organs of interest were collected, washed with PBS, blotted dry, weighted, and counted in a γ -counter (HIDEX AMG, Gamble Technologies Limited, Mississauga, Canada). The results were expressed in terms of percentage of injected dose per gram (% ID/g).

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using Prism 7.03 for Window (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA, USA). All results are reported as mean \pm SD. The number of animals ranged from 2-8. Differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$ (paired *t*-test).

RESULTS

[⁶⁸Ga]Ga-citrate solution was prepared as described by Aghanejad *et al.* (23). For the quality control of [⁶⁸Ga]Ga-citrate, the best eluant system was considered a mixture of sodium acetate/ acetic acid/H₂O in both ITLC and Whatman paper n° 2 in the stationary phase. Under these conditions, the R_f of [⁶⁸Ga]Ga-citrate was 0 compared to 0.9 for [⁶⁸Ga]GaCl₃.

In order to achieve the synthesis of 4HMSA (compound 7, Scheme 1) in high yield, we adopted a strategy inspired by the synthesis of *p*-SCN-Bn-HOPO (20) starting from a spermine core and *N*-methyl-*N* (benzyloxy) succinimide previously described (19). The synthesis consists in selective protection on one of the primary amines of spermine with a

trifluoro-acetyl moiety. The ratio of primary amine toward the protecting reagent, ethyl trifluoroacetate is critical in order to afford the mono-trifluoroacetamide **1**. In one pot, the resulting free amines of **1** were protected with (Boc)₂O to give the fully protected spermine **2**. Then, selective deprotection of the trifluoroacetamide was performed in the presence of an excess of cesium carbonate (Cs₂CO₃) in a mixture of methanol and water to give after purification by flash chromatography the triBoc spermine **3** in 70% overall yield. This tri-protected polyamine was converted to its benzylglycine derivative **4** by reaction with one equivalent of benzyl bromoacetate followed by deprotection with HCl 4M in dioxane to yield compound **5** quantitatively as a hydrochloride salt. This compound was used as the building block for the synthesis of 4HMSA. After optimization, the best condition for incorporation of the *N*-methyl-*N* (benzyloxy) succinimide spacer previously described (19) was the coupling with HATU in DMF. It is worth to mention that the activated intermediate was added to **5** at 0 °C and then warmed to room temperature and stirred for 24 h to afford 83% of the protected 4HMSA as a white solid. The last step was a catalytic hydrogenation over Pd/C affording the new chelator 4HMSA **7** in a quantitative yield. The compound **7** was characterized by NMR, IR, and MS. The high degree of flexibility of 4HMSA **7** resulted in a ¹³C NMR with many overlapping multiplets due to different conformers of the ligand. These conformers were identified as conformers and not impurities based on their identification of the expected compound by mass spectrometry.

A radiochemical yield (RCY) of 98–100% was achieved following the incubation 2 to 3 nmol of 4HMSA in presence of the purified [⁶⁸Ga]GaCl₃ (Figure 2). AMA of [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA was calculated by performing a titration experiment with 4HMSA and [⁶⁸Ga]GaCl₃ to give 300 ± 7 GBq/μmol (Figure 3), which was approximately 8-fold higher than the value

calculated for [^{68}Ga]Ga-DOTA ($34 \pm 0.18 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$) (15). We then attempted a comparative ^{68}Ga complexation study between 4HMSA, NOTA and DOTA, the last two being used as current “gold standard” bifunctional ^{68}Ga -chelator. Here we report the effect of the chelator concentration and the pH on the kinetic of complexation. Whilst many chelators can chelate [^{68}Ga]GaCl₃ quantitatively at high concentration, only the most efficient will continue to do so when chelator concentrations decrease. High RCY of [^{68}Ga]Ga-4HMSA of 98–100% was achieved for the chelator at a concentration of 10 μM after 5 min at room temperature (Figure 4), while the full complexation of [^{68}Ga]Ga-NOTA and [^{68}Ga]Ga-DOTA was achieved at chelator concentration of 1 mM after 15 min at room temperature and 30 min at 80 °C respectively. These interesting data demonstrated the superior labeling efficiency of 4HMSA comparing to NOTA and DOTA.

Labeling efficiency of [^{68}Ga]Ga-4HMSA, [^{68}Ga]Ga-NOTA and [^{68}Ga]Ga-4HMSA was measured at room temperature as a function of time and at different pH. The ^{68}Ga radiolabeling was found to be dependent of pH variation with DOTA and NOTA but there was no remarkable difference between studies undertaken at different pH with 4HMSA. A quantitative yield was observed only a few min after (5 min) incubation even at lower pH of 1-2 (Figure 5). Low RCY was observed under the same conditions for DOTA and NOTA. The results indicated also that the optimal pH for radiolabeling was within a range of 3.5-3.8 for the three chelators. Under all conditions, 4HMSA “competed” most effectively for $^{68}\text{Ga}^{3+}$ in comparison with the other chelators.

[^{68}Ga]Ga-4HMSA complex should be sufficiently stable over the period of time required for imaging ($\sim 1 \text{ h}$) to resist to transchelation by competing endogenous proteins, such as Apo-transferrin, and other ligands that compete for Ga^{3+} *in vivo*. Transchelation of [^{68}Ga]Ga-

4HMSA by transferrin would result in a loss of specificity and an accumulation of ^{68}Ga in the liver, lungs and bone. To provide a significant test of resistance to transchelation, [^{68}Ga]Ga-4HMSA was incubated with an excess of Apo-transferrin for 2 h at room temperature and is reasonably stable to transferrin, with less than 10% of ^{68}Ga being lost (Table 1).

^{68}Ga -4HMSA was incubated with 50 to 1000 fold excess of EDTA in PBS (pH 7,2) at 37 °C and analyzed at 15, 30 and 80 min of incubation in order to examine its susceptibility to transchelation (Table 2). Each aliquot was analyzed by ITLC using aqueous 0.1 M sodium citrate as eluant. [^{68}Ga]Ga-4HMSA has shown a remarkable resistance to transchelation, remaining >99% intact over the time until 300 fold-excess of DTPA. In contrast, the release of ^{68}Ga from [^{68}Ga]Ga-4HMSA was observed for higher concentration (>500 fold-excess).

A metal competition study was performed with [^{68}Ga]Ga-4HMSA to see if other metal cations could outcompete ^{68}Ga for the 4HMSA binding pocket. 4HMSA was labeled with ^{68}Ga and then incubated with a 10-fold excess of various metal salts at pH 2 and 7.4 at 37 °C (Table 3). The samples were monitored for 60 min by radio-TLC to determine the percentage of intact ^{68}Ga complex. [^{68}Ga]Ga-4HMSA proved to be stable (>95% intact) when challenged with the majority of competing metals with the notable exception of Fe^{3+} . In this case, after 30 min of incubation, [^{68}Ga]Ga-4HMSA released ~30% and 14% of the ^{68}Ga at pH 2 and 7.4 respectively. After 1 h, the transmetalation increased to 65% and 28% at pH 2 and 7.4 respectively indication that the ^{68}Ga -complex is more stable at physiological pH. Since 4HMSA has been originally designed to be a siderophore, its high affinity for iron is unsurprising.

The stability of [^{68}Ga]Ga-4HMS was extensively challenged in human plasma proteins, in the presence of excess of Apo-transferrin, DTPA and biologically relevant metal ions.

Plasma stability studies were carried out to evaluate the *in vitro* and *in vivo* stability of [^{68}Ga]Ga-4HMSA. In fact, this tracer exhibited high stability after 2 h incubation in human serum at 37 °C (Figure 6A). To further test the stability of [^{68}Ga]Ga-4HMSA *in vivo* metabolism in rodent were performed. At 60 min post-injection of [^{68}Ga]Ga-4HMSA, less than 1% dissociated ^{68}Ga ions was observed in blood (Figure 6B), suggesting substantial *in vivo* inertness. Protein binding studies performed by incubating [^{68}Ga]Ga-4HMSA in fresh rodent plasma showed that the ability of [^{68}Ga]Ga-4HMSA to bind to plasma proteins is very low since the values did not exceed 11 % even after 2 h.

In vivo uptake of both [^{68}Ga]Ga-4HMSA and [^{68}Ga]Ga-citrate was studied in a CFA mice model that induces, within days, a strong and long-lasting inflammatory reaction (24). In mice, the footpad is an injection site well-recognized for its effectiveness in terms of producing a strong immune response (25). Cytokines induced in the early phases following exposure to CFA are TNF- α , IL-12, IL-6, IFN- γ and several chemokines. Inflammation was studied from day 1 to day 7 post-injection.

PET/CT images of mice injected with CFA displayed an accumulation of both tracers at the site of inflammation in the paw (Figure 7). Comparison of the two sets of figures clearly shows that uptakes in healthy organs are significantly reduced for [^{68}Ga]Ga-4HMSA that was cleared relatively rapidly from blood circulation to the kidneys and bladder. By contrast, there is an accumulation of [^{68}Ga]Ga-citrate in the upper body of the animal, such as the liver, lungs and the heart (Figure 7B).

To quantify the radiotracer uptake in the inflamed paw, regions of interest (ROI) were drawn in the inflamed paw using the AMIDE software (22), the contralateral (non-injected) paw was used as a control. These ROI were then applied to all frames to obtain time activity curves (TAC) at the inflamed and normal paws. The ROI activity was expressed as percent injected dose per gram of tissue (%ID/g). It is worth noting that [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA activity grows rapidly in the inflamed paw to reach a maximum at 15 min and drops asymptotically to less than 10% of the maximum after 45 min, while that in the non-injected paw is low (Figure 8). This is in contrast to [⁶⁸Ga]Ga-citrate activity, which grows steadily in the inflamed paw with the maximum value at 45 min, without significant apparent accumulation in the contralateral control paw. For the comparative studies, we selected the %DI/g value in the inflamed paws at the optimal uptake times for the [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA and [⁶⁸Ga]Ga-citrate, which are at 15 min and 45 min respectively.

[⁶⁸Ga]Ga-4HMSA showed an uptake in the inflamed paw that was optimal at day 1 ($2,13 \pm 0,61$), which then slowly decreased over time to reach $1,77 \pm 0,61$; $1,07 \pm 0,26$ and $1,49 \pm 0,54$ %DI/g for days 2, 3 and 7 respectively (Table 5). These results are in accordance with the degree of inflammation in the foot pad following a subcutaneous injection of complete Freund's adjuvant, which induces a prolonged swelling that becomes maximal at 24 h and persists for at least 7 days (24). When we compare the %DI/g value in the inflamed paws at their optimal uptake times, both radiotracers showed uptakes very similar over time. The activities found in the contralateral (non-injected) paws were statistically inferior to that of inflamed paws at days 1-3 for both [⁶⁸Ga]Ga-4HMS and [⁶⁸Ga]Ga-citrate (Table 5).

Biodistribution studies were performed in CFA-injected mice with either [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA or [⁶⁸Ga]Ga-citrate. The animals were euthanized at 1, 2, 3, and 7 days post inflammation

and 1h post radiotracer injection. Blood and various organs were removed to measure tissue-specific activity. For [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA the radioactivity was mostly concentrated in kidneys (5.26 ± 0.86 , 11.94 ± 5.40 , $16.06 \pm 7.65\%$ and 12.86 ± 4.96 ID/g) at days 1, 2, 3 and 7 respectively) indicating renal elimination. At day 3 post-inflammation, higher retention of radioactivity was seen for [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA in almost all organs, blood and plasma as compared to days 1, 2 and 7 (Figure 9). By contrast, accumulations of the [⁶⁸Ga]Ga-citrate in various organs remained the same at different time point post-inflammation. Overall, the biodistribution profile of [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA in mice revealed lower uptake in the majority of the organs compared to [⁶⁸Ga]Ga-citrate (Figure 9). The higher retention of radioactivity in the lungs, the heart and in the bones saw on PET images of [⁶⁸Ga]Ga-citrate was consistent with the results of PET imaging and the literature (26).

The activities in the inflamed paws were statistically superior to that of the contralateral paws at days 1 to 3 for both [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA and at all time points for [⁶⁸Ga]Ga-citrate following biodistribution (Table 5). Surprisingly, the inflamed paw uptake values obtained from biodistribution for [⁶⁸Ga]Ga-citrate (15.81 ± 6.33 , 7.37 ± 1.21 , 9.73 ± 1.59 and 9.33 ± 2.38 for 1-, 2-, 3- and 7-days post-inflammation respectively) are higher than those of [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA (3.27 ± 0.58 , 2.13 ± 0.19 , 5.89 ± 2.52 and 5.24 ± 2.86 %DI/g at day 1, 2, 3 and 7 post-inflammation respectively (Figure 9) and the ones obtained both from PET imaging (Table 5). One should note that during the dissection of the paw, both the bone and the inflamed tissue were collected. A potential explanation for the discrepancy between biodistribution and imaging results could be explained by the high bone uptake that contributes to increase normal and inflamed paw uptakes obtained from biodistribution. It is worth noting that both

radiotracers gave very similar inflamed to normal paw ratios from biodistribution and PET imaging over time (Table 6).

DISCUSSION

With the commercialization of $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generators and the high ^{68}Ga cyclotron production capacity (15-17), the development of ^{68}Ga -based radiotracers has increased considerably in the last few years for PET imaging. Among the new radiotracers, ^{68}Ga -siderophores such as [^{68}Ga]Ga-TAFC and [^{68}Ga]Ga-FOX E showed high selectivity and sensitivity for *Aspergillus* infection imaging (9). The promising results obtained with the new class of chelators we developed (18) led us to design an acyclic siderophore-like chelator 4HMSA for ^{68}Ga complexation and imaging of inflammation by PET. [^{68}Ga]Ga-Citrate was chosen as a comparative radiotracer since it was successfully used as a control in the past for PET imaging in an inflammatory pain mouse model (27).

4HMSA was synthesized over seven steps with a high overall yield of 75%. This acyclic siderophore-like chelator offers a very fast labeling kinetic at room temperature under various pH (1.0-3.8) with excellent AMA that was 8 times higher compared to DOTA analog. [^{68}Ga]Ga-4HMSA demonstrated a remarkable resistance to transchelation and transmetalation by remaining almost unchanged when incubated with large excess of DTPA and biologically relevant metal ions except with Fe^{3+} (Tables 2 and 3). [^{68}Ga]Ga-4HMSA remained also intact when incubated 2 h in human plasma and 1 h in mouse (Figure 6) suggesting substantial *in vivo* and *in vitro* inertness, but not [^{68}Ga]Ga-citrate. Once injected, the [^{68}Ga]Ga-citrate is quickly dissociated releasing $^{68}\text{Ga}^{3+}$ into the bloodstream since citrate is a weak *in-vivo* chelator. Then, 99% of the $^{68}\text{Ga}^{3+}$ are bound to transferrin and other iron-binding proteins such as lactoferrin, ferritin and siderophore (28,29), which accumulate in

inflammatory lesions. [⁶⁸Ga]Ga-citrate in mice is slowly eliminated and has a high blood pool activity, which are in accordance with our results (Figure 9). The higher inflamed and normal paw uptake for [⁶⁸Ga]Ga-citrate obtained from biodistribution can be explained by the high bone uptake of this tracer. Even though the paw uptakes obtained from biodistribution for [⁶⁸Ga]Ga-citrate are higher than that of [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA (Figure 9), inflamed to normal paw ratios from biodistribution are similar over time for the two tracers (Table 6). Although not significant, the inflamed to normal paw ratios obtained from PET imaging are superior compared to those from biodistribution. A potential explanation is that the biodistributions were done 1 h post-injection and this is not the optimal time selected for [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA (15 min) and [⁶⁸Ga]Ga-citrate (45 min) from dynamic PET imaging studies.

The data obtained at day 3 after CFA inflammation show an increase in the uptake values of [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA at the majority of the organs, blood and plasma as compared to days 1, 2 and 7 (Figure 9). At this time, there is no clear explanation for the increased activity of [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA on various tissues at day 3. While the activity found in the inflamed paws did not increase at this time point, its % ID/g value is statistically superior to that of contralateral paw ($p \leq 0.01$) (Table 5).

Overall, the results strongly support the potential of [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA to target the inflammation region with a suitable pharmacokinetics for imaging, i.e. fast clearance from organs and circulation with renal excretion as the major route of elimination. Although the increased vessel permeability can be responsible of the higher amount of [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA at the site of inflammation, a very low percentage of this tracer (11%) bound to plasma protein and the mechanism of action of [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA might be slightly different from

that of [⁶⁸Ga]Ga-citrate. Indeed, at least three mechanisms have been proposed to explain the presence of ⁶⁷Ga to the site of infection: 1) leukocyte labeling, 2) lactoferrin binding and 3) direct bacterial uptake by high availability of ⁶⁷Ga at the site of infection that could be explained by an increase of vessel permeability (30).

One important element during infection is the acquisition of sufficient iron for the microorganisms. When they are deprived of iron, a vital nutrient needed for their growth, microorganisms will secrete siderophores into the environment, which bind free iron, and then re-enter the cell and release iron for storage (31). Siderophore have normally more affinity for iron than other iron-binding proteins.

An important defense strategy used against microbial pathogens consists in depriving pathogens of this essential nutrient (32). In response, the host will secrete siderocalins “siderophore-binding lipocalins” also known as lipocalin 2 (Lcn2) or neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL). They are expressed by macrophages, neutrophils and various epithelial cells and are up-regulated in response to infectious and inflammatory stimuli (33). It has been reported that siderocalin (or Lcn2) can sequester enterobactin-like siderophores excreted by bacteria and also different catecholate siderophores (33). However, Lcn2 is normally unable to sequester hydroxamate siderophores such as the well-known trihydroxamate called deferoxamine but can complex a mixed siderophore carboxymycobactin secreted by various pathogenic mycobacteria (e.g., *M. tuberculosis* found in the CFA preparation (34). The siderophore-like chelator 4HMSA is structurally different than deferoxamine and might be recognized by siderocalin (or Lcn2).

In CFA-induced chronic inflammatory pain model, siderocalin (or Lcn2) expression was strongly induced in the inflamed paws, peaking at 12 h after CFA injection and then

gradually dropping (35). [^{68}Ga]Ga-4HMSA uptakes in the inflamed paw follow the same trend. All these results opens a window for a potential molecular mechanism, which might contribute to explain the presence of [^{68}Ga]Ga-4HMSA at the site of inflammation. Possibly [^{68}Ga]Ga-4HMSA can be sequestered by circulating siderocalin (or Lcn2) that are upregulated following the inflammatory stimuli. Once bond to siderocalin (or Lcn2), [^{68}Ga]Ga-4HMSA can be transported in the inflamed paws.

In the transmetalation studies with [^{68}Ga]Ga-4HMSA, we have showed that Fe^{3+} competes with ^{68}Ga releasing free $^{68}\text{Ga}^{3+}$ in a pH-dependant process. As the large majority of [^{68}Ga]Ga-4HMSA is in a free form in the bloodstream, another possible mechanism is that once at the site of inflammation, [^{68}Ga]Ga-4HMSA might mimics the secreted siderophore by binding iron and releasing $^{68}\text{Ga}^3$ that can be directly transport in bacteria.

CONCLUSION

Our results confirm that both [^{68}Ga]Ga-4HMSA and [^{68}Ga]Ga-Citrate are comparable radiotracers for the detection of inflammation. As a novel inflammation imaging agent, [^{68}Ga]Ga-4HMSA showed high *in vitro* and *in vivo* stabilities, fast clearance from organs and circulation with renal excretion, which offer more advantages regarding the dosimetry and lower overall background activity. Further studies are warranted for a better understanding of the mechanism of action of this new PET tracer.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Mélanie Archambault and Jacques Rousseau for expert technical assistance and helpful suggestions. BG is a member of the CRCHUS funded by the Fonds de recherche du

Québec - Santé (FRQS) and holder of the Jeanne and J.-Louis Lévesque Chair in Radiobiology at Université de Sherbrooke.

Funding Statement

This work was financially supported by The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, RGPIN-2014-04354 and RGPIN-2019-05284)

ABBREVIATIONS

AMA: apparent molar activity; CFA: Complete Freund's adjuvant; CH₂Cl₂: dichloromethane; CT: computed tomography; DFO: desferrioxamine; %DI/G: percent injected dose per gram of tissue; DMSO: dimethyl sulfoxide; DOTA: 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid; DTPA: diethylenetriaminepentaacetic acid; EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; [¹⁸F]FDG: 2-desoxy-2-[¹⁸F]-fluoro-D-glucose; Fe: iron; FOXE: ferrioxamine E; ⁶⁷Ga: gallium 67; GaCl₃: gallium trichloride; γ: gamma; ⁶⁸Ge: germanium 68; HCl: hydrochloric acid; 4HMSA: N-hydroxy-Nmethyl succinamide-based chelator; HPLC: high performance liquid chromatography; IFN- γ: interferon gamma; IL: interleukin; IR: infrared; ITLC: instant thin layer chromatography; ITLC-SG: ITLC-silica gel; LC/MS: liquid chromatography/mass spectroscopy; Lcn2: lipocalin-2; MBq: megabecquerel; MeOH: methanol; MHz: Megahertz; NaCl: sodium chloride; NGAL: neutrophil gelatinase-associated lipocalin; NMR: nuclear magnetic resonance; NOTA: 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid; PET: positron emission tomography; RCY: radiochemical yield; ROI: region of interest; RF: retention factor; rpm: revolutions per minute; RT: retention time; SPECT: single-photon emission computed tomography; TAFC: triacetylfusarinine C; TAC: time activity curve; THF: tetrahydrofuran; TNF-α: tumor

necrosis factor alpha; TFA: trifluoroacetic acid; TLC: thin layer chromatography; UPLC: ultra-performance liquid chromatography; ⁸⁹Zr: zirconium-89.

REFERENCES

1. Roivainen A, Li X-G, Ohrndorf S, van der Laken CJ. In Vivo Imaging of Inflammation and Infection 2019. *Contrast Media Mol Imaging*. 2020; 2020:6824583.
2. Arnon-Sheleg E, Israel O, Keidar Z. PET/CT Imaging in Soft Tissue Infection and Inflammation—An Update. *Semin Nucl Med*. 2020; 50(1):35-49.
3. Velikyan I. Prospective of ⁶⁸Ga Radionuclide Contribution to the Development of Imaging Agents for Infection and Inflammation. *Contrast Media Mol Imaging*. 2018; 2018(1):1-24.
4. Vorster M, Alex M, van de Wiele C, Sathekge M. Gallium-68 PET: A Powerful Generator-based Alternative to Infection and Inflammation Imaging. *Semin Nucl Med*. 2016; 46(5):436-447.
5. Wu C, Li F, Niu G, Chen X. PET Imaging of Inflammation Biomarkers. *Theranostics*. 2013; 3(7):448-466.
6. Roivainen A, Jalkanen S, Nanni C. Gallium-Labelled Peptides for Imaging of Inflammation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2012; 39(SUPPL.1): 68-77.
7. Ujula T. Studies on ⁶⁸Ga-Based Agents for PET Imaging of Cancer and Inflammation. *Annales Universitatis Turkuensis*. 2011. <http://urn.fi/URN:ISBN:978-951-29-4498-9>. Accessed 21 dec 2021.
8. Xu T, Chen Y. Research Progress of [⁶⁸Ga]Citrate PET's Utility in Infection and Inflammation Imaging: a Review. *Mol Imaging Biol*. 2020; 22:22-3.
9. Petrik M, Zhai C, Haas H, Decristoforo C. Siderophores for Molecular Imaging Applications. *Clin Transl Imaging*. 2017; 5:15-27.

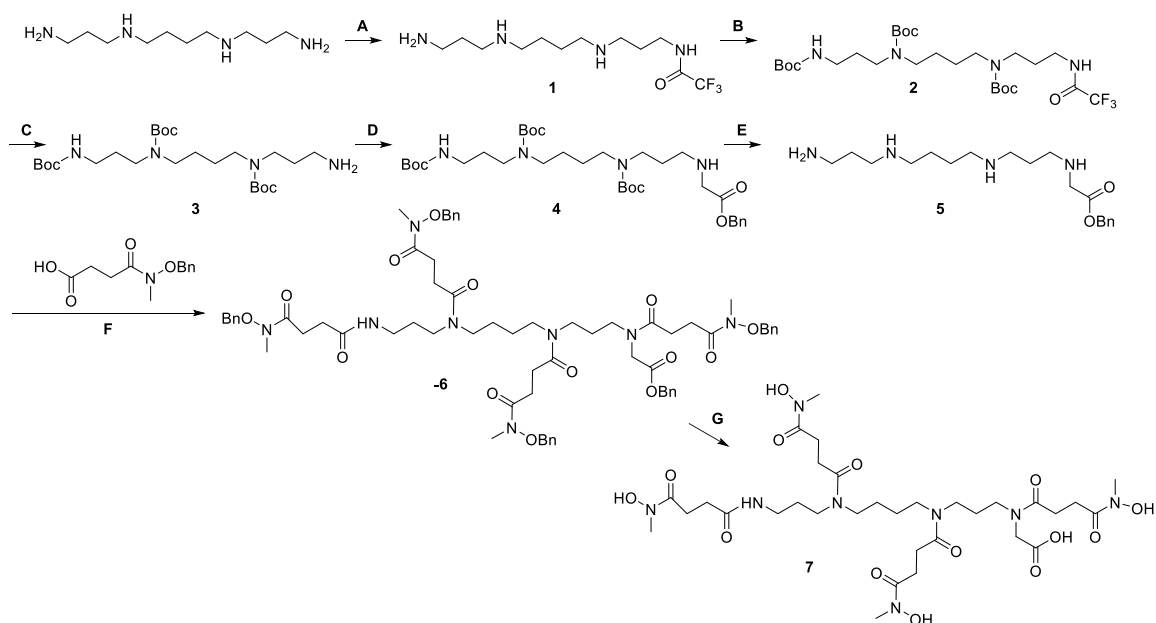
10. Pfister J, Summer D, Petrik M, Khoylou M, Lichius A, Kaeopookum P, Kochinke L, Orasch T, Haas H, Decristoforo C. Hybrid Imaging of *Aspergillus fumigatus* Pulmonary Infection with Fluorescent, ^{68}Ga -Labelled Siderophores. *Biomolecules*. 2020; 10(2):168.
11. Neilands JB. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *J. Biol. Chem.* 1995; 270(45):26723–26726.
12. Kaeopookum P, Petrik M, Summer D, Klinger M, Zhai C, Rangger C, Haubner R, Haas H, Hajduch M, Decristoforo C. Comparison of ^{68}Ga -Labeled RGD Mono- and Multimers Based on a Clickable Siderophore-Based Scaffold. *Nucl Med Biol*. 2019; 78-79:1-10.
13. Zhai C, Summer D, Rangger C, Haas H, Haubner R, Decristoforo C. Fusarinine C, a Novel Siderophore-Based Bifunctional Chelator for Radiolabeling with Gallium-68. *J Label Compd Radiopharm*. 2015; 58:209-214.
14. Kaeopookum P, Summer D, Pfister J, Orasch T, Lechner BE, Petrik M, Novy Z, Matuszczak B, Rangger C, Haas H, Decristoforo C. Modifying the Siderophore Triacetylfusarinine C for Molecular Imaging of Fungal Infection. *Mol Imaging Biol*. 2019; 21:1097-1106.
15. Alnahwi AH, Tremblay S, Ait-Mohand S, Dumulon-Perreault V, Beaudoin JF, Guérin B. Automated Radiosynthesis of ^{68}Ga for Large-Scale Routine Production using ^{68}Zn Pressed Target. *Appl Radiat Isot*. 2020, 156:109014.
16. Gregory L, Carlos JW, Lepera G. Production of Curie Quantities of ^{68}Ga with a Medical Cyclotron via the $^{68}\text{Zn}(p,n)^{68}\text{Ga}$ Reaction. *Appl Radiat Isot*. 2018, 133:1-3.
17. Thisgaard H, Kumlin J, Langkjær N, Chua J, Hook B, Jensen M, Kassaian A, Zeisler S, Borjian S, Cross M, Schaffer P, Dam JH. Multi-Curie Production of Gallium-68 on a Biomedical Cyclotron and Automated Radiolabelling of PSMA-11 and DOTATATE. *EJNMMI Radiopharm. Chem*. 2021; 6:1.

18. Ait-Mohand S, Denis C, Tremblay G, Paquette M, Guérin B. Development of Bifunctional Chelates Bearing Hydroxamate Arms for Highly Efficient ^{64}Cu Radiolabeling. *Org Lett.* 2014; 16,17:4512-4515.
19. Alnahwi AH, Ait-Mohand S, Dumulon-Perreault V, Dory YL, Guérin B. Promising Performance of 4HMS, a New Zirconium-89 Octadentate Chelator. *ACS Omega.* 2020; 5:10731-10739.
20. Deri MA, Ponnala S, Kozlowski P, Burton-Pye BP, Cicek HT, Hu C, Lewis JS, Francesconi LC. p-SCN-Bn-HOPO: A Superior Bifunctional Chelator for ^{89}Zr ImmunoPET. *Bioconjug Chem.* 2015; 26(12):2579-2591.
21. Far AR, Tanaka K, Dietrich E, Reddy R, Kang T. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics with improved solubility. *From PCT Int. Appl.*, 2011019839, 17 Feb 2011.2
22. Loening AM, Gambhir SS. AMIDE: a free software tool for multimodality image analysis. *Mol Imaging.* 2003; 2(3):131-137.
23. Aghanejad A, Jalilian AR, Ardaneh K, Bolourinovin F, Yousefnia H, Samani AB. Preparation and Quality Control of ^{68}Ga -Citrate for PET Applications. *Asia Oceania J Nucl Med Biol.* 2015; 3(2):99-106.
24. Fehrenbacher JC, Vasko MR, Duarte DB. Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant (CFA)-Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat. *Curr Protoc Pharmacol.* 2012; doi:10.1002/0471141755.ph0504s5.
25. Billiau A, Matthys P. Modes of Action of Freund's Adjuvants in Experimental Models of Autoimmune Diseases. *J Leukoc Biol.* 2001; 70(6):849-860.
26. Kumar V, Boddeti DK, Evans SG, Angelides S. ^{68}Ga -Citrate-PET for Diagnostic Imaging of Infection in Rats and for Intra-Abdominal Infection in a Patient. *Current Radiopharm.* 2011; 5(1):71-75.
27. Petrik M, Vlckova A, Novy Z, Urbanek L, Haas H, Decristoforo C. Selected ^{68}Ga -Siderophores versus ^{68}Ga -Colloid and ^{68}Ga -Citrate: Biodistribution and Small Animal Imaging in Mice. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2015;159(1):60-66.

28. Tsan MF. Mechanism of Gallium-67 Accumulation in Inflammatory Lesions. *J Nucl Med.* 1985; 26:88-92.
29. Kumar V, Boddeti DK, Evans SG, Roesch F, Howman-Giles R. Potential Use of ⁶⁸Ga-Apo-Transferrin as a PET Imaging Agent for Detecting *Staphylococcus Aureus* Infection. *Nucl Med Biol.* 2011; 38(3):393–8.
30. Hoffer P. Gallium: Mechanisms. *J Nucl Med.* 1980; 21:282-285.
31. Petrik M, Haas H, Laverman P, Schrettl M, Franssen GM, Blatzer M, Decristoforo C. ⁶⁸Ga-Triacetylfulvarinine C and ⁶⁸Ga-Ferrioxamine E for *Aspergillus* Infection Imaging: Uptake Specificity in Various Microorganisms. *Mol Imaging Biol.* 2014;16(1):102–108.
32. Wang L, Cherayil BJ. Ironing out the Wrinkles in Host Defense: Interactions Between Iron Homeostasis and Innate Immunity. *J Innate Immun.* 2009; 1:455-464.
33. Cherayil BJ. The Role of Iron in the Immune Response to Bacterial Infection. *Immunol Res.* 2011; 50(1):1-9.
34. Golonka R, Yeoh BS, Vijay-Kumar M. The Iron Tug-of-War between Bacterial Siderophores and Innate Immunity. *J Innate Immun.* 2019; 11:249-262.
35. Jha MK, Jeon S, Jin M, Ock J, Kim JH, Lee WH, Suk K. The Pivotal Role Played by Lipocalin-2 in Chronic Inflammatory Pain. *Exp Neurol.* 2014; 254:41-53.

FIGURES

Scheme 1



A: Ethyl trifluoroacetate, DCM, 0 °C, 1h, rt, 2h (not isolated); **B:** (Boc)₂O, THF, NEt₃, rt, 8h (not isolated); **C:** Cs₂CO₃ MeOH/H₂O (8/2), reflux 3h, 70% over 3 steps; **D:** Benzyl bromoacetate, THF, NEt₃, over night, 8h 72%; **E:** HCl 4M in dioxane, rt, 2h, quantitaf; **F:** (DIEA, DMF, 1h) + (arms, HATU, DIEA, DMF, 1h), 0 °C, 1h, rt, over night; **G:** H₂, Pd/C, MeOH, 12h, quantitative.

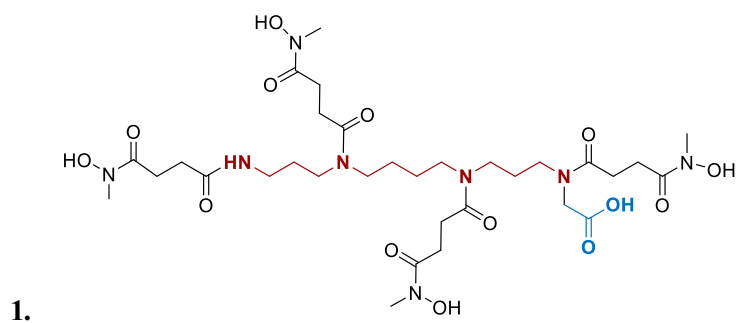


Figure 1 Structure of the new acyclic chelator 4HMSA

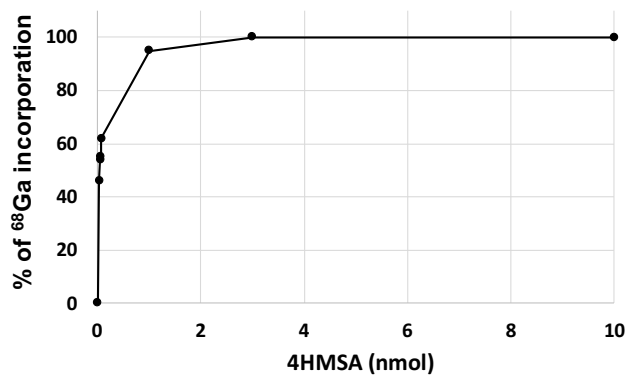


Figure 2 Percentage of ⁶⁸Ga incorporation as a function of the 4HMSA concentration (nmol)

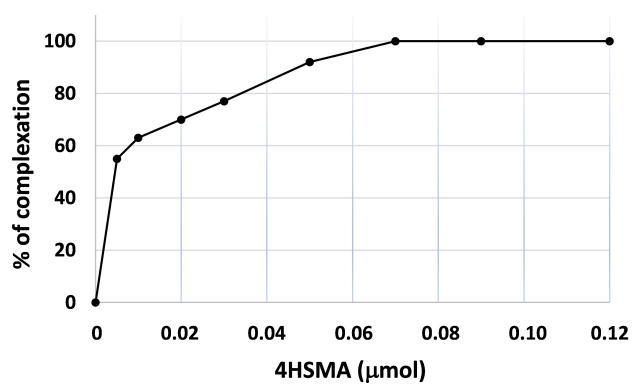


Figure 3 AMA (GBq/μmol) determination of ⁶⁸Ga-4HMSA AMA calculated via titration of the chelator with purified ⁶⁸GaCl₃

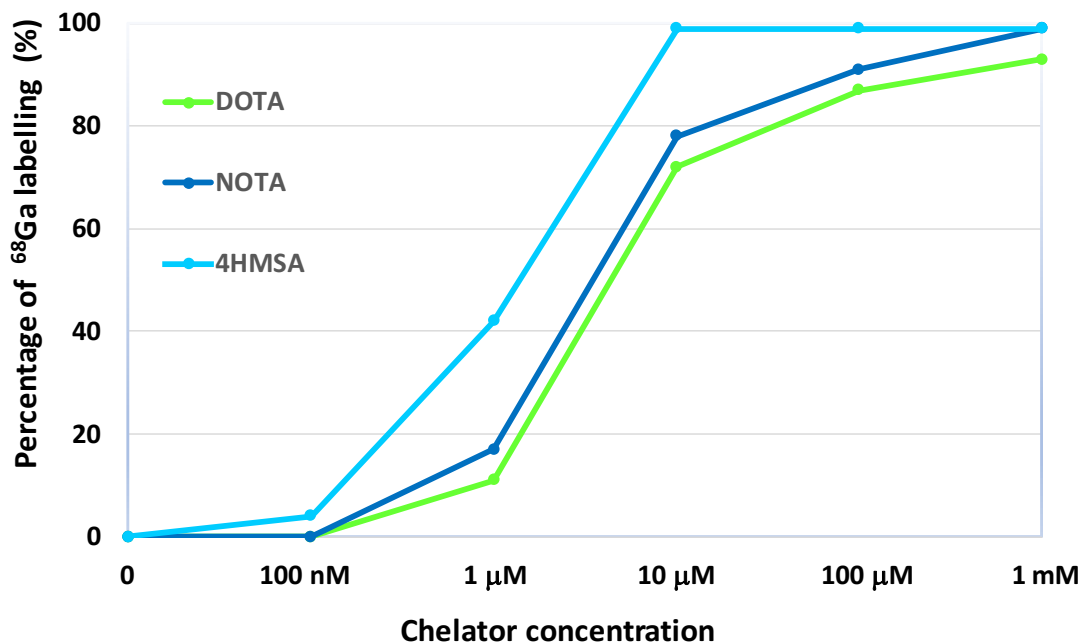


Figure 4 Percentage of ^{68}Ga labeling with 4HMSA, NOTA and DOTA as a function of chelator concentration. A complete complexation of ^{68}Ga -4HMSA was observed at a concentration of $10\ \mu\text{M}$ after 5 min incubation at room temperature, while high RCYs were achieved at concentration of $1\ \text{mM}$ after 15 min at room temperature for ^{68}Ga -NOTA and 30 min at $80\ ^\circ\text{C}$ for ^{68}Ga -DOTA.

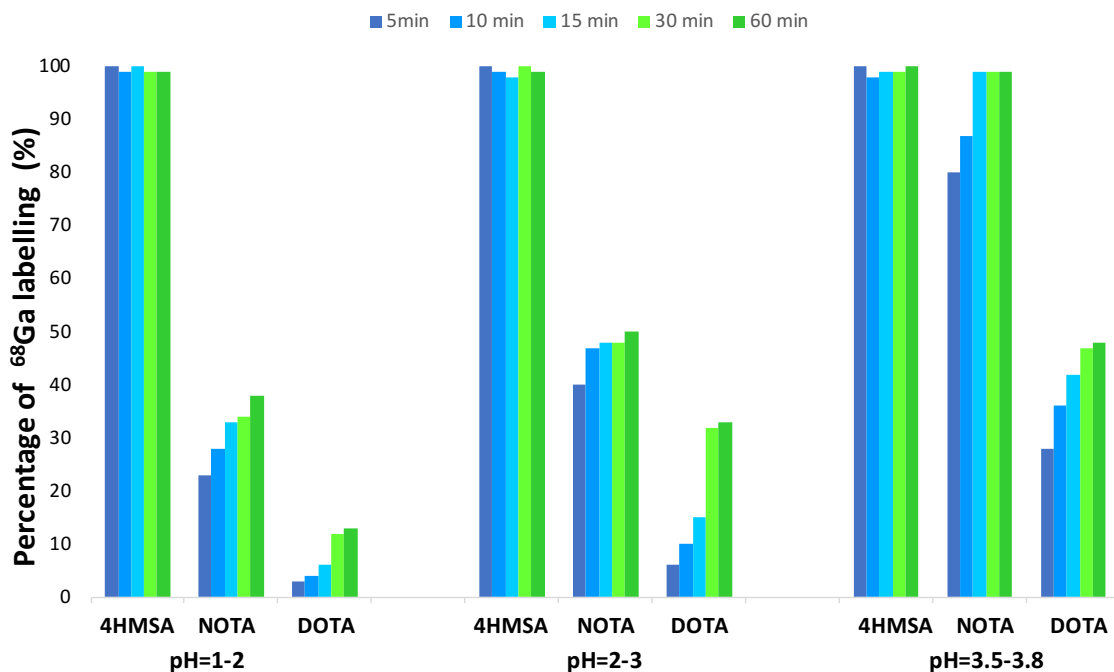


Figure 5 RCY of ^{68}Ga with 4HMSA DOTA, NOTA under different pH conditions and as a function of time.

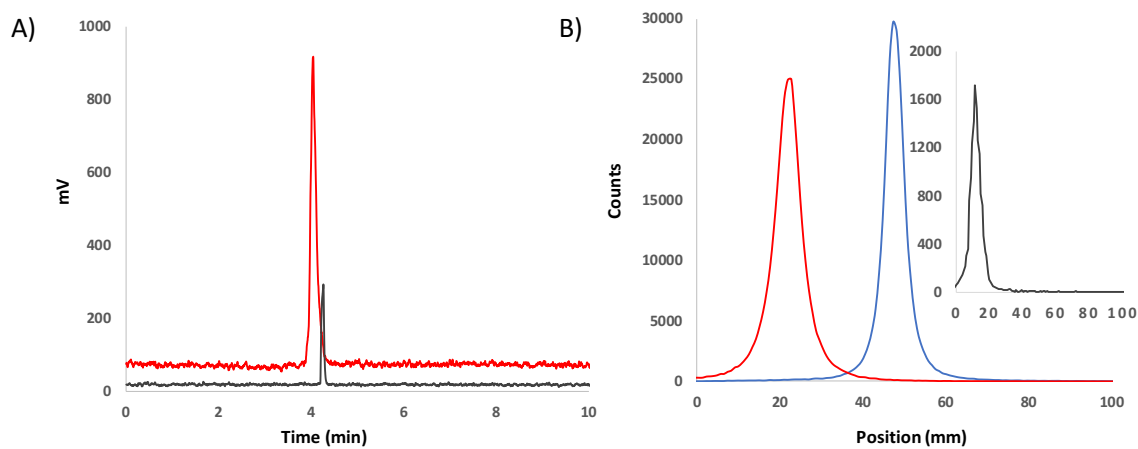


Figure 6 Representative radio-UPLC and iTLC profiles of (A) pure ^{68}Ga -4HMSA (red line) and ^{68}Ga -4HMSA in the supernatant fraction after 2h incubation in human plasma

(grey line); (B) [^{68}Ga]GaCl₃ (blue line), pure [^{68}Ga]Ga-4HMSA (red line) and in the insert, [^{68}Ga]Ga-4HMSA in the supernatant fraction after 1h in rodent (grey line).

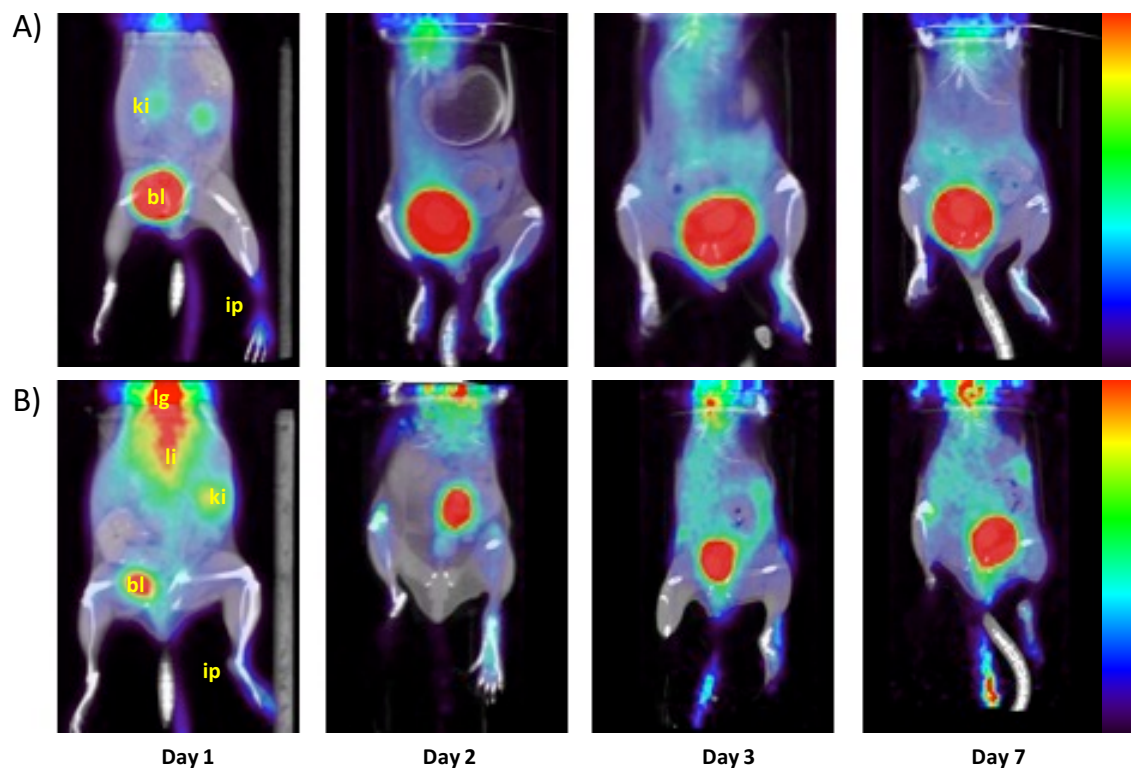


Figure 7 PET/CT scan of Balb/c mice injected with (A) [^{68}Ga]Ga-4HMSA and (B) [^{68}Ga]Ga-citrate with the left paw inflamed at different time points. [^{68}Ga]Ga-4HMSA and [^{68}Ga]Ga-citrate uptakes are similar in the inflamed paw (ip) and decreased steadily from Day 1 to Day 7. Lower accumulation in healthy tissues was obtained with [^{68}Ga]Ga-4HMSA. Legend: bladder (bl), lung (lg), liver(li), kidneys (ki).

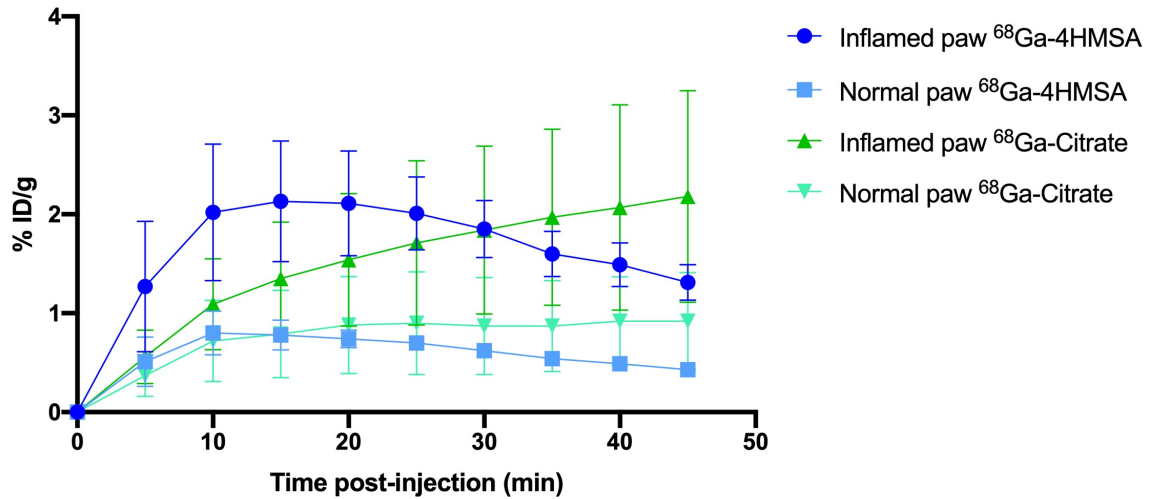


Figure 8 Paws uptake of [^{68}Ga]Ga-4HMSA and [^{68}Ga]Ga-citrate at Day 1 post-inflammation

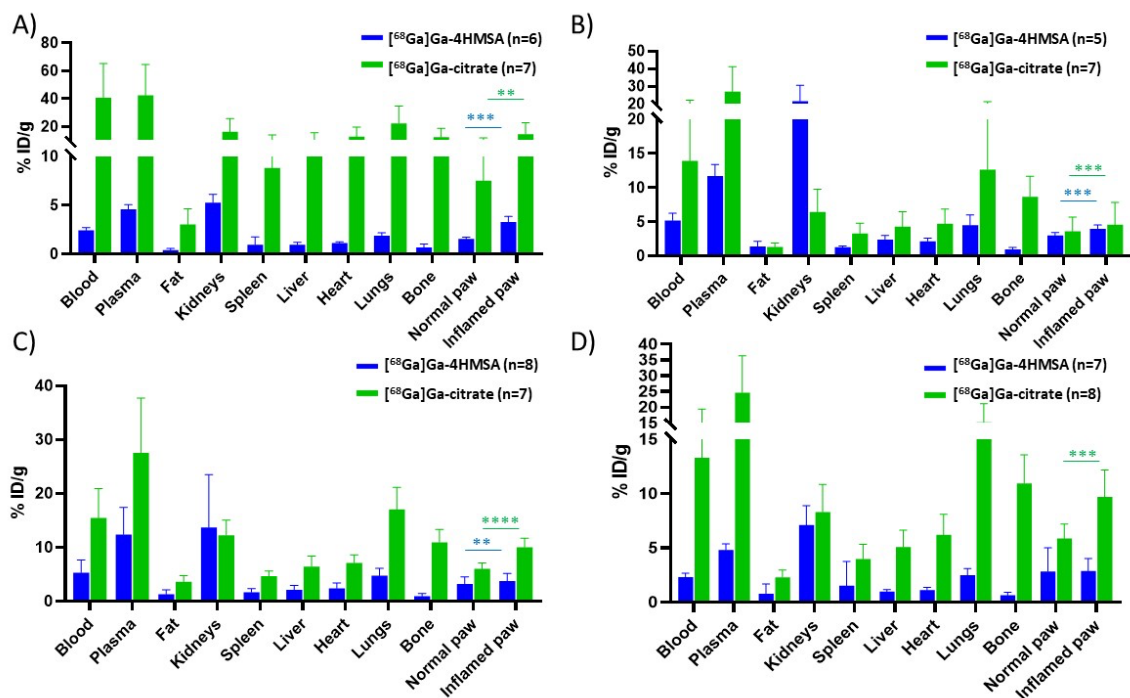


Figure 9 Biodistribution of [^{68}Ga]Ga-4HMSA and [^{68}Ga]Ga-citrate in Balb/c mice injected with CFA in the footpad at days 1 (A), 2 (B), 3(C) and 7 (D) post-inflammation. Biodistribution was performed 60 min after radiotracer injection.

TABLES

Table 1 Transchelation of [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA with Apo-transferrin

Time (min)	% Apo-transferrin binding
30	6.0 ± 0.4
60	7.0 ± 0.4
120	8.0 ± 0.1

Table 2 Transchelation of [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA with DTPA

DTPA (equiv)	% of intact ⁶⁸ Ga-4HMSA		
	15 min	30 min	80 min
50	100	/	/
100	100	/	/
200	100	100	100
300	100	100	100
500	100	100	74
1000	100	77	59

Table 3 Transmetallation of [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA in presence of various biologically relevant metal salts

Metal (10 equiv)	% of Remaining Ga ⁶⁸ complexation					
	15 min		30 min		60 min	
CoCl ₂	100 ^a	100 ^b	100 ^a	100 ^b	100 ^a	100 ^b
CuCl ₂	100 ^a	100 ^b	100 ^a	100 ^b	78 ^a	95 ^b
FeCl ₃	100 ^a	100 ^b	71 ^a	86 ^b	35 ^a	72 ^b
NiCl ₂	100 ^a	100 ^b	100 ^a	100 ^b	100 ^a	100 ^b
MgCl ₂	100 ^a	100 ^b	100 ^a	100 ^b	100 ^a	100 ^b

^apH = 2.0; ^bpH = 7.4

Table 4 Protein binding of [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA in mouse plasma

Time (min)	% protein binding
15	0.49±0.06
30	0.84±0.05
45	4.33±0.15
60	8.75±0.30
120	10.33±0.21

Table 5 PET uptake of [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA and [⁶⁸Ga]Ga-citrate in Balb/c mice injected with CFA in the footpad at different time point post-inflammation

Time post-inflammation (Day)	[⁶⁸ Ga]Ga-4HMSA (%DI/g)		[⁶⁸ Ga]Ga-citrate (%DI/g)	
	Inflamed paw	Normal paw	Inflamed paw	Normal paw
1	2.13 ± 0.61**	0.78 ± 0.15	2.18 ± 1.07*	0.92 ± 0.49
2	1.77 ± 0.61*	0.91 ± 0.23	1.54 ± 0.48*	0.76 ± 0.08
3	1.07 ± 0.26**	0.69 ± 0.18	1.01 ± 0.29**	0.45 ± 0.12
7	1.49 ± 0.54	0.54 ± 0.10	1.40 ± 0.62	0.50 ± 0.10

Two-tailed independent Student's *t*-test. non-significant: $p > 0.05$; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$ ****: $p \leq 0.0001$.

Table 6 Inflamed to normal paw ratios of [⁶⁸Ga]Ga-4HMSA and [⁶⁸Ga]Ga-citrate from PET imaging and biodistribution results

Time post-inflammation	Inflamed/normal paw ratios from PET imaging		Inflamed to normal paw ratios from biodistribution	
	[⁶⁸ Ga]Ga-4HMSA	[⁶⁸ Ga]Ga-citrate	[⁶⁸ Ga]Ga-4HMSA	[⁶⁸ Ga]Ga-citrate
Day 1	2.73 ± 0.59	2.54 ± 0.67	2.13 ± 0.28	1.94 ± 0.35
Day 2	1.94 ± 0.18	2.03 ± 0.62	1.32 ± 0.06	1.71 ± 0.23
Day 3	1.56 ± 0.15	2.27 ± 0.61	1.19 ± 0.07	1.69 ± 0.23
Day 7	2.72 ± 0.65	2.79 ± 0.96	1.34 ± 0.68	1.67 ± 0.30

DISCUSSION

Les maladies inflammatoires et infectieuses non diagnostiquées à temps peuvent avoir de graves conséquences pour le patient. Au cours des dernières années, les modalités d'imagerie et la médecine nucléaire nous ont permis d'approfondir sur la physiopathologie de ces processus, ce qui joue un rôle très important dans le diagnostic, la caractérisation et le suivi des maladies (Signore *et al.*, 2018). Le processus de l'inflammation est lié directement ou indirectement à plusieurs maladies humaines incluant les AVC (accident vasculaire cérébral), la maladie de l'Alzheimer, l'athérosclérose, les maladies auto-immunes, le diabète, l'obésité ainsi que certains cancers (Wu *et al.*, 2013). Jusqu'à présent, de nombreux biomarqueurs liés à l'inflammation ont été identifiés et étudiés comme cibles d'imagerie ou de traitement. Certaines de ces cibles ont été testées chez l'être humain, par exemple le FDG en TEP et de nombreux autres nouveaux traceurs dans des études cliniques de validation ont montré des perspectives prometteuses.

Pour l'imagerie de l'inflammation liée aux tumeurs, les macrophages associés à une tumeur deviennent des cibles largement explorées. Dans le débat sans fin sur la différenciation de la tumeur de l'inflammation, diverses cibles TEP ont été étudiées. Cependant, très peu d'entre elles sont considérées comme étant spécifiques à l'inflammation. En effet, il est reconnu que l'augmentation du flux sanguin, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et des globules blancs favorisent l'accumulation des agents d'imagerie au site d'inflammation, spécifique ou non. La réaction inflammatoire étant un processus très complexe qui implique beaucoup de molécules différentes, ce qui rend la sélection de cibles spécifiques difficiles. Malgré cela, plusieurs cibles sont à l'étude alors que d'autres ont été testés dans le passé tel que ^{68}Ga -DOTA-TOC, ^{68}Ga -DOTAVAP-P1, ^{18}F -4V et plusieurs autres. Cependant, ces traceurs spécifiques peuvent détecter tout autant l'inflammation que les tumeurs cancéreuses. Ce qui nous amène à réfléchir à l'utilité de développer un traceur spécifique à l'inflammation.

Cette étude avait pour objectif de comparer deux traceurs TEP de l'inflammation chez le petit animal qui sont : ^{68}Ga -4HMSA et le ^{68}Ga -citrate. Le ^{68}Ga -citrate étant un traceur connu et utilisé pour l'imagerie de l'inflammation et de l'infection, il possède plusieurs désavantages au niveau de la biodistribution dont la dosimétrie ainsi que le bruit de fond

élevé. Durant le développement du chélateur sidérophore 4HMSA, les études de marquage, les études de stabilité dans le plasma humain ont montré qu'il possédait une meilleure cinétique de marquage ainsi qu'une élimination du traceur rapide par les reins. Des études de biodistribution préliminaires fait sur des souris saines ont démontré un faible bruit de fond et c'est pourquoi nous avons décidé d'étudier son potentiel comme traceur pour l'inflammation en imagerie TEP.

1. 4HMSA

Un chélateur bifonctionnel est un agent qui possède la fonction de lier l'ion métallique tout en ayant un groupement chimiquement actif. Les chélateurs les plus fréquemment utilisés pour le ^{68}Ga sont DOTA et NOTA étant donné qu'ils sont reconnus pour former des complexes stables avec celui-ci (Guleria *et al.*, 2018). Cependant, ces chélateurs possèdent plusieurs désavantages. Entre autres, la cinétique de formation de complexes avec DOTA est lente et requiert des conditions de radiomarquage comme chauffage à haute température qui souvent ne conviennent généralement pas à de nombreuses molécules d'intérêt pour l'imagerie moléculaire (Chakravarty *et al.*, 2013). Le chélateur développé par l'équipe du Pre Guérin a démontré surmonter ses désavantages. En effet, les résultats de test de radiomarquage comparant le chélateur sidérophore (4HMSA) avec ses analogues DOTA et NOTA montre une cinétique de marquage très rapide à température ambiante à différent pH (1.0-3.8) alors que DOTA et NOTA montre des niveaux de complexation beaucoup plus faible (Tableau 2 et 3). De plus, le temps étant un facteur très important ici, le 4HMSA permet un marquage beaucoup plus rapide que les 2 autres chélateurs, ce qui empêche la perte d'une grande quantité de ^{68}Ga dû à la désintégration. Un autre avantage du nouveau chélateur est sa stabilité. Les résultats ont montré que le ^{68}Ga -4HMSA est resté intact lorsque incubé 2h dans le plasma humain et 1h chez la souris (figure 6). Ces tests de stabilité ont montré que le Ga reste complexé au chélateur et qu'il n'y a presque pas ou peu de Ga libre en circulation. Étant un chélateur faible *in vivo*, le ^{68}Ga -citrate se dissocie rapidement dans le sang pour donner le Ga^{3+} et le citrate^{3-} . Une fois dissocié, 99% des ions gallium se lieront aux protéines plasmatiques présentes dans le sang telles que : transferrine, lactoferrine et ferritine présente dans les lésions inflammatoires (Tsan, 1985;

Kumar *et al.*, 2011). Le ^{68}Ga -Citrate chez la souris est lentement éliminé et reste en circulation ce qui concorde avec nos résultats (Figure 9).

2. Biodistribution

Étant donné que le ^{68}Ga -citrate reste en circulation longtemps, l'accumulation plus élevée au niveau de la patte inflammée et la patte normale pourrait être expliquée par le fait que le traceur s'accumule dans les os (Figure 9). Bien que les valeurs à la patte obtenue en biodistribution pour le ^{68}Ga -citrate soient supérieures à ceux du ^{68}Ga -4HMSA (Figure 9), les ratios cible/non-cible (patte inflammée/patte normale) sont similaires dans le temps pour les deux traceurs (Tableau 6). De plus, les résultats en biodistribution montrent qu'au jour 3 post-inflammation avec le CFA, il y a une augmentation de l'accumulation du traceur ^{68}Ga -4HMSA dans la majorité des organes, dans le sang et le plasma lorsqu'on compare avec le jour 1, 2 et 7 (Figure 9). Pour l'instant, il n'y a pas d'explication claire qui expliquerait cette augmentation au jour 3. Une amélioration qui pourrait être apportée dans le futur afin d'optimiser l'expérience serait d'injecter le CFA dans un groupe de souris et de suivre ce même groupe de souris à travers les 7 jours en scannant les animaux aux jours 1, 2, 3 et 7 afin d'avoir une idée plus précise de l'évolution de l'inflammation chez chaque groupe de souris. Ce que nous avons fait était d'utiliser des groupes de souris différents pour chaque temps étant donné qu'on euthanasiait les souris suite à l'imagerie pour précéder à la biodistribution.

3. Imagerie TEP

Avec le ^{68}Ga -4HMSA, on a pu observer l'accumulation du traceur au niveau des reins, le foie, le muscle et les deux pattes, avec et sans inflammation. La tendance observée avec les résultats de biodistribution est répétée avec les résultats d'imagerie où l'accumulation du traceur augmente avec le temps et est plus élevée à 72 heures dans la majorité des organes, sauf à la patte et diminue après 7 jours. Alors que l'activité trouvée dans la patte inflammée n'a pas augmenté à ce moment, sa valeur %DI/g est statistiquement supérieure à celle de la patte normale ($p \leq 0.01$) (Tableau 5). Les ratios cible/non-cible de la patte inflammée sur la patte normale obtenue à partir des résultats d'imagerie sont supérieurs à ceux de la biodistribution, mais non significatifs. Une explication potentielle pourrait être

que les biodistributions ont été effectuées 1h après l'injection du traceur, ce qui n'est pas le temps optimal pour le ^{68}Ga -4HMSA (15min) et ^{68}Ga -citrate (45min) qui ont été prédéterminés à partir des études d'imagerie dynamique TEP.

Un de nos objectifs principaux était de montrer que le nouveau chélateur (^{68}Ga -4HMSA) était aussi efficace que le ^{68}Ga -citrate pour la détection de l'inflammation. Les images TEP montrent un bruit de fond élevé avec le ^{68}Ga -citrate et une accumulation du traceur dans les parties supérieures de la souris (Figure 7). Cette observation avait également été faite dans plusieurs études utilisant le ^{68}Ga -citrate pour la détection de l'infection et l'inflammation qui ont démontré qu'à cause du bruit de fond élevé au niveau du thorax et de l'abdomen supérieurs, cela pouvait interférer dans la détection des lésions dans ces régions spécifiques (Kumar *et al.*, 2012) ce qui est à prendre en considération lors de la sélection de ce traceur. L'utilisation du ^{68}Ga -4HMSA permettrait de pallier à ces désavantages puisqu'il offre de très faibles captations au foie, poumons et coeur.

De manière générale, les résultats soutiennent fortement le potentiel du ^{68}Ga -4HMSA à cibler l'inflammation avec une meilleure pharmacocinétique pour l'imagerie. C'est-à-dire que le traceur est rapidement éliminé des organes et de la circulation par la voie rénale principalement.

4. Protéines plasmatiques

Pour mieux comprendre le mécanisme d'action du ^{68}Ga -4HMSA, des études de stabilité ont été effectuées pour évaluer la liaison du traceur aux protéines plasmatiques. Tel que mentionné ci-haut, les ions gallium dissociés du citrate se lieront aux protéines plasmatiques pour ensuite se rendre au site d'inflammation par différents mécanismes et récepteurs comme ceux de la transferrine par exemple. Les résultats avec le ^{68}Ga -4HMSA ont montré une faible association avec les protéines plasmatiques, soit de 11% (Tableau 4) ce qui nous informe qu'une fois complexé au 4HMSA, le ^{68}Ga semble utiliser une autre voie qui est différente de celle du citrate.

5. Sidérophores

Lors de développement de pharmaceutiques, les sidérophores ont été utilisés comme des chélateurs de radiométaux. Par exemple, le desferrioxamine (DFO) qui est un sidérophore produit par *Streptomyces pilosus* a été utilisé comme outil thérapeutique en combinaison avec le gallium pour l'hémochromatose et la β thalassémie (Wilson *et al.*, 2016). Étant donné que notre composé est un chélateur sidérophore, on suppose que son mécanisme d'action pourrait être semblable. En effet, il est reconnu dans la littérature que le gallium puisse également se lier aux sidérophores bactériens qui sont des molécules de faibles poids moléculaires qui facilitent l'absorption du fer par les microorganismes lors d'une infection ou d'une réaction inflammatoire (Haven, 1980). Les sidérocaldines (Lcn2 ou NGAL) sécrétées par l'hôte peuvent séquestrer des sidérophores de types entérobactine ainsi que différents sidérophores catécholates (Cherayil, 2011). Cependant, Lcn2 est normalement incapable de séquestrer les sidérophores hydroxamates tels que le trihydroxamate aussi appelé déféroxamine, mais peut complexer une carbomycobactine sidérophorique mixte sécrétée par diverses mycobactéries pathogènes, comme le *M.tuberculosis* trouvé dans la solution de CFA (Golonka *et al.*, 2019). La structure du chélateur 4HMSA est différente de la déféroxamine et donc pourrait être reconnue par la sidérocaldine (Lcn2). Ce mécanisme moléculaire pourrait probablement expliquer la présence du ^{68}Ga -4HMSA au site d'inflammation en faisant circuler de la sidérocaldine (Lcn2) qui est régulée à la hausse grâce aux stimuli inflammatoires. Une fois lié à la sidérocaldine (Lcn2), le ^{68}Ga -4HMSA peut être transporté dans la patte inflammée.

CONCLUSION

L'imagerie moléculaire nous permet d'observer le fonctionnement des organes et tissus et des processus biologiques qui les affectent et possède un rôle très important dans la découverte et le développement de traitements et médicaments. Plus spécifiquement l'imagerie TEP qui a montré beaucoup d'avantages grâce au développement de technologies récentes qui permet à cette technique d'être adaptées aux exigences cliniques. L'équipe du Pr Guérin a développé le chélateur bifonctionnel 4HMSA qui a prouvé avoir une meilleure cinétique de marquage et stabilité *in vivo* comparativement à d'autres chélateurs analogues. Ce chélateur pourrait devenir un outil d'imagerie très intéressant étant donné son potentiel pour l'imagerie TEP. Dans cette étude, ce chélateur ^{68}Ga -4HMSA a été comparé au ^{68}Ga -citrate qui est déjà utilisé en imagerie de l'inflammation. Ces deux traceurs ont été comparés en imagerie TEP et en biodistribution chez le petit animal (souris balb/c).

La TEP couplée à la TDM ont fourni des images très précises de la localisation des structures anatomiques ainsi que la quantification très sensible de l'accumulation du ^{68}Ga -4HMSA et du ^{68}Ga -citrate dans les lésions inflammées. Les résultats ont démontré que les deux traceurs ont été en mesure d'identifier la région où il y avait de l'inflammation. Il y avait beaucoup de bruit de fond sur les images du ^{68}Ga -citrate avec beaucoup de captation dans la région du thorax. En tant que nouvel agent d'imagerie de l'inflammation, le ^{68}Ga -4HMSA a montré une stabilité *in vitro* et *in vivo* élevée, une élimination rapide des organes et de la circulation par la voie rénale ce qui est un avantage au niveau de la dosimétrie et du bruit de fond global qui est plus faible.

Des expériences complémentaires seront nécessaires pour valider notre hypothèse qui suggère que le chélateur sidérophore (^{68}Ga -4HMSA) utiliserait la voie des sidérocaldines (Lcn2), ce qui expliquerait la présence du traceur au site d'inflammation. Ces expériences auraient pour but d'avoir une meilleure compréhension du mécanisme d'action et par le fait même contribuer au développement et au perfectionnement de nouveaux outils d'imagerie TEP.

PERSPECTIVE D'AVENIR

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont démontré que le nouveau chélateur développé par l'équipe du professeur Guérin avait beaucoup de potentiel comme outil d'imagerie. Nous avons démontré son efficacité pour l'imagerie de l'inflammation en le comparant avec un autre traceur connu, soit le ^{68}Ga -citrate.

Bien que nous ayons montré l'efficacité et le potentiel du traceur ^{68}Ga -4HMSA pour l'imagerie de l'inflammation, il reste encore plusieurs aspects à explorer tels que de comprendre le mécanisme d'action au niveau cellulaire pour pouvoir mieux optimiser l'efficacité de celui-ci. D'autres expérimentations *in vitro* et *in vivo* permettront de compléter l'étude soit en utilisant une lignée cellulaire ou un modèle animal différent pour l'inflammation. Il serait également intéressant d'étudier le potentiel du ^{68}Ga -4HMSA dans des modèles d'inflammation chronique. Dans le même ordre d'idée, il serait intéressant d'utiliser ce traceur radiomarqué avec un ligand cible de l'inflammation et le comparer avec ce qui a déjà été fait dans la littérature comme avec le ^{68}Ga -DOTAVAP-P1 par exemple (Coussens et Werb, 2010). En ayant une meilleure idée sur le fonctionnement du ^{68}Ga -4HMSA *in vitro* et *in vivo*, plusieurs autres pistes pourront être explorées dans le but de développer un traceur optimal pour l'imagerie de l'inflammation.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Ait-Mohand. S, Dumulon-Perreault. V, Guérin. B. (2017). Superior performance of a new acyclic chelator bearing N-hydrox-N-methyl succinamide pendant arms, 4HMSA, in comparison with DOTA and NOTA for 68Ga-PET. *J Nucl Med*, May 1, 2017, vol. 58 no. supplement 1 671
- AWJM Glaudemans, Israel O, RHJA Slart. (2015). Pitfalls and limitations of radionuclide and hybrid imaging in infection and inflammation. *Semin Nucl Med*, 45(6): 500-512
- Beekhuizen, H., & Furth, R. van. (1998). Diapedesis. In *P. J. B. T.-E. of I.* (Second E. Delves (Ed.) Oxford: Elsevier, 757–760.
- Bekerman, C., Hoffer, P. B., Bitran, J. D., & Gupta, R. G. (1980). Citrate-Ga-67 Imaging Studies of the Lung. *Seminars in Nuclear Medicine*, 10(3), 286–301.
- Boerman O. C., Dams E. T. M., Oyen W. J. G., Corstens F. H. M., Storm G. (2001) Radiopharmaceuticals for scintigraphic imaging of infection and inflammation. *Inflamm Res* 50, 55-64.
- Chakravarty, R., Chakraborty, S., Dash, A., & Pillai, M. R. A. (2013). Detailed evaluation on the effect of metal ion impurities on complexation of generator eluted 68Ga with different bifunctional chelators. *Nuclear Medicine and Biology*, 40(2), 197–205.
- Cherayil BJ. (2011). The Role of Iron in the Immune Response to Bacterial Infection. *Immunol Res*, 50(1): 1-9.
- Coussens, L. M., & Werb, Z. (2010). Coussens L, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917): 860–867.
- De Dreuille, O., Maszelin, P., Foehrenbach, H., Bonardel, G., & Gaillard, J.-F. (2004). Principe et technique de la tomographie par émission de positons (TEP). *EMC - Radiologie*, 1(1), 2–35.
- Dvorak HF. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, 315:1650–1659.
- Edwards C. L. and Hayes R. L. (1969). Tumor scanning with 67Ga citrate. *J Nucl Med* 10, 103-105.
- Goldsmith S. J. and Vallabhajosula S. (2009). Clinically proven radiopharmaceuticals for infection imaging: Mechanisms and applications. *Semin Nucl Med*. 39, 2-10.
- Golonka R, Yeoh BS, Vijay-Kumar M. (2019). The Iron Tug-of-War between Bacterial Siderophores and Innate Immunity. *J Innate Immun*. 11:249-262.

- Guleria, M., Das, T., Amirdhanayagam, J., Sarma, H. D., & Dash, A. (2018). Comparative Evaluation of Using NOTA and DOTA Derivatives as Bifunctional Chelating Agents in the Preparation of ⁶⁸Ga-Labeled Porphyrin: Impact on Pharmacokinetics and Tumor Uptake in a Mouse Model. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 33(1), 8–16.
- Hoffer P. (1980). Gallium: mechanisms. *J Nucl Med*. Mar;21(3):282-5.
- Higasi T., Nakayama Y., Murata A., Nakamura K., Sugiyama M., Kawaguchi T., Suzuki S. (1971). Clinical evaluation of ⁶⁷Ga-citrate scanning. *J Nucl Med*, 13, 196-201
- Ito Y., Okuyama S., Sato K., Takahashi K., Sato T., Kanni I. (1971). ⁶⁷Ga tumor scanning and its mechanisms studied in rabbits. *Radiology* 100, 357- 362.
- Imberti, C. (2018). New approaches to radionuclide imaging of cancer with gallium-68, Thesis (Ph.D), *University of London*, 260p.
- Kumar, V., Abul, A. et Aster, J. (2012) Robins and Cotran Pathologic basis of disease. Canada: Elsevier (8th edition), 26-30.
- Kumar, V., Abul, A. et Aster, J. (2015) Robins and Cotran Pathologic basis of disease. Canada: Elsevier (9th edition), 70-100.
- Kumar, V., Boddeti, D. K., Evans, S. G., Roesch, F., & Howman-Giles, R. (2011). Potential use of ⁶⁸Ga-apo-transferrin as a PET imaging agent for detecting *Staphylococcus aureus* infection. *Nuclear Medicine and Biology*. 38(3), 393–398.
- Kumar, V., K. Boddeti, D., G. Evans, S., & Angelides, S. (2012). ⁶⁸ Ga-Citrate-PET for Diagnostic Imaging of Infection in Rats and for Intra-Abdominal Infection in a Patient. *Current Radiopharmaceuticals*, 5: 71.
- Lavender J. P., Love J. Barker J. R., Burn J. I., Chaundhri M. A. (1971). Gallium ⁶⁷ citrate scanning in neoplastic and inflammatory lesions. *Br J Radiol* 44, 361-366.
- Marx, J. (2004). Inflammation and cancer: The link grows stronger. *Science*,/306(5698), 966-8.
- Nanni, C., Errani, C., Boriani, L., Fantini, L., Ambrosini, V., Boschi, S., ... Fanti, S. (2010). ⁶⁸Ga-Citrate PET/CT for Evaluating Patients with Infections of the Bone: Preliminary Results. *Journal of Nuclear Medicine*, 51(12), 1932–1936.
- Petrik, M., Haas, H., Laverman, P., Schrettl, M., Franssen, G. M., Blatzer, M., & Decristoforo, C. (2014). ⁶⁸Ga-triacetylfusarinine C and ⁶⁸Ga-ferrioxamine e for aspergillus infection imaging: Uptake specificity in various microorganisms. *Molecular Imaging and Biology*, 16(1), 102–108.

- Petrik, M., Haas, H., Schrettl, M., Helbok, A., Blatzer, M., & Decristoforo, C. (2012). In vitro and in vivo evaluation of selected ^{68}Ga -siderophores for infection imaging. *Nuclear Medicine and Biology*, 39(3), 361–369.
- Ptaschinski, C., & Lukacs, N. W. (2017). Acute and chronic inflammation induces disease pathogenesis. *Molecular Pathology: The Molecular Basis of Human Disease* (Second Edition). Elsevier Inc.
- Roivainen, A., Jalkanen, S., & Nanni, C. (2012). Gallium-labelled peptides for imaging of inflammation. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 39(SUPPL.1), 68–77.
- RYAN, P. J., & FOGELMAN, I. (2007). The role of nuclear medicine in orthopaedics. *Nuclear Medicine Communications*, 15(5), 341–360.
- Saiga, H., Nishimura, J., Kuwata, H., Okuyama, M., Matsumoto, S., Sato, S., Takeda, K. (2008). Lipocalin 2-Dependent Inhibition of Mycobacterial Growth in Alveolar Epithelium. *The Journal of Immunology*, 181(12), 8521–8527.
- Schmidt-Ott, K. M., Mori, K., Li, J. Y., Kalandadze, A., Cohen, D. J., Devarajan, P., & Barasch, J. (2007). Dual Action of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(2), 407–413.
- Signore, A., Lazzeri, E., & Glaudemans, A. W. J. M. (2018). Infection and inflammation imaging standardization: the EANM guidelines. *Clinical and Translational Imaging*, 6(4), 253–255.
- Stoesz, S. P., Friedl, A., Haag, J. D., Lindstrom, M. J., Clark, G. M., & Gould, M. N. (1998). Heterogeneous expression of the lipocalin NGAL in primary breast cancers. *International Journal of Cancer*, 79(6), 565–572.
- Tsan MF. (1985). Mechanism of gallium-67 accumulation in inflammatory lesions. *J Nucl Med*, 26:88–92.
- Ujula T. (2011). Studies on ^{68}Ga -Based Agents for PET Imaging of Cancer and Inflammation. *Annales Universitatis Turkuensis*. <http://urn.fi/URN:ISBN:978-951-29-4498-9>, page consultée le 21 décembre 2021.
- Velikyan I. (2005). Synthesis, characterization and application of ^{68}Ga -labelled macromolecules. Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala.
- Vorster, M., Maes, A., Wiele, C. van de, & Sathekge, M. (2016). Gallium-68 PET: A Powerful Generator-based Alternative to Infection and Inflammation Imaging. *Seminars in Nuclear Medicine*, 46(5), 436–447.

Wilson, B. R., Bogdan, A. R., Miyazawa, M., Hashimoto, K., & Tsuji, Y. (2016). Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. *Trends in Molecular Medicine*, 22(12), 1077–1090.

Wu C, Li F, Niu G, Chen X. (2013). PET imaging of inflammation biomarkers. *Theranostics*. Jun 24;3(7):448-66. doi: 10.7150/thno.6592, page consultée le 17 septembre 2020.

Yang, J., Goetz, D., Li, J. Y., Wang, W., Mori, K., Setlik, D., ... Barasch, J. (2002). An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Molecular Cell*, 10(5), 1045–1056.