

Université de Sherbrooke

**Évaluation de traceurs peptidiques radiomarqués pour la détection du cancer du sein et de la prostate par imagerie TEP**

Par  
Patrick Fournier  
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  
21 Septembre 2012

Membres du jury d'évaluation  
Brigitte Guérin, co-directrice de maîtrise, Dép. de Médecine Nucléaire et Radiobiologie  
Roger Lecomte, co-directeur de maîtrise, Dép. de Médecine Nucléaire et Radiobiologie  
Benoît Paquette, Dép. de Médecine Nucléaire et Radiobiologie  
Fernand Gobeil Jr., Dép. de Pharmacologie



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-93327-5*

*Our file Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-93327-5*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

## Table des matières

Liste des publications .....	iii
Liste des abréviations .....	iv
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux .....	viii
INTRODUCTION .....	1
1. Cancer.....	1
1.1 Cancer du sein .....	1
1.2 Cancer de la prostate .....	3
1.3 Cibles peptidiques potentielles pour le diagnostic du cancer par imagerie TEP.....	4
2. Les récepteurs de la famille de la bombésine.....	5
2.1 Généralités.....	5
2.2 Le récepteur du peptide de la relâche de la gastrine.....	6
2.3 Implication dans le cancer .....	7
3. Tomographie d'émission par positrons .....	9
3.1 Principes de la tomographie d'émission par positrons.....	9
4. Radiotraceurs.....	11
4.1 Généralités.....	11
4.2 Radiotraceurs peptidiques ciblant le GRPR .....	12
5. Facteurs influençant les propriétés biologiques des radiotraceurs peptidiques.....	15
5.1 Choix du radio-isotope pour le marquage .....	15
5.2 La multiplicité du composé peptidique .....	18
LES OBJECTIFS DE L'ÉTUDE .....	21
ARTICLE I.....	23
ARTICLE II .....	51
DISCUSSION .....	92
1. Le radio-isotope utilisé pour le marquage des peptides .....	93
2. La multiplicité du ligand peptidique .....	97
CONCLUSION .....	102
PERSPECTIVE D'AVENIR.....	104
RÉFÉRENCES.....	106

## Liste des publications

### **Novel radiolabeled peptides for breast and prostate tumor PET imaging: $^{64}\text{Cu}$ and $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14 )**

Patrick Fournier, Véronique Dumulon-Perreault, Samia Ait-Mohand, Sébastien Tremblay, François Bénard, Roger Lecomte et Brigitte Guérin  
*Bioconjugate Chemistry* 2012, **23**(8) :1687-1693  
doi: 10.1021/bc3002437

### **Comparative study of $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-[D-Tyr<sup>6</sup>, $\beta$ Ala<sup>11</sup>,Thi<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>]BBN(6-14) monomer and dimers for prostate cancer PET imaging**

Patrick Fournier, Véronique Dumulon-Perreault, Samia Ait-Mohand, Réjean Langlois, François Bénard, Roger Lecomte et Brigitte Guérin  
*European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Research* 2012, **2**:8  
doi:10.1186/2191-219X-2-8

## Liste des abréviations

$^{18}\text{F}$	Fluor-18
$^{18}\text{[F]FDG}$ , FDG	2-désoxy-2- $^{18}\text{F}$ -fluoro-D-glucose
$^{64}\text{Cu}$	Cuivre-64
$^{64}\text{Ni}$	Nickel-64
$^{64}\text{Zn}$	Zinc-64
$^{67}\text{Ga}$	Gallium-67
$^{68}\text{Ga}$	Gallium-68
$^{68}\text{Ge}$	Germanium-68
$^{68}\text{Zn}$	Zinc-68
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Technétium-99 métastable
$^{111}\text{In}$	Indium-111
$^{177}\text{Lu}$	Luthétium-177
$^{188}\text{Re}$	Rénium-188
$\alpha$	Particule alpha stable composée de 2 protons et de 2 neutrons étroitement liés, analogue à un noyau d'hélium 4 et émise au cours d'une désintégration nucléaire
Aoc	Aminooctanoyl
ARN	Acide ribonucléique
$\beta^+$ , beta +	Particule bêta plus ou positron, particule émise lors de la conversion d'un proton en neutron
$\beta^-$ , beta -	Particule bêta moins, particule émise lors de la conversion d'un neutron en proton

BB1	Récepteur de la bombésine sous-type 1
BB2	Récepteur de la bombésine sous-type 2
BB3	Récepteur de la bombésine sous-type 3
BB4	Récepteur de la bombésine sous-type 4
BBN	Bombésine
BBN(6-14)	[D-Phe <sup>6</sup> , β-Ala <sup>11</sup> , Thi <sup>13</sup> , Nle <sup>14</sup> ]Bombésine(6-14)
CB-TE2A	Acide 1,4,8,11-tétrazabicyclo[6.6.2]hexadécane-4,11-diacétique
CCK-2	Cholecystokinine-2
CRF	Facteur de la relâche de la corticotropine
DOTA	Acide 1,4,7,10-tétrazacyclododécane- <i>N,N',N'',N'''</i> -tétraacétique
EGF	Facteur de croissance épithélial
γ, gamma	Rayonnement électromagnétique qui prend naissance à l'intérieur du noyau de l'atome
GLP	Peptide similaire au glucagon
GRP	Peptide de la relâche de la gastrine
GRPR	Récepteur du peptide de la relâche de la gastrine ou BB2
keV	Kilo-électron-volt
K <sub>i</sub>	Constante d'inhibition
MeV	Méga-électron-volt
ν, neutrino	Particule neutrino
NK1	Neurokinine 1
NMB	Neuromédine B
NMBR	Récepteur de la neuromédine B ou BB1
NOTA	Acide 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique
NPY	Neuropeptide Y

NT	Neurotensine
Oxo-DO3A	Acide 1-oxa-4,7,10-triazacyclododécane-4,7,10-triacétique
PCTA	Acide 3,6,9,15-tétraazabicyclo[9.3.1]pentadéca-1(15),11,13-triène-3,6,9-triacétique
PEG	Polyéthylène glycol
PC3	Cellules cancéreuses prostatiques humaines
PSA	Antigène prostatique spécifique
RGD	Arginine-Glycine-Acide aspartique
RT-PCR	Réaction de polymérisation en chaîne utilisant une transcriptase inverse
SarAR	1- <i>N</i> -(4-aminobenzyl)-3,6,10,13,16,19-héxaazabicyclo[6.6.6]-eicosane-1,8-diamine
SST	Somatostatine
Suc	Succinyl
TEP	Tomographie d'émission par positrons
VIP	Peptide intestinal vasoactif

**Liste des figures**

Figure 1. Structure chimique du NOTA-PEG-BBN(6-14) .....14



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de radiotraceurs peptidiques ciblant les GRPR utilisés en diagnostic ou en traitement pour le cancer. ....	15
--	----

# Évaluation de traceurs peptidiques radiomarqués pour la détection du cancer du sein et de la prostate par imagerie TEP

Par

Patrick Fournier

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 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

Les cancers du sein chez les femmes et de la prostate chez les hommes sont les cancers les plus répandus au Canada. Un diagnostic précoce et un suivi de la thérapie bien adapté au type de cancer représentent des facteurs importants pour le traitement de ces maladies. La tomographie d'émission par positrons (TEP) permet de visualiser la distribution spatiale et temporelle de molécules radiomarquées. Le développement de nouveaux traceurs spécifiques à certains récepteurs surexprimés dans différents types de cancer permettrait d'améliorer le diagnostic à l'aide de l'imagerie TEP.

La bombésine se lie à 3 types de récepteurs humains, dont le récepteur à relâche de gastrine (GRPR). Il est surexprimé dans 65% des cas de carcinomes canauxiers *in situ* et 63% des tumeurs prostatiques. Le GRPR pourrait également être utilisé comme marqueur du caractère malin dans ces cas de cancer. Notre hypothèse est que les ligands radiomarqués ciblant le GRPR permettraient un meilleur diagnostic à partir de l'imagerie TEP et contribuerait au développement d'une médecine personnalisée.

Le premier objectif de cette étude vise à évaluer les effets du radiométal utilisé pour marquer les molécules sur les propriétés physicochimiques des traceurs ciblant les GRPR. Un peptide modèle, le NOTA-PEG-BBN(6-14), a été marqué au  $^{64}\text{Cu}$  et au  $^{68}\text{Ga}$ . Ces études ont démontré que l'isotope utilisé pour le marquage influence l'affinité du peptide pour le GRPR et conséquemment son accumulation spécifique. Le deuxième objectif consiste à évaluer et comparer différents monomères et homodimères dérivés de la bombésine afin d'étudier le rôle de la valence du ligand sur la captation et la rétention tumorale ainsi que d'évaluer l'effet de la longueur de l'espaceur entre les deux ligands des homodimères de la bombésine sur la captation/rétention tumorale. Ainsi, le NOTA-PEG-BBN(6-14) et deux homodimères ont été comparés *in vitro* et *in vivo*. Les composés homodimériques présentent une accumulation non-spécifique accrue au niveau des poumons, de la rate, du foie et des reins. De plus, le NOTA-dimère **2** possédant un plus long espaceur présente une accumulation spécifique augmentée au niveau du pancréas, un organe riche en GRPR, et une rétention supérieure au niveau des cellules tumorales prostatiques PC3 tant *in vitro* qu'*in vivo* chez les souris Balb/c nues xénogreffées.

**Mots-clés :** Bombésine, récepteur du peptide de la relâche de la gastrine, peptide homodimérique, cuivre-64, gallium-68, cancer du sein, cancer de la prostate, TEP

## INTRODUCTION

### 1. Cancer

Le cancer est la seconde cause de mortalité au Canada et un fléau au niveau mondial. Cette maladie prend naissance dans nos cellules en présentant une croissance anarchique et incontrôlable en plus de ne plus répondre aux signaux de l'organisme. Un cancer peut se développer dans presque n'importe quel organe et présenter divers degrés d'agressivité. Les catégories de cancer varient selon le type de cellules duquel découle le cancer. Les cellules à l'origine d'une tumeur peuvent infiltrer les tissus avoisinants et former des métastases (BECKE *et al*, 2006). De nos jours, plusieurs types de cancer sont curables, mais dans tous les cas, un diagnostic précoce et un traitement approprié assurent un pronostic favorable. La recherche sur le cancer est donc très importante pour mieux comprendre et combattre cette pathologie (Société canadienne du cancer, 2007).

#### 1.1 Cancer du sein

En 2010, le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les femmes canadiennes. Il s'agit de 22 300 nouveaux cas chez les femmes, mais on dénombre également 180 nouveaux cas chez les hommes annuellement. En termes de décès, 50 hommes et 5 300 femmes ont succombé à ce cancer au cours de l'année, en faisant le deuxième cancer le plus meurtrier pour les femmes au Canada. Avec les avancées de la recherche, le taux de survie à cinq ans a légèrement augmenté au cours des

dernières années. Les cellules cancéreuses mammaires peuvent provenir des canaux galactophores ou des glandes mammaires. Les cancers les plus fréquents sont issus des canaux galactophores (Société canadienne du cancer, 2011). Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés pour ce cancer. Il peut s'agir de facteurs génétiques héréditaires, de l'âge et d'antécédents familiaux ou personnels incluant aucun accouchement avant l'âge de 30 ans, des menstruations précoces, une ménopause tardive et des seins denses.

De nos jours, le diagnostic du cancer du sein peut se faire selon différentes approches. La méthode de dépistage la plus répandue à grande échelle est la mammographie (Société canadienne du cancer, 2011). Il existe divers autres examens médicaux pouvant être utilisés pour ce diagnostic comprenant l'échographie, l'imagerie par résonance magnétique et la tomographie d'émission par positrons (TEP) (GILBERT, 2008). Une fois qu'une tumeur potentielle est identifiée, une biopsie est réalisée afin de s'assurer du caractère tumoral de la lésion. Parmi ces examens, la TEP, une modalité d'imagerie puissante et non-invasive, permet non seulement la détection de la tumeur, mais également des métastases potentielles issues de ce cancer du sein.

Une fois le diagnostic posé, il existe plusieurs avenues de traitements potentiels. Le choix du traitement dépend du stade du cancer, des caractéristiques de la tumeur et du patient en considérant des facteurs tels l'état de santé et les antécédents familiaux. Les méthodes les plus utilisées sont la chimiothérapie, la radiothérapie et la chirurgie. Bien souvent, les patientes vont recevoir une combinaison de ces traitements. Il existe des mesures alternatives comprenant l'immunothérapie et l'hormonothérapie. Ces traitements ont pour but d'éviter la propagation et la progression de la tumeur (DOWNS-HOLMES et

SILVERMAN, 2011; SILVA et ZURRIDA, 2000). Il existe toutefois un besoin réel de développer des outils pour aider le suivi aux traitements afin de proposer rapidement des soins alternatifs en cas d'échec à la thérapie proposée.

## 1.2 Cancer de la prostate

En 2010, le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les hommes canadiens, ce qui représente 24 600 nouveaux cas. 4300 décès sont attribuables à ce cancer au cours de la même année. Il se situe au troisième rang des cancers les plus meurtriers pour les hommes au Canada. Certains facteurs de risques sont associés au cancer de la prostate. Les plus importants sont d'être âgé de plus de 65 ans, avoir des antécédents familiaux de cancer de la prostate et avoir des ancêtres d'origine africaine. En général, le cancer de la prostate évolue lentement et peut souvent être traité ou guéri avec succès (Société canadienne du cancer, 2007).

Pour le diagnostic, la première étape est généralement le toucher rectal afin de détecter l'hypertrophie de la prostate caractéristique de ce cancer. Si la prostate est hypertrophiée, différents examens sont possibles pour confirmer le diagnostic (Société canadienne du cancer, 2007). D'abord, le dosage de l'antigène prostatique spécifique (PSA) à partir d'un échantillon sanguin. Cet examen est un indicateur, mais pour confirmer hors de tout doute le diagnostic, un protocole d'imagerie sera réalisé qu'il s'agisse d'échographie, de radiographie, de tomodensitométrie ou d'imagerie par résonance magnétique. La méthode la plus utilisée est l'échographie transrectale

combinée à la biopsie ce qui assure un diagnostic complet (RAVINDER et SCHELLHAMMER, 2011).

Suite au diagnostic, plusieurs traitements sont possibles. Le choix du traitement dépend du stade, du grade et du type du cancer, du niveau de PSA sanguin ainsi que de l'état de santé du patient. Les possibilités de traitements sont la chirurgie (prostatectomie), la radiothérapie, l'hormonothérapie et la chimiothérapie (RAVINDER et SCHELLHAMMER, 2011). À l'exception de la biopsie, une méthode invasive, les modalités d'imagerie existantes ne permettent pas de déterminer le stade, le grade ou le type de cancer. L'utilisation de l'imagerie oncologique moléculaire par tomographie d'émission par positrons (TEP) présente un intérêt pour confirmer les stades localisés et permettre une caractérisation de la tumeur avec une sensibilité et une spécificité supérieure par rapport aux autres techniques utilisées. En plus de cette spécificité et sensibilité supérieure, un examen diagnostique par TEP basé sur l'imagerie moléculaire des cellules cancéreuses est peu invasif et permet la caractérisation moléculaire de ces cellules au moment du diagnostic, mais peut également être utilisé pour effectuer le suivi des patients tant pour le cancer de la prostate que le cancer du sein

### 1.3 Cibles peptidiques potentielles pour le diagnostic du cancer par imagerie TEP

Au cours des dernières années, plusieurs cibles peptidiques ont été associées au diagnostic et même considérées au niveau du traitement de plusieurs cancers. Les récepteurs de la somatostatine (SST), de la cholécystokinine-2 (CCK-2), du peptide de la

relâche de la gastrine (GRP), de la neurotensine (NT), du peptide intestinal vasoactif (VIP), du neuropeptide Y (NPY), du peptide similaire au glucagon (GLP), du facteur de la relâche de la corticotropine (CRF) et de la neurokinine 1 (NK1) (REUBI *et al.*, 2005) ainsi que le récepteur du facteur de croissance épithélial (EGF) (WEINER et THAKUR, 2002) en sont des exemples. Ces récepteurs sont hautement surexprimés au niveau des cellules cancéreuses. Par contre, pour permettre un meilleur diagnostic, il est important d'identifier des récepteurs qui sont absents ou exprimés faiblement au niveau du tissu sain correspondant, offrant ainsi une excellente spécificité de détection. Dans le cadre de ce projet, notre intérêt s'est porté sur le récepteur du GRP puisqu'il n'est que très faiblement présent au niveau des tissus mammaires et prostatiques normaux et fréquemment surexprimé pour les cancers correspondants (SUN *et al.*, 2000; HALMOS *et al.*, 1995).

## 2. Les récepteurs de la famille de la bombésine

### 2.1 Généralités

La bombésine (BBN) est un peptide de 14 acides aminés qui a été isolé en 1971 de la peau de la grenouille *Bombina Bombina* par Anastasi et son équipe (ANASTASI *et al.*, 1971). Le premier analogue de la bombésine chez les mammifères a été isolé de l'estomac de porc. Il a été nommé peptide de la relâche de la gastrine (GRP) puisqu'il permet une relâche abondante de la gastrine de ce tissu (MCDONALD *et al.*, 1978; MCDONALD *et al.*, 1979). Un second peptide analogue de la bombésine, la neuromédine B (NMB), a été identifié en 1983 au niveau de la moelle épinière porcine (MINAMINO *et al.*, 1983). Le seul analogue de la bombésine exprimé chez l'humain est le GRP.

Les récepteurs de la famille de la bombésine se divisent en quatre sous-types : BB1, BB2, BB3 et BB4. Tous ces récepteurs appartiennent à la super famille des récepteurs couplés à une protéine G. Ainsi, ces récepteurs possèdent 7 domaines transmembranaires, une queue cytosolique à laquelle la protéine G se couple et un segment extracellulaire permettant la spécificité de liaison. La signalisation de ces récepteurs implique principalement l'activation de la phospholipase C, mais également la phosphorylation de plusieurs protéines sur leur résidu tyrosine sans toutefois activer l'adénylate cyclase. (JENSEN *et al.*, 2008).

## 2.2 Le récepteur du peptide de la relâche de la gastrine

Le récepteur du peptide de la relâche de la gastrine (GRPR) ou BB2 humain est un récepteur de 384 acides aminés liant sélectivement le peptide de la relâche de la gastrine (GRP). L'expression du GRPR dans l'organisme sain est élevée au niveau du pancréas (TANG *et al.*, 1997), moyenne pour le système gastro-intestinal de l'œsophage au rectum et relativement faible pour le système nerveux central et les glandes surrénales (XIAO *et al.*, 2001). Chez le primate, les régions du système nerveux central présentant le GRPR sont l'amygdale, l'hypothalamus et l'hippocampe (SANO *et al.* 2004). Le GRPR est impliqué dans un grand nombre de processus physiologiques, dont la contraction du muscle lisse au niveau gastro-intestinale et uro-génital principalement en ce qui a trait à la motilité et au péristaltisme (JENSEN *et al.*, 2008; GRIDER, 2004), des effets sur les cellules immunitaires, la stimulation de la sécrétion ou la relâche d'hormones incluant l'insuline, la croissance de certains tissus normaux ou néoplasiques (PATEL *et al.*, 2006),



la régulation du cycle circadien (KALLINGAL et MINTZ, 2007), la thermorégulation, l'anxiété et certains troubles neurodégénératifs et psychiatriques (ROESLER *et al.*, 2006), la satiété (JENSEN *et al.*, 2008) ainsi que la réponse au stress (MOODY et MERALI, 2004).

### 2.3 Implication dans le cancer

Les récepteurs de la famille de la bombésine sont des récepteurs surexprimés dans une grande variété de cancers (REUBI *et al.*, 2002). Par exemple, les cancers de la prostate (MARKWALDER et REUBI, 1999; BARTHOLDI *et al.*, 1998; SUN *et al.*, 2000), du sein (HALMOS *et al.*, 1995; GUGGER et REUBI, 1999), des ovaires (SUN *et al.*, 2000), du pancréas (EHLERS *et al.*, 2000; TANG *et al.*, 1997), de l'utérus (FLEISCHMAN *et al.*, 2005), des reins (HEUSER *et al.*, 2005), du colon (HAVE et al., 2000; SAURIN, 1999) et des poumons (UCHINDA *et al.*, 2002) ont été identifiés pour surexprimer au moins un sous-type des récepteurs de la famille de la bombésine.

Dans le cadre de ce projet, le cancer de la prostate et du sein sont les cancers ciblés vu leur grande prévalence clinique. Pour ce qui est du cancer de la prostate, la surexpression des différents sous-types réceptoriels a été étudié par Sun *et al.* par RT-PCR et par essais de liaison. D'après leurs résultats de RT-PCR, 91%, 14% et 9% des échantillons de tissus de cancer de la prostate humain présentent l'ARN messager pour le GRPR, le NMBR et le BB3 respectivement (SUN *et al.*, 2000) indiquant une surexpression plus marquée au niveau du GRPR. Des essais de liaison ont démontré que

le GRPR était présent à la surface de 63% des échantillons (SUN *et al.*, 2000). Le GRPR est surexprimé à la surface de cellules cancéreuses de la prostate à un stade précoce de la carcinogénèse et corrèle positivement avec la présence d'androgène pour les cancers hormono-dépendants (MARKWALDER et REUBI, 1999). De plus, cette surexpression a également été observée pour des cancers de la prostate hormono-indépendants (MARKWALDER et REUBI, 1999; SMITH *et al.*, 2003). Il a été rapporté que les tissus prostatiques hyperplasiques présentent une expression de GRPR qui est environ 20 fois inférieure aux tissus cancéreux correspondants (MARKWALDER et REUBI, 1999). En ce qui a trait au cancer du sein, le niveau d'expression du GRPR corrèle positivement avec la présence de récepteurs de l'œstrogène (HALMOS *et al.*, 1995). Par contre, il ne s'agit pas d'une expression concomitante des deux récepteurs. En fait, le GRPR est exprimé par plusieurs lignées cellulaires et tissus cancéreux mammaires hormono-indépendants ce qui en fait une cible intéressante pouvant cibler l'ensemble des cellules cancéreuses mammaires et ce sans se limiter à une caractéristique telle la dépendance aux hormones. Halmos et al ont tout de même démontré que l'expression du GRPR était retrouvé dans les mêmes proportions pour les tumeurs mammaires des femmes âgées de plus de 40 ans sans préciser le statut de la ménopause, mais exempt des tumeurs pour les patientes âgées de moins de 40 ans laissant supposer un lien entre l'âge de la patiente et la présence du GRPR au niveau de la tumeur (HALMOS *et al.*, 1995). L'intérêt de ce récepteur réside en l'absence du GRPR au niveau du tissu mammaire sain correspondant (GIACHETTI *et al.*, 1990). Le GRPR est surexprimé dans 65% et 68% des cas de carcinomes canaux non-invasifs et invasifs respectivement. De plus, le GRPR est également surexprimé dans 100% des métastases issues d'un carcinome mammaire qui présentait la surexpression du GRPR (GUGGER et REUBI, 1999).

Le GRPR a été grandement étudié au niveau de ses implications dans un contexte tumoral. Entre autres, l'expression du GRPR a été associée à la transformation néoplasique (ALBRECHT *et al.*, 2004), la migration cellulaire (APRIKIAN *et al.*, 1997; NAGAKAWA *et al.*, 1998), la prolifération (BOLOGNA *et al.*, 1989; NAGAKAWA *et al.*, 1998) ainsi qu'à la capacité d'invasion de ces cellules (FESTUCCIA *et al.*, 2002; ISHIMARU *et al.*, 2002; FESTUCCIA *et al.*, 1998) dans le cas du cancer de la prostate. Plusieurs carcinomes humains ont été rapportés comme stimulant leur prolifération via le GRPR de façon autocrine et paracrine. Le GRPR est considéré mitogène, c'est-à-dire favorisant la prolifération. Ainsi, il pourrait être un marqueur du phénotype malin de ces cellules tumorales et être utilisé pour le suivi au traitement (BOLD *et al.*, 1998). À la lumière de ces études, le GRPR est une cible de choix pour la détection du cancer du sein et de la prostate. Pour cibler ce récepteur *in vivo*, des radiotraceurs peptidiques ciblant le GRPR ont été préparés afin de permettre le diagnostic de ces cancers par l'imagerie TEP. Les peptides radiomarqués combinés à l'imagerie TEP sont considérés comme étant une méthode simple et efficace pour cibler le GRPR *in vivo*.

### 3. Tomographie d'émission par positrons

#### 3.1 Principes de la tomographie d'émission par positrons

La TEP est une modalité d'imagerie permettant de mesurer le métabolisme, la physiologie et l'expression spécifique de récepteurs *in vivo*. L'intérêt de la TEP réside en sa capacité d'étudier ces processus biochimiques *in vivo* de façon non-invasive. En fait, la TEP permet de caractériser directement au niveau moléculaire les dérèglements

métaboliques et fonctionnels à l'origine des pathologies (LECOMTE, BENTOURKIA et BÉNARD, 2002).

Lors d'un examen TEP, un patient se voit injecter un radiotraceur contenant un atome radioactif émetteur de positron ( $\beta^+$ ). L'imagerie TEP exploite la désintégration de type bêta-plus. Il s'agit de la désintégration d'un atome radioactif riche en protons durant laquelle un proton est converti en neutron ce qui mène à l'émission d'un  $\beta^+$  et d'un neutrino ( $\nu$ ) qui se partagent l'énergie émise. Suite à la désintégration, le  $\beta^+$  parcourt quelques millimètres dans le tissu en perdant de l'énergie (SAHA, 2004). Puis, il s'annihile avec un électron du milieu. Cette annihilation cause l'émission de deux photons de 511 kilo-électron-volt (keV) chacun dans des directions opposées. Les détecteurs du tomographe d'émission par positrons détectent en coïncidence ces photons. Selon les principes de reconstruction tomographique, il est possible de déterminer l'endroit de provenance de ces photons d'annihilation. Ainsi, l'image obtenue correspond au site de l'annihilation du positron et non au site d'émission de ce dernier.

La TEP possède deux limitations physiques contribuant à la détérioration de la résolution spatiale. Premièrement, la co-linéarité imparfaite des photons d'annihilation. Les photons d'annihilation sont émis à  $180^\circ \pm 0.25^\circ$ . La seconde limitation est la portée du positron. Plus le  $\beta^+$  émis possède de l'énergie, plus il voyagera dans le milieu avant de s'annihiler. La distance parcourue par le  $\beta^+$  entre son émission et son annihilation est nommée portée du  $\beta^+$ . Une longue portée du  $\beta^+$  entraîne donc une détérioration de la résolution spatiale. Malgré ces limitations, le TEP est la modalité d'imagerie offrant la

plus grande sensibilité de détection permettant même la visualisation *in vivo* de récepteurs.

#### 4. Radiotraceurs

##### 4.1 Généralités

Par définition, un radiotraceur, également appelé radiopharmaceutique une fois approuvé pour sa mise en marché par une agence réglementaire, est un composé marqué d'un atome radioactif détectable permettant son suivi dans un organisme. Environ 95% des radiopharmaceutiques utilisés en médecine nucléaire servent à des fins diagnostiques. Un radiopharmaceutique doit être sécuritaire et non toxique. En général, les radiopharmaceutiques n'ont qu'un effet pharmacologique très faible, voire négligeable, puisque les radiotraceurs sont administrés selon un dosage sub-pharmacologique qui ne présente aucune relation dose-réponse. Le choix du radio-isotope utilisé est important et doit prendre en considération que le rayonnement émis soit facilement détectable par les appareils d'imagerie et que le patient soit minimalement exposé aux radiations. (SAHA, 2004).

Plusieurs facteurs peuvent modifier la clairance et la distribution d'un radiotraceur dans l'organisme, entre autre, la charge, la solubilité et la taille de la molécule ainsi que la liaison aux protéines plasmatiques. Durant le développement d'un radiotraceur, il est primordial d'étudier l'affinité du traceur pour sa cible, sa stabilité *in vitro* et *in vivo* (SAHA, 2004) avant de procéder aux études de distribution.

Au cours des dernières années, on a observé une augmentation importante du nombre de peptides radio-marqués en tant que radiotraceurs pour le diagnostic du cancer. L'utilisation de peptides comme radiotraceurs présente plusieurs avantages. Il s'agit de molécules de petite taille et de faible poids moléculaire, ce qui leur confère une excellente perméabilité vasculaire. De plus, ils présentent une faible toxicité et immunogénicité. Effectivement, ayant des structures similaires à celle des peptides endogènes, ils présentent des caractéristiques comparables, ce qui limite les risques de toxicité, d'effets secondaires et de réactions immunitaires. Par ailleurs, la clairance sanguine et tissulaire des peptides est rapide, ce qui permet d'atteindre d'excellents ratios de captation tumeur/tissu non-cible. Les peptides sont faciles à synthétiser et à modifier en plus d'être tolérants à la substitution par un chélateur permettant le marquage à partir de radiométaux. Ils sont ainsi faciles à radiomarquer et ont une grande affinité pour leurs récepteurs (REUBI, 2003).

#### 4.2 Radiotraceurs peptidiques ciblant le GRPR

Depuis plusieurs années, le développement de radiotraceurs ciblant le GRPR est un domaine de recherche effervescent. Plusieurs peptides radiomarqués ont été étudiés par différents groupes de recherche incluant notre groupe du Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke. Le tableau 1 présente quelques exemples de radiotraceurs ciblant le GRPR tant pour le diagnostic que pour le traitement de divers cancer.

Dans le cadre de ce projet de recherche, un peptide synthétique, le [D-Phe<sup>6</sup>, β-Ala<sup>11</sup>, Thi<sup>13</sup>, Nle<sup>14</sup>]Bombesin(6-14) (BBN(6-14)) (MANTEY *et al.*, 1997) a été utilisé

comme composé modèle (GUÉRIN *et al.*, 2010a). Il s'agit d'un analogue de la bombésine contenant la séquence en acides aminés essentielle à sa liaison aux GRPR. De plus, plusieurs acides aminés non-naturels ont été intégrés à sa séquence de manière à augmenter sa stabilité *in vivo*. Il s'agit d'un peptide unique ayant la propriété de se lier avec grande affinité au GRPR. Un chélateur NOTA a été ajouté au BBN(6-14) en position *N*-terminale de manière à permettre le marquage du peptide à partir de radiométaux (GUÉRIN *et al.*, 2010a). Le peptide modèle pour le projet est le NOTA-PEG-BBN(6-14) présenté à la figure 1.

Figure 1. Structure chimique du NOTA-PEG-BBN(6-14)

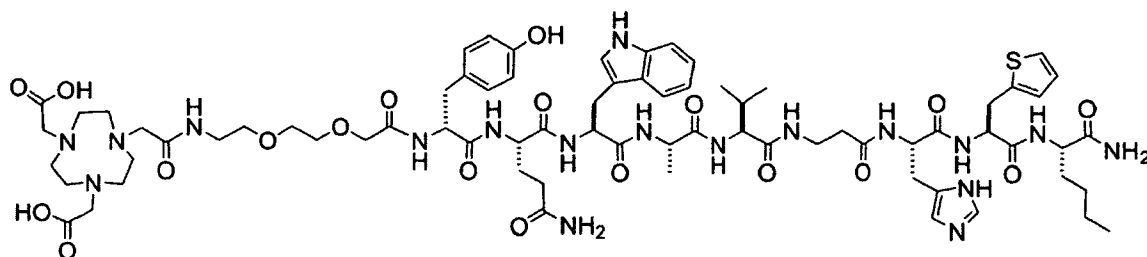


Tableau 1 : Exemples de radiotraceurs peptidiques ciblant les GRPR utilisés en diagnostic ou en traitement pour le cancer.

Peptide	Isotope	Référence
DOTA-PESIN	$^{67/68}\text{Ga}$ , $^{177}\text{Lu}$	Zhang <i>et al</i> , 2007
DOTA-[Lys3]BBN	$^{64}\text{Cu}$	Chen <i>et al</i> , 2004
	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Ferro-Flores <i>et al</i> , 2006
[Lys3]-BBN	$^{18}\text{F}$	Zhang <i>et al</i> , 2006
DOTA-BBN(7-14)	$^{64}\text{Cu}$	Yang <i>et al</i> , 2006
	$^{177}\text{Lu}$	Smith <i>et al</i> , 2003
BBN(7-14)	$^{188}\text{Re}$	Smith <i>et al</i> , 2003
NOTA-BBN(7-14)	$^{64}\text{Cu}$	Prasanphanich <i>et al</i> , 2007
	$^{68}\text{Ga}$	Liu <i>et al</i> , 2009
DOTA-BBN(6-14)	$^{68}\text{Ga}$	Schuhmacher <i>et al</i> , 2005
	$^{177}\text{Lu}$	Pujatti <i>et al</i> , 2010
AMBA	$^{177}\text{Lu}$	Lantry <i>et al</i> , 2006
Demobesin 1	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Nock <i>et al</i> , 2003
Demobesin 4	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Nock <i>et al</i> , 2005
Bomproamide	$^{111}\text{In}$	Abd-Elgaliel <i>et al</i> , 2008



## 5. Facteurs influençant les propriétés biologiques des radiotraceurs peptidiques

Pour ce projet, nous avons choisi d'utiliser des peptides substitués par un chélateur qui permet la complexation d'un radiométal émetteur de positrons détectable en imagerie TEP. L'utilisation des chélateurs facilite le marquage de peptides en deux étapes nécessitant simplement une incubation en présence du radiométal suivie d'une purification.

Au cours du développement de différents radiotraceurs, plusieurs facteurs ont été recensés comme pouvant modifier leurs caractéristiques de biodistribution et d'efficacité de détection, incluant le radio-isotope utilisé, le choix du chélateur, la séquence peptidique, la multiplicité du peptide et l'espaceur qui relie le peptide et le chélateur. Dans le cadre de ce projet, trois facteurs—le type de radiométal, la multiplicité du ligand peptidique et la distance entre les ligands—ont été variés de manière à évaluer leur impact sur les propriétés biologiques des radiotraceurs étudiés.

### 5.1 Choix du radio-isotope pour le marquage

Pour la tomographie d'émission par positrons, le choix du radio-isotope a une grande importance puisqu'il ne doit pas nuire à l'affinité et aux performances *in vivo* du peptide radiomarqué (HOFFMAN, QUINN et VOLKERT, 2001). De plus, le radio-isotope utilisé doit avoir une demi-vie appropriée au type d'imagerie voulue puisque une demi-vie trop courte ne permettra pas d'observer les phénomènes biologiques désirés, alors qu'une demi-vie trop longue entraînera une dose de radiation plus grande et non

nécessaire (SAHA, 2004). L'énergie du positron émis est également un facteur à considérer. Effectivement, plus cette énergie est élevée, plus le positron voyagera avant de se désintégrer avec un électron du milieu, réduisant ainsi la résolution spatiale de l'image TEP obtenue et augmentant la dose au patient. Parmi les radio-isotopes les plus couramment utilisés en imagerie TEP, on retrouve le fluor-18 ( $^{18}\text{F}$ ), le cuivre-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ), le carbone-11 ( $^{11}\text{C}$ ), l'azote-13 ( $^{13}\text{N}$ ), l'oxygène-15 ( $^{15}\text{O}$ ), le gallium-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ) et l'iode-124 ( $^{124}\text{I}$ ).

Le cuivre-64 est un radio-isotope de 12,7 heures de demi-vie pouvant servir à l'imagerie et au traitement. Le  $^{64}\text{Cu}$  se désintègre selon trois processus; par émission  $\beta^+$  à 19%, par émission  $\beta^-$  à 40% et par la capture électronique menant à l'émission d'électron Auger à 41% (HEPPELER *et al.*, 2000). Lors de la désintégration  $\beta^+$ , le positron émis présente une énergie de 0,65 MeV ce qui est idéal pour son utilisation en imagerie TEP (LECOMTE, BENTOURKIA et BÉNARD, 2002). Le  $^{64}\text{Cu}$  est produit par bombardement à l'aide d'un faisceau de proton d'une cible solide enrichie en  $^{64}\text{Ni}$  selon la réaction suivante :  $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ . Les produits de désintégration du  $^{64}\text{Cu}$  sont du  $^{64}\text{Ni}$  pour la désintégration  $\beta^+$  et la capture électronique et du  $^{64}\text{Zn}$  pour la désintégration  $\beta^-$ . Pour l'imagerie de peptide marqué au  $^{64}\text{Cu}$ , il faut donc s'assurer d'utiliser des chélateurs formant un complexe très stable *in vivo* afin d'éviter la présence de  $^{64}\text{Cu}$  libre. En effet, le cuivre est responsable de plusieurs processus enzymatiques et il peut se lier à plusieurs protéines plasmatiques telles que la métallothionéine, les ATPases transporteurs de cuivre, le cytochrome oxidase et la superoxide dismutase. Les hépatocytes du foie sont les principales cellules impliquées dans l'homéostasie du cuivre. Le cuivre peut être remis en circulation en se liant à la céruloplasmine dans le foie. Toutefois, une quantité excessive

de cuivre mène à une oxydation des biomolécules et à des dommages cellulaires (BISSIG *et al.*, 2005).

Le gallium-68 est un radio-isotope de 68 minutes de demi-vie pouvant servir à l'imagerie TEP. Cette demi-vie correspond à la pharmacocinétique de plusieurs peptides et autres petites molécules (BREEMAN et VERBRUGGEN, 2007). Le  $^{68}\text{Ga}$  se désintègre selon deux processus : par émission  $\beta^+$  à 89%, ce qui est idéal pour son utilisation en imagerie TEP (DIJGRAAF *et al.*, 2011) et une faible émission de photons de 1.077 keV avec une intensité de 3,22%. Lors de la désintégration  $\beta^+$ , le positron émis présente une énergie maximale de 1.9 MeV (LECOMTE, BENTOURKIA et BÉNARD, 2002). Le  $^{68}\text{Ga}$  est obtenu à partir d'un générateur  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  commercial. Le générateur possède une matrice sur laquelle du  $^{68}\text{Ge}$  ( $T_{1/2} = 270.8$  jours) est lié. Puis, lorsque ce dernier se désintègre, du  $^{68}\text{Ga}$  est formé. Le  $^{68}\text{Ga}$  peut, par la suite, être élué sélectivement du générateur et est prêt à l'utilisation. Cette opération peut être répétée toutes les quatre heures. Ainsi, aucun cyclotron n'est nécessaire pour la production du  $^{68}\text{Ga}$  et permet l'accessibilité aux nouveaux radiotraceurs à un plus grand nombre de centre d'imagerie (BREEMAN et VERBRUGGEN, 2007). Le produit de désintégration du  $^{68}\text{Ga}$  est du  $^{68}\text{Zn}$  pour la désintégration  $\beta^+$ . Le gallium est un métal présent normalement sous forme de trace chez l'humain.

Dans le cadre de ce projet, un peptide, le NOTA-BBN(6-14), sera radiomarcué au  $^{64}\text{Cu}$  et au  $^{68}\text{Ga}$ . Puis, une comparaison sera réalisée en termes d'affinité, de stabilité, de biodistribution et de potentiel de détection en imagerie TEP pour le cancer du sein et de la prostate. Ces deux radiométaux présentent des différences marquées au niveau de leur

demi-vie, de l'énergie de leur positron et de la méthode de production. Ainsi, cette comparaison permettrait de déterminer lequel de ces radio-isotopes est le plus approprié pour l'imagerie TEP du cancer du sein et de la prostate ciblant les GRPR à partir de nos composés

## 5.2 La multiplicité du composé peptidique

Un autre aspect à considérer pour le développement d'un radiotraceur peptidique est la multiplicité ou valence. Il s'agit de combiner plusieurs séquences peptidiques (ligands) par l'intermédiaire d'un espaceur au sein d'une même molécule (HANDL *et al.*, 2004). Les multimères peuvent prendre plusieurs formes et contenir un nombre variable de ligands. Deux grandes catégories de multimères existent. Il s'agit des hétéromultimères composés de différents ligands pour le criblage de plusieurs cibles et des homomultimères qui contiennent plusieurs copies du même ligand visant ainsi qu'une seule cible. Pour les multimères, une affinité augmentée est attendue selon un effet statistique. En fait, la liaison à la surface d'un ligand du multimère augmente la concentration à la surface de la cellule des autres ligands. Ainsi, le détachement du premier ligand du multimère est plus facilement suivi par le rattachement d'un autre si d'autres cibles sont à proximité (HANDL *et al.*, 2004).

Les radiotraceurs multimériques les mieux étudiés reposent sur une courte séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD) qui permet de lier spécifiquement l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  souvent surexprimée au niveau des cellules cancéreuses (LIU, 2009; LI, CHEN et CHEN, 2008; DIJKGRAAF *et al.*, 2007). Le monomère, un seul ligand par molécule,

possède une affinité acceptable pour l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , mais la captation tumorale *in vivo* s'est avérée insuffisante. Cependant, l'homodimère (2 ligands) et l'homotétramère (4 ligands) dérivés du RGD ont conduit à une excellente captation et rétention tumorale dans un modèle de xéno greffe du cancer de l'ovaire SK-RC-52. Plusieurs conclusions importantes sont tirées de ces travaux. L'affinité et la captation tumorale augmentent avec la valence du radiotracer. Par contre, l'accumulation des traceurs multimériques est également augmentée au niveau des organes non-cibles, particulièrement le foie, les reins, la rate et les poumons, ce qui pourrait s'expliquer par une élimination plus lente des traceurs dû à leur poids moléculaire plus élevé. Ainsi, le radiotracer offrant le meilleur compromis entre l'affinité, la captation tumorale et l'accumulation non-spécifique était l'homodimère du RGD (LIU, 2009; LI, CHEN et CHEN, 2008; DIJKGRAAF *et al.*, 2007).

Trois différents groupes de recherche ont déjà réalisé certaines études sur des dimères ciblant le GRPR. Gawlak *et al.* ont préparé un homodimère ciblant le GRPR présentant une affinité similaire à celle du monomère correspondant. D'autre part, Carrithers et Lerner ont synthétisé un homodimère ayant une affinité de cinq à sept fois plus élevée que celle du monomère (GAWLAK *et al.*, 1991; CARRITHERS et LERNER, 1996). Ces résultats nous laissent supposer que l'optimisation du design de l'homodimère pourrait conduire à des composés de plus grande affinité. Gawlak *et al.* ont également observé un changement du caractère agoniste de leur peptide. En effet, le monomère étudié était un agoniste tandis que l'homodimère possédait des propriétés antagonistes basées sur sa capacité à provoquer une relâche de calcium intracellulaire (GAWLAK *et al.*, 1991). Une seule étude a été rapportée à ce jour sur la captation cellulaire des dimères ciblant le

GRPR dans laquelle la dimérisation a permis d'augmenter la captation cellulaire et la rétention de l'homodimère marqué au  $^{177}\text{Lu}$  sur des cellules cancéreuses de la prostate (ABIRAJ *et al.*, 2008). Beaucoup d'études restent à être complétées afin de déterminer tout le potentiel des homodimères ciblant le GRPR.

Dans le cadre de ce projet, nous avons comparé l'affinité pour le GRPR, la captation et la rétention cellulaire ainsi que la biodistribution et l'imagerie TEP d'un monomère du BBN(6-14) à deux homodimères du BBN(6-14) composés d'espaces de longueur différente.

## LES OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Les radiotraceurs utilisés en oncologie clinique présentement reposent majoritairement sur le principe du métabolisme cellulaire et non le type cellulaire. On peut donc visualiser le cancer de manière indirecte seulement via la différence de métabolisme des divers types cellulaires. Il s'agit donc d'un principe d'imagerie de contraste métabolique. Or, il arrive parfois que certains types de cancer possèdent des cellules à métabolisme lent tel que le cancer de la prostate. Dans ces cas, il est impossible de visualiser le cancer par imagerie TEP avec les traceurs conventionnels comme le FDG. De plus, il est impossible avec ces radiotraceurs de déterminer l'agressivité d'une tumeur (ZHANG *et al.*, 2004).

Le GRPR est un récepteur hautement surexprimé dans les cas de cancer du sein et de la prostate. La faible expression de ce récepteur dans ces deux tissus sains en fait donc une cible de choix pour le diagnostic spécifique de ces cancers par imagerie TEP à l'aide de peptides radiomarqués. Cette étude vise deux objectifs, soit l'évaluation de deux paramètres pour améliorer le potentiel diagnostique des traceurs peptidiques ciblant les GRPR au niveau du cancer du sein et de la prostate. Le premier objectif est d'évaluer et de comparer la capacité de détection d'un radiotraceur peptidique ciblant le GRPR complexé à deux radio-isotopes différents, le  $^{64}\text{Cu}$  et le  $^{68}\text{Ga}$ , en terme d'affinité, de stabilité, de captation cellulaire, d'internalisation, de biodistribution et de détection par imagerie TEP pour le cancer du sein et de la prostate. Le second objectif est d'évaluer et de comparer un peptide monomérique du BBN(6-14) et deux peptides homodimériques

marqués au  $^{64}\text{Cu}$  pour la détection du cancer de la prostate. Ces radiotraceurs sont comparés en termes d'affinité, de stabilité, de captation cellulaire, d'efflux, de biodistribution et de détection par imagerie TEP.



## ARTICLE I

Nouveaux peptides radiomarqués pour l'imagerie TEP du cancer du sein et de la prostate : le  $^{64}\text{Cu}$  et  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14)

Patrick Fournier, Véronique Dumulon-Perreault, Samia Ait-Mohand, Sébastien Tremblay, François Bénard, Roger Lecomte et Brigitte Guérin

*Bioconjugate Chemistry* 2012, **23**(8) :1687-1693

Cette étude fait suite à notre exploration de l'impact du radio-isotope utilisé pour le marquage de traceur peptidique ciblant le GRPR sur le potentiel diagnostique du cancer du sein et de la prostate. Le NOTA-PEG-BBN(6-14) a été marqué au  $^{64}\text{Cu}$  et au  $^{68}\text{Ga}$ . Puis, les deux traceurs résultant ont été comparés au niveau de leur affinité pour le GRPR, leur stabilité *in vivo*, leur captation tumorale *in vitro* et *in vivo* ainsi que leur biodistribution. Les résultats ont permis de conclure que le radiométal utilisé pour le marquage pouvait influencer l'affinité du composé peptidique pour le GRPR et par conséquent sa captation spécifique. Toutefois, le profil d'élimination du composé ne semble pas modifié. Par ailleurs, cette étude corrobore la présence de différents types de GRPR selon les espèces étudiées, soit la souris et l'humain.

# **Novel radiolabeled peptides for breast and prostate tumor PET imaging: $^{64}\text{Cu}$ / and $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-[D-Tyr<sup>6</sup>, $\beta$ Ala<sup>11</sup>,Thi<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>]BBN(6-14)**

Fournier Patrick,<sup>†</sup> Dumulon-Perreault Véronique,<sup>†</sup> Ait-Mohand Samia,<sup>†</sup> Tremblay Sébastien,<sup>†</sup> Bénard François,<sup>‡</sup> Lecomte Roger,<sup>†</sup> Guérin Brigitte<sup>†\*</sup>

<sup>†</sup>Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke (CIMS), Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke and , Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Université de Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North Sherbrooke, QC, Canada, J1H 5N4

<sup>‡</sup>BC Cancer Agency Research Centre, Vancouver, BC, Canada.

\*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

Bombesin (BBN)-based radiolabeled peptides exhibit promising properties for targeted imaging of gastrin-releasing peptide receptors (GRPR)-positive tumors. The aim of this study was to evaluate with positron emission tomography (PET) the pharmacokinetic and imaging properties of two novel BBN-based radiolabeled peptides,  $^{64}\text{Cu}$  and  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14), for diagnosis of breast and prostate cancers using small animal models. Competitive binding assays on T47D breast and PC3 prostate cancer cells showed that the affinity for GRPR depends on the complexed metal and can vary up to a factor of about 3;  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) was found to have the lowest inhibition constant ( $1.60 \pm 0.59$  nM).  $^{64}\text{Cu}$  and  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) presented similar cell uptake on T47D and PC3 cells and were stable *in vivo*. Biodistribution studies of radiolabeled peptides carried out in Balb/c and tumor-bearing Balb/c nude mice showed that  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) presented higher GRPR-mediated uptake in pancreas and adrenal glands, but comparable PC3 tumor uptake as  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14). Finally, receptor-dependent responses were observed during blocking studies with unlabeled peptide in both biodistribution and small-animal PET imaging studies. Our results confirmed the dependence of the affinity and pharmacokinetics of BBN-based radiopeptides on the complexed radiometal. Interspecies differences between mouse and human GRPR binding properties were also noted in these preclinical studies. Considering their good imaging characteristics, both  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) and  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) are promising candidates for GRPR-targeted PET imaging of breast and prostate cancers.

## INTRODUCTION

Prostate and breast cancers are respectively the most frequently diagnosed cancers for males and females in North America. One promising diagnosis approach is the utilization of target-specific radiolabeled peptides for positron emission tomography (PET) imaging of these cancers. Gastrin-releasing peptide (GRP) is a 27 amino acids peptide that displays a wide range of physiological effects, including gastric and pancreatic secretion, nervous system stimulation, smooth muscle contraction, blood pressure and the regulation of cell growth in some malignant cell lines (1,2). The presence of the gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) has been documented in many cancers including prostate (3,4) and breast cancers (5,6). GRPR is overexpressed in 84% of all human prostate cancers (4) and 65-70% of breast cancer carcinomas (7). These receptors represent an interesting molecular target for radiolabeled bombesin analogs as diagnostic or radiotherapeutic agents for prostate and breast cancers.

Bombesin (BBN), a 14 amino acids potent GRPR agonist, is involved in regulating exocrine secretion, smooth muscle contraction and gastrointestinal hormone release (8), and is widely expressed in the central nervous system (9). [D-Tyr<sup>6</sup>,βAla<sup>11</sup>,Thi<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>]BBN(6-14) [BBN(6-14)] is a potent modified BBN-based peptide that binds to GRPR with high affinity (10). Various BBN analogs have already been labeled with radiometals and used for PET imaging of GRPR-positive tumors (11-14). Indeed, the use of radiometal/chelator complexes for labeling is easy and convenient and the most commonly used radiometals for PET imaging with peptides are <sup>64</sup>Cu and <sup>68</sup>Ga. <sup>64</sup>Cu has a mean positron energy of 0.66 MeV, similar to that of <sup>18</sup>F, and a half-life of 12.7 h. <sup>68</sup>Ga emits a high mean energy positron (1.90 MeV) and has a short half-life of 68 minutes.

Our laboratory has reported the synthesis and the characterization of DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid) and NOTA (1,4,7-

triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid)-BBN derivatives and showed that the NOTA-BBN(6-14) had an inhibition constant value slightly lower than that of the DOTA-BBN(6-14) analog (15). NOTA is well-described for its efficient complexation properties of both  $^{64}\text{Cu}$  and  $^{68}\text{Ga}$ . Moreover, the resulting complexes showed high resistance to transmetallation reactions *in vivo* (16,17). Liu *et al.* reported similar tumor uptake for their NOTA-heterodimer labeled with  $^{64}\text{Cu}$  and  $^{68}\text{Ga}$  (18). On the other hand, Fani *et al.* observed higher affinity for  $^{64}\text{Cu}$ /NODAGA-peptide (NOGADA being a closely chemically triazacyclononane derivative of NOTA) compared to  $^{68}\text{Ga}$ /NODAGA-peptide, but no significant difference in tumor uptake (19). In this study, we report a direct comparison of a novel NOTA-PEG-BBN(6-14) peptide bearing either  $^{64}\text{Cu}$  or  $^{68}\text{Ga}$  in terms of labeling, stability, affinity, cellular uptake, biodistribution and  $\mu\text{PET}$  imaging of breast and prostate tumors in order to fully compare the diagnostic properties of these peptides.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Peptide synthesis.** We recently reported the synthesis, characterization and biological activity of the NOTA-BBN(6-14) peptide (20). Briefly, using NovaSyn® TGR resin, a 2-fold excess of Fmoc-protected amino acids over resin substitution rate was utilized for coupling. Fmoc-protected amino acids were activated for coupling with an equimolar amount of HATU (2-(1H-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexa-fluorophosphate) and 2-fold excess of DIEA (diisopropylethylamine). Fmoc deprotection was performed in 20% piperidine in DMF. After peptide assembly, the

NOTA moiety was synthesized manually on the solid phase under a mechanic agitation as described previously by our group (15). The peptide was deprotected and cleaved from the support by treatment with a cocktail of TFA/H<sub>2</sub>O/thioanisole (92:2:6, v/v/v) for 4 h at room temperature under mechanical agitation to yield the desired peptide. Purity of the crude peptide was verified by high performance liquid chromatography (HPLC) and its identity was confirmed by API 3000 LC/MS/MS.

**Cell culture.** The human prostate cancer PC3 and human breast cancer T47D cell lines were respectively used in their 8<sup>th</sup> to 12<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> to 35<sup>th</sup> passage after receipt and were cultured in HAM'S/F-12 and RPMI 1640 medium respectively supplemented with 2.5 mM glutamin, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 100 ng/mL amphotericin B, and 10% fetal bovine serum. Cells were grown in a 5% CO<sub>2</sub> air atmosphere at 37°C.

***In vitro* receptor-binding.** Competition assays were performed on PC3 or T47D cells. The cells were cultured until near confluence in 24-well plates and the medium was replaced reaction medium (RPMI complemented with 2 mg/mL BSA, 4.8 mg/mL HEPES, 1 U/mL penicillin G and 1 µg/mL streptomycin). For the assay, equal volumes of radioactive and non-radioactive ligands were added. The concentration of [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>4</sup>]bombesin (74 TBq/mmol; Perkin Elmer Life Science Products, Boston, MA) was 10<sup>-12</sup> M. Increasing concentrations (10<sup>-6</sup> to 10<sup>-14</sup> M) of the NOTA-BBN(6-14) peptide were added. The plates were incubated for 40 min at 37°C with agitation. After the incubation, the reaction medium was removed and the cells were washed thrice with phostate-buffered saline (PBS) at room temperature. The cells were harvested and counted in a gamma counter (Cobra II auto-gamma counter, Packard, MN). Experiments were realized

three times in triplicate. Data were analysed with GraphPad Prism 5 Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) to determine the  $IC_{50}$ . Finally, the inhibition constant ( $K_i$ ) was determined using Cheng and Pursoff's formula (21). The  $K_d$  value for [ $^{125}I$ -Tyr<sup>4</sup>]bombesin has been determined previously from experiments performed under similar conditions and was found to be  $1.5 \times 10^{-10}$  M (22).

**Peptide radiolabeling with  $^{64}Cu$  and  $^{68}Ga$ .** Our EBCO TR-19 cyclotron facility provides  $^{64}Cu$  isotope on a routine basis for research purposes, using a target system developed in collaboration with Advanced Cyclotron Systems Inc. (ACSI, Richmond, BC, CA).  $^{64}Cu$  was prepared by the  $^{64}Ni(p,n)^{64}Cu$  reaction using an enriched  $^{64}Ni$  target electroplated on a rhodium disc (23). [ $^{64}Cu$ ]CuCl<sub>2</sub> was recovered from the target following the procedure of McCarthy *et al.* (24) and converted to [ $^{64}Cu$ ]copper[II] acetate ([ $^{64}Cu$ ]Cu(OAc)<sub>2</sub>) by dissolving the [ $^{64}Cu$ ]CuCl<sub>2</sub> in ammonium acetate (0.1 M; pH 5.5). Peptides were labeled with  $^{64}Cu$  following conditions optimized in our laboratory (15). Briefly, the peptide (5  $\mu$ g) were dissolved in ammonium acetate buffer (0.1M, pH 5.5) with [ $^{64}Cu$ ]Cu(OAc)<sub>2</sub> (296-370 MBq; 8-10 mCi) in a total volume of 250-300  $\mu$ L and then the resulting solution was incubated at 100°C for 10 min.  $^{68}Ga$  was obtained from a commercially available generator system (Eckert & Ziegler Isotope Products Inc) and eluted and purified according to manufacturer's instructions. Peptide labeling was realized following the procedure described by Zhernosekov *et al* (25). The peptide (3-5  $\mu$ g) was dissolved in 500  $\mu$ L of HEPES buffer (1 M, pH 4.0) in the presence of the concentrated and purified  $^{68}Ga$  (222-370 MBq; 6-10 mCi) eluted from the resin (50 mg AG 50W-X8, 400 mesh) with 400  $\mu$ L of the 97.7 % acetone/ 0.05 N HCl solution. The mixture was incubated at 100°C for 10 min. The labeled peptide was purified by HPLC using a C-18

column and a radiodetector. The amount of radiolabeled peptide was determined by the peak area of the tracer in the UV-chromatogram compared to the UV peak area of the standard unlabeled peptide. In all cases, starting materials and the radiolabeled peptide were separable. The radiolabeled peptide fraction was collected, evaporated and counted in a Capintec Radio-isotope Calibrator to calculate the specific activity of the product.

**Stability studies.** Plasma and *in vivo* stability studies were realized as previously described by our group (16). After peptide reconstitution in PBS, studies were carried out by incubating a fraction of the solution containing the radiolabeled peptide in mouse plasma for a period of 2 h for  $^{68}\text{Ga}$ /peptide and 24 h for  $^{64}\text{Cu}$ /peptide or by injecting 15-25 MBq (400-650  $\mu\text{Ci}$ ; 100  $\mu\text{L}$ ) of the appropriate radiolabeled peptide to Balb/c mice (3 mice per peptide) and regular blood withdrawn. The stability was determined by radioTLC (C-18-coated plastic sheets) directly from plasma and blood samples without further handling; free metal and purified radiolabeled peptides were used as standards. The radioTLCs were eluted with 0.1 M sodium citrate buffer at pH 5.5 using an Instant Imager system for the radiodetection.

**Cellular uptake.** Cellular uptake studies were realized three times in triplicata on T47D and PC3 cells in presence of NOTA-PEG-BBN(6-14) labeled with  $^{64}\text{Cu}$  or  $^{68}\text{Ga}$ . First, PC3 or T47D cells were seeded in 12-well plates at a density of  $2 \times 10^5$  cells per well 48 h prior to the experiment. Cells were incubated 15, 30, 60 or 90 min with 37 kBq (1  $\mu\text{Ci}$ ; 50  $\mu\text{L}$ ) of radiolabeled peptide per well at  $37^\circ\text{C}$  with agitation. Afterwards, the medium was removed and the cells were washed thrice with PBS. The cells were harvested and counted in a gamma counter. The results were expressed as percentage of added dose retained per  $10^5$  cells (%AD/ $10^5$  cells).



**Biodistribution studies.** All animal studies were conducted in compliance with the Canadian Council on Animal Care guidelines and with the approval of the Animal Care Committee of the Université de Sherbrooke. To determine the *in vivo* GRPR-targeting efficacy of labeled peptides, biodistribution were realized with a minimum of 3 mice for each time point. Mice were injected 370-740 kBq (10-20  $\mu$ Ci; 100  $\mu$ L) of either  $^{64}\text{Cu}$ / or  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) via the caudal vein. The animals were euthanized by  $\text{CO}_2$  inhalation at 30 min post-injection (p.i.). Organs of interest were then collected, weighted and measured in a gamma-counter. The results were expressed as percentage of the injected dose per gram of tissue (%ID/g). Measurements with co-injection of 0.1  $\mu$ mol of unlabeled peptide were performed to evaluate GRPR-dependent accumulation of the tracers. Biodistribution studies were conducted on Balb/c mice and tumor-bearing Balb/c nude mice. Balb/c nude mice were implanted with  $10^7$  PC3 or T47D tumors. Tumor cells were injected in 150  $\mu$ L of Matrigel (BD Biosciences, CA, USA) and PBS (2:1). Tumors were given 3 or 5 weeks to grow to the size of 5 mm in diameter for PC3 and T47D respectively. For T47D tumors, a  $17\beta$ -Estradiol pellet, (1.7 mg/ 90-day release; Innovative Research of America, FL, USA), was placed under the skin of mice one week prior to tumor implantation.

**PET imaging.** PET scans were performed using a LabPET8 (Gamma Medica Inc.) small animal scanner with an axial field of view of 7.5 cm. Xenografted Balb/c nude mice were injected 3.7-7.4 MBq (100-200  $\mu$ Ci; 100  $\mu$ L) of  $^{64}\text{Cu}$ / or  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) via the caudal vein under isoflurane anesthesia with a minimum of 3 mice for each tracer. Each animal had a 10 min static scan 30 min p.i. The images were reconstructed by a 2-dimensional MLEM algorithm implementing an analytically derived system matrix

(26). Region of interest (ROI) were traced for tumor, liver, kidney and muscle and the activity in each organ was measured at 30 min p.i. Co-injections of 0.1  $\mu\text{mol}$  of unlabeled peptide were also realized to measure GRPR-dependent accumulation of the tracers.

## RESULTS

**Peptide synthesis, labeling with  $^{64}\text{Cu}$  and  $^{68}\text{Ga}$  and stability studies.** We recently reported the synthesis, characterization and biological activity of  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14), a water soluble GRPR-targeting peptide having a LogD value of -1.91 (Figure 1) (15). This peptide (MS calc: 1570; Found: 1571 (M+1)) was prepared with a yield of 38 % based on the resin substitution rate and a purity of 99%. The labeling with the radiometals was straightforward. NOTA-PEG-BBN(6-14) was labeled at 100°C for 10 min with  $^{64}\text{Cu}$  and  $^{68}\text{Ga}$  with labeling yields superior to 90 % and specific activities of  $88.1 \pm 4.6$  TBq/mmol and  $60.5 \pm 21.6$  TBq/mmol, respectively. Both radiolabeled peptides were stable up to 2 h and 24 h respectively in mouse circulation as no trace of free  $^{64}\text{Cu}$  or  $^{68}\text{Ga}$  was detected by radioTLC. In previous work, we have demonstrated by radioHPLC that the absence of free  $^{64}\text{Cu}$  and metabolites confirmed that the peptide itself was stable *in vivo* 1 h p.i. (20).

***In vitro* experiments.** NOTA-PEG-BBN(6-14) affinity was tested on two human cancer cell lines overexpressing GRPR: T47D breast cancer and PC3 prostate cancer cells. All inhibitory constants are summarized in Table 1. NOTA-PEG-BBN(6-14) presents an excellent affinity in the low nanomolar range on T47D ( $1.27 \pm 0.95$  nM) and PC3 ( $2.51 \pm 1.54$  nM) cells comparable to bombesin, a natural ligand for GRPR. The peptide was labeled with non-radioactive Cu(II) and Ga(III) in order to evaluate the change in affinity

by addition of the metal in the chelator. The  $K_i$  values vary 3-fold between Cu(II)/ and Ga(III)/NOTA-PEG-BBN(6-14) on T47D cells. The complexation of Cu(II) to NOTA did not significantly alter the affinity of the peptide for GRPR ( $1.60 \pm 0.59$  nM) while a significantly lowered affinity was observed for the Ga(III) complex ( $4.87 \pm 1.27$  nM) ( $p < 0.05$ ). Cellular uptake of radiolabeled NOTA-PEG-BBN(6-14) were evaluated on T47D and PC3 cells. Results are presented in Figure 2.  $^{64}\text{Cu}$ / and  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) exhibit relatively similar cellular uptake on both cell lines, the gallium analog showing however a slightly higher uptake than the copper analog especially in the T47D cells. Cellular uptake results are all significantly higher on T47D when compared to the corresponding condition on PC3 cells after 60 min. At all-time points, internalization of the peptides represented around 80 % of the total cellular uptake (data not shown).

**Biodistribution studies.** Biodistribution studies of  $^{64}\text{Cu}$ / and  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) were carried out in Balb/c mice 30 min p.i. Results are summarized in Table 2.  $^{64}\text{Cu}$ / and  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) present similar biodistribution patterns with high uptake in the GRPR rich tissues (pancreas and adrenal glands) (27).  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) presents a significantly higher pancreas and adrenal glands uptake than  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) ( $p < 0.05$ ). In order to assess the GRPR-mediated accumulation of the tracers, biodistribution studies were repeated with co-injection of 0.1  $\mu\text{mol}$  of unlabeled peptide. Co-injection of unlabeled NOTA-PEG-BBN(6-14) slightly increased the tracer levels in blood, kidneys and muscle as well as most others organs. Significant decreases in pancreas and adrenal glands uptake were observed for both  $^{64}\text{Cu}$ / and  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) indicating GRPR-mediated uptake in these organs ( $p < 0.05$ ). Other measured organs presented low uptake and no significant difference between both tracers.

**PET imaging.** Decay-corrected transaxial PET images of  $^{64}\text{Cu}$ / and  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) in PC3 and T47D tumor-bearing Balb/c nude mice are presented in Figure 3. From these images, ROI were traced for tumors, liver, kidney and muscle. Quantitative PET image-derived uptake 30 min p.i. were determined for both tracers (Figure 4). PET-derived biodistribution indicated similar liver, muscle, PC3 and T47D uptake. However, higher kidney uptake was measured for  $^{68}\text{Ga}$  labeled peptide compared to  $^{64}\text{Cu}$  labeled peptide (Figure 4A). PET-derived uptake and biodistribution studies were compared and results for tumors are presented in Figure 4B and 4C. PC3 and T47D tumors presented similar tumor uptake (Figure 4B) and tumor-to-muscle (T/M) ratio (Figure 4C). Liver, muscle and PC3 tumors presented similar results with both methods. However, kidney uptakes are higher from PET-derived uptake, while T47D tumor uptake seems lower in the same conditions. In all conditions tested, both tracers presented comparable PC3 and T47D tumor uptake and tumor-to-muscle (T/M) ratio. Co-injections of unlabeled peptide were performed during PET imaging of PC3 tumor-bearing mice and transaxial decay-corrected PET images are presented at Figure 5A. PC3 tumor uptake of  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) was not different following co-injection. However, significant decreases in PC3 tumor uptake for  $^{68}\text{Ga}$ -labeled peptide (Figure 5B) and in T/M ratio for both  $^{64}\text{Cu}$ / and  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) (Figure 5C) were observed.

## DISCUSSION

In the present research, NOTA-PEG-BBN(6-14), a water-soluble GRPR-targeting peptide, was prepared entirely on solid phase support following a method developed in our laboratory (15) with good yields and high purity. NOTA-PEG-BBN(6-14) presented

an excellent GRPR affinity on human breast cancer cells (T47D) and human prostate cancer cells (PC3) which is comparable to natural BBN in the low nanomolar range. Furthermore, Cu(II)/NOTA-PEG-BBN(6-14) presented similar affinity to NOTA-PEG-BBN(6-14) while Ga(III)/NOTA-PEG-BBN(6-14) exhibited significantly lowered affinity for human GRPR. We postulate that this alteration in affinity is caused by the difference in charge between Cu(II)/ and Ga(III)/NOTA-PEG-BBN(6-14). Cu(II) forms a stable and neutral complex whereas Ga(III) forms a stable, but positively charge complex with the NOTA chelator. We hypothesize that the counter-ion of this charge might interfere in the binding process of the peptide by causing steric hindrance diminishing the measured affinity. Lane *et al.* also observed that insertion of metal in the NOTA chelator could influence the affinity of the resulting peptide (11). These observations stress the importance of considering the metal used for labeling in peptide affinity measurements. High yields and excellent specific activities were obtained following the labeling of NOTA-PEG-BBN(6-14) with  $^{64}\text{Cu}$  and  $^{68}\text{Ga}$ . No significant difference in specific activity between both labeled tracers was measured. Both  $^{68}\text{Ga}$ / and  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA complexes were stable *in vivo* up to 2h and 24h respectively as determined by radioTLC. The stability of the peptide itself cannot be established by radioTLC because the peptide separation from its potential metabolites may be extremely difficult to distinguish using this method. Instead, the peptide stability was measured by radioHPLC for  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) and showed that the tracer is stable up to 1h *in vivo* as no trace of free  $^{64}\text{Cu}$  or metabolite was detected (15). This result is consistent with radioTLC data. Cellular uptake of  $^{64}\text{Cu}$ / and  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) were evaluated on T47D and PC3 cells. No significant difference was observed between  $^{64}\text{Cu}$ / and  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) for both cell lines. Hence, the lower affinity for GRPR of  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) did

not seems to alter the observed cellular uptake, this peptide even having a higher uptake than its  $^{64}\text{Cu}$ -labeled analog. Following these results, we evaluated the impact of GRPR affinity *in vivo*.

To measure *in vivo* GRPR-targeting properties of both tracers, biodistribution and PET imaging studies were carried out. Biodistribution measurements in Balb/c mice showed a relatively similar uptake in non GRPR-expressing tissue such as liver, kidneys and muscle for both  $^{64}\text{Cu}$  and  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) which indicates that both tracers have similar elimination pathway and clearance profiles. However, when comparing PET image-derived kidney uptake to values from biodistribution studies, we measured a higher uptake for both labeled peptides. These higher values might be from radiolabeled peptide still circulating in the organ during imaging while, during biodistribution studies, the organs are rinsed before measurement eliminating circulating compound. Furthermore,  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) presented higher renal uptake than  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14). Since positively charged compounds are known to be retained in kidneys by reabsorption (28), the difference observed could be explained by the positive charge of the  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA complex.

In our study, we observed significant uptake differences in pancreas and adrenal glands, but similar tumor uptake for both labeled peptides. Since pancreas, adrenal glands and tumors are all GRPR-expressing tissues, similar uptake patterns in these organs were expected. However, while pancreas uptake is considered an indicative of GRPR-targeting for tumor tracer development, many studies in nude mice bearing human tumor xenografts have also demonstrated that higher pancreas uptake does not match the higher tumor uptake due to GRPR interspecies differences (11,28). Pancreas and adrenal glands

express mice specific GRPR while human specific GRPR are present on PC3 and T47D cells. Since all affinities were measured on human GRPR, it is hazardous to speculate on relative affinities of Cu(II)/ and Ga(III)/NOTA-PEG-BBN(6-14) for mice GRPR since not enough data are available yet to explain these differences. Since *in vivo* GRPR-targeting is known to be highly dependent on GRPR affinity rather than internalization rate (28) and since Ga(III)/NOTA-PEG-BBN(6-14) presented lower GRPR-affinity on T47D cells, reduced *in vivo* tumor uptake was expected for this tracer. However, *in vitro* and *in vivo* breast and prostate tumor uptake was similar for both tracers. We hypothesize that the affinity for human GRPR of our novel BBN-based radiolabeled peptides, while being significantly different, is still in the low nanomolar range and might not be different enough to observe *in vitro* nor *in vivo* GRPR-targeting differences at the tumor site. These results indicate that both tracers are promising probes that can be used as breast and prostate cancer diagnosis PET tracers.

## CONCLUSION

We have developed two PET tracers targeting the gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) and exhibiting excellent pharmacokinetic properties for *in vivo* imaging of breast and prostate cancer. Dependence of the affinity and pharmacokinetics of these radiopeptides on the complexed radiometal and interspecies differences between mice and men with respect to GRPR pharmacokinetics were clearly demonstrated in the preclinical studies herein reported.

## ACKNOWLEDGMENTS

BG and RL are members of the *Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel* funded by the Fonds de Recherche en Santé du Québec. The work was financially supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Canadian Institute of Health Research (CIHR grants MOP-86717 and MOP-89875) and the BC Leadership Chair in Functional Cancer Imaging. PF had support from graduate scholarships (CIHR 98147 and FRSQ 21116).

## REFERENCES

- 1) Reubi, J.C., Wenger, S., Schmuckli-Maurer, J., Schaer, J. C., and Gugger, M. (2002) Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand (125)I-[D-Tyr(6), beta-Ala(11), Phe(13), Nle(14)] bombesin(6-14). *Clin. Cancer Res.* 8, 1139-1146.
- 2) Albrecht, M., Doroszewicz, J., Gillen, S., Gomes, I., Wilhelm, B., Stief, T., and Aumüller, G. (2004) Proliferation of prostate cancer cells and activity of neutral endopeptidase is regulated by bombesin and IL-1beta with IL-1beta acting as a modulator of cellular differentiation. *Prostate* 58, 82-94.
- 3) Reile, H., Armatis, P. E., and Schally, A. V. (1994) Characterization of high-affinity receptors for bombesin/gastrin releasing peptide on the human prostate cancer cell lines PC-3 and DU-145: internalization of receptor bound <sup>125</sup>I-(Tyr4) bombesin by tumor cells. *Prostate* 25, 29-38.
- 4) Markwalder, R., and Reubi, J. C. (1999) Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. *Cancer Res.* 59, 1152-1159.



- 5) Pagani, A., Papotti, M., Sanfilippo, B., and Bussolati, G. (1991) Expression of the gastrin-releasing peptide gene in carcinomas of the breast. *Int. J. Cancer* 47, 371-375.
- 6) Gugger, M., and Reubi, J. C. (1999) Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. *Am. J. Pathol.* 155, 2067-2076.
- 7) Parry, J. J., Andrews, R., and Rogers, B. E. (2007) MicroPET imaging of breast cancer using radiolabeled bombesin analogs targeting the gastrin-releasing peptide receptor. *Breast Cancer Res. Treat.* 101, 175-183.
- 8) Delle Fave, G., Annibale, B., De Magistris, L., Severi, C., Bruzzone, R., Puoti, M., Melchiorri, P., Torsoli, A., and Erspamer, V. (1985) Bombesin effects on human GI fonctions. *Peptides* 6, 113-116.
- 9) Martinez, V., and Tache, Y. (2000) Bombesin in the brain-gut axis. *Peptides* 21, 1617-1625.
- 10) Pradhan, T. K., Katsuno, T., Taylor, J. E., Kim, S. H., Ryan, R. R., Mantey, S. A., Donohue, P. J., Weber, H. C., Sainz, E., Battey, J. F., and Coy, D. H. (1998) Identification of a unique ligand which has high affinity for all four bombesin receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 343, 275-287.
- 11) Lane, S. R., Nanda, P., Rold, T. L., Sieckman, G. L., Figueroa, S. D., Hoffman, T. J., Jurisson, S. S., and Smith, C. J. (2010) Optimization, biological evaluation and microPET imaging of copper-64-labeled bombesin agonists, [<sup>64</sup>Cu-NO<sub>2</sub>A-(X)-BBN(7-14)NH<sub>2</sub>], in prostate tumor xenografted mouse model. *Nucl. Med. Biol.* 37, 751-761.
- 12) Prasanphanich, A. F., Nanda, P. K., Rold, T. L., Ma, L., Lewis, M. R., Garrison, J. C., Hoffman, T. J., Sieckman, G. L., Figueroa, S. D., and Smith, C. J. (2007) [<sup>64</sup>Cu-NOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH<sub>2</sub>] targeting vector for positron-emission tomography imaging of

gastrin-releasing peptide receptor-expressing tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 12462–12467.

13) Schuhmacher, J., Zhang, H., Doll, J., Maecke, H. R., Matys, R., Hauser, H., Henze, M., Haberkorn, U., and Eisenhut, M. (2005) GRP Receptor-Targeted PET of a Rat Pancreas Carcinoma Xenograft in Nude Mice with a  $^{68}\text{Ga}$ -Labeled Bombesin(6-14) Analog. *J. Nucl. Med.* *46*, 691–699.

14) Chen, X., Park, R., Hou, Y., Tohme, M., Shahinian, A. H., Bading, J. R., and Conti, P. S. (2004) MicroPET and Autoradiographic Imaging of GRP Receptor Expression with  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-[Lys<sup>3</sup>]Bombesin in Human Prostate Adenocarcinoma Xenografts. *J. Nucl. Med.* *45*, 1390–1397.

15) Guérin, B., Ait-Mohand, S., Tremblay, M.-C., Dumulon-Perreault, V., Fournier, P., and Bénard, F. (2010) Total Solid-Phase Synthesis of NOTA-functionalized peptides for PET imaging. *Org. Lett.* *12*, 280–283.

16) Ait-Mohand, S., Fournier, P., Dumulon-Perreault, V., Keifer, G. E., Jurek, P., Ferreira, C. L., Bénard, F., and Guérin, B. (2011) Evaluation of  $^{64}\text{Cu}$ -labeled bifunctional chelate-bombesin conjugates. *Bioconjugate Chem.* *22*, 1729-1735.

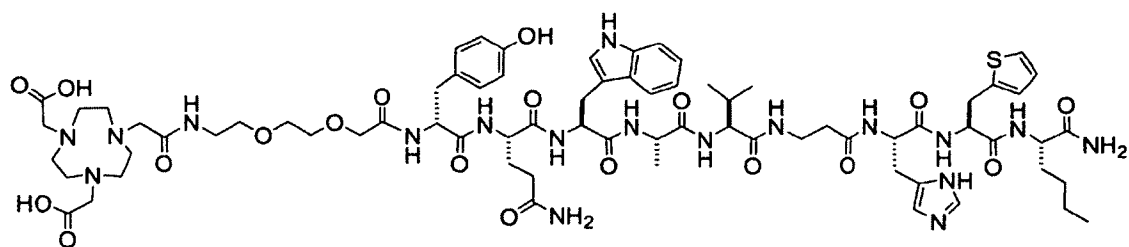
17) Ferreira, C. L., Lamsa, E., Woods, M., Duan, Y., Fernando, P., Bensimon, C., Kordos, M., Guenther, K., Jurek, P., and Keifer, G. E. (2010) Evaluation of bifunctional chelates for the development of gallium-based radiopharmaceuticals. *Bioconjugate Chem.* *21*, 5361-5369.

18) Liu, Z., Yan, Y., Liu, S., Wang, F., and Chen, X. (2009) (18)F, (64)Cu and (68)Ga labelled RGD-Bombesin Heterodimeric peptides for PET imaging of breast cancer. *Bioconjugate Chem.* *20*, 1016-1025.

- 19) Fani, M., Del Pozzo, L., Abiraj, K., Mansi, R., Tamma, M. L., Cescato, R., Waser, B., Weber, W. A., Reubi, J. C., and Maecke, H. R. (2011) PET somatostatin receptor-positive tumors using  $^{64}\text{Cu}$ - and  $^{68}\text{Ga}$ -somatostatin antagonists: the chelate makes the difference. *J. Nucl. Med.* 52, 1110-1118.
- 20) Fournier, P., Dumulon-Perreault, V., Ait-Mohand, S., Langlois, R., Bénard, F., Lecomte, R., and Guérin, B. (2012) Comparative study of  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-[D-Tyr<sup>6</sup>,beta-Ala<sup>11</sup>,Thi<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>]BBN(6-14) monomer and dimers for prostate cancer PET imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging Research.* 2, 8.
- 21) Cheng, Y., and Prusoff, W. H. (1973) Relationship between the inhibition constant ( $[K_i]$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $[I_{50}]$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099–3108.
- 22) Aprikian, A. G., Han, K., Chevalier, S., Bazinet, M., and Viallet, J. (1996) Bombesin specifically induces intracellular calcium mobilization via gastrin-releasing peptide receptors in human prostate cancer cells. *J. Mol. Endocrinol.* 16, 297-306.
- 23) Zeisler, S. K., Pavan, R. A., Orzechowski, J., Langlois, R., Rodrigue, S., and van Lier, J. E. (2003) Production of  $^{64}\text{Cu}$  on the Sherbrooke TR-PET cyclotron. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 257, 175–177.
- 24) McCarthy D.W., Shefer, R. E., Klinkowstein, R. E., Bass, L. A., Margeneau, W. H., Cutler, C. S., Anderson, C. J., and Welch, M. J. (1997) Efficient production of high specific activity  $^{64}\text{Cu}$  using a biomedical cyclotron. *Nucl. Med. Biol.* 24, 35–43.
- 25) Zhernosekov, K. P., Filosofov, D. V., Baum, R. P., Aschoff, P., Bihl, H., Razbash, A. A., Jahn, M., Jennewein, M., and Rösch, F. (2007) Processing of generator-produced  $^{68}\text{Ga}$  for medical application. *J. Nucl. Med.* 48, 1741-1748.

- 26) Selivanov, V., Picard, Y., Cadorette, J., Rodrigue, S., and Lecomte, R. (2000) Detector response models for statistical iterative image reconstruction in high resolution PET. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* 47, 1168-1175.
- 27) Xiao, D., Wang, J., Hampton, L. L., and Weber, H. C. (2001) The human gastrin-releasing peptide receptor gene structure, its tissue expression and promoter. *Gene* 264, 95-103.
- 28) Behr, T. M., Goldenberg, D. M., and Becker, W. (1998) Reducing the renal uptake of radiolabelled antibody fragment and peptides for diagnosis and therapy: present status, future prospects and limitations. *Eur. J. Nucl. Med.* 25, 201-212.

## FIGURES



**Figure 1. Amino acids sequence of NOTA-PEG-BBN(6-14)**

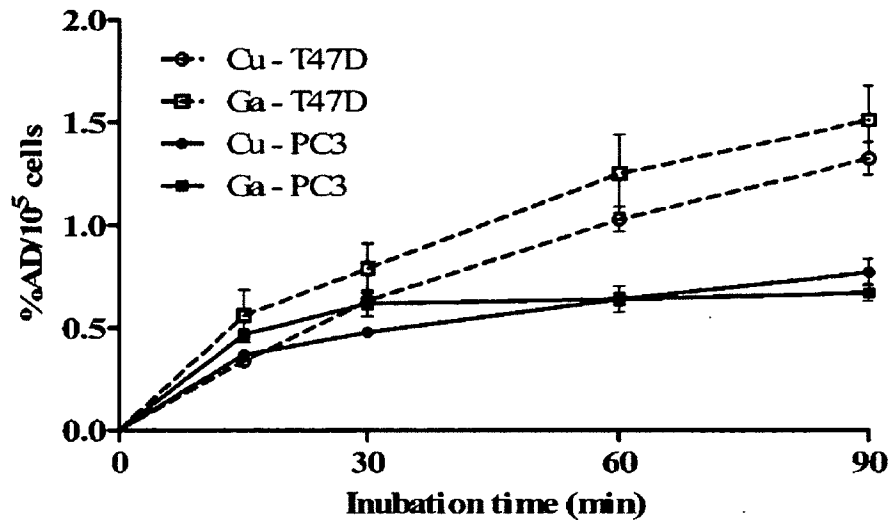
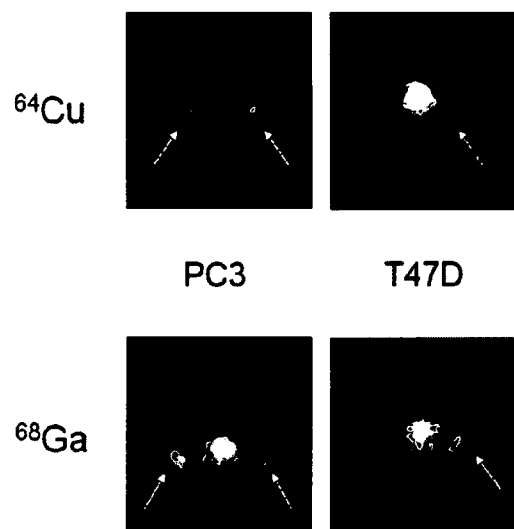
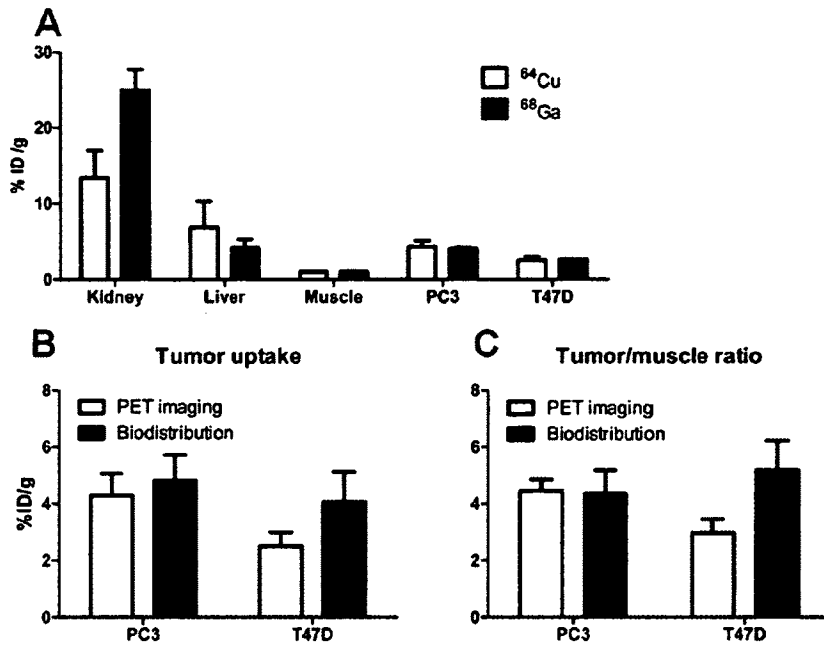


Figure 2. Cellular uptake of <sup>64</sup>Cu/ and <sup>68</sup>Ga/NOTA-PEG-BBN(6-14) on T47D and PC3 cells

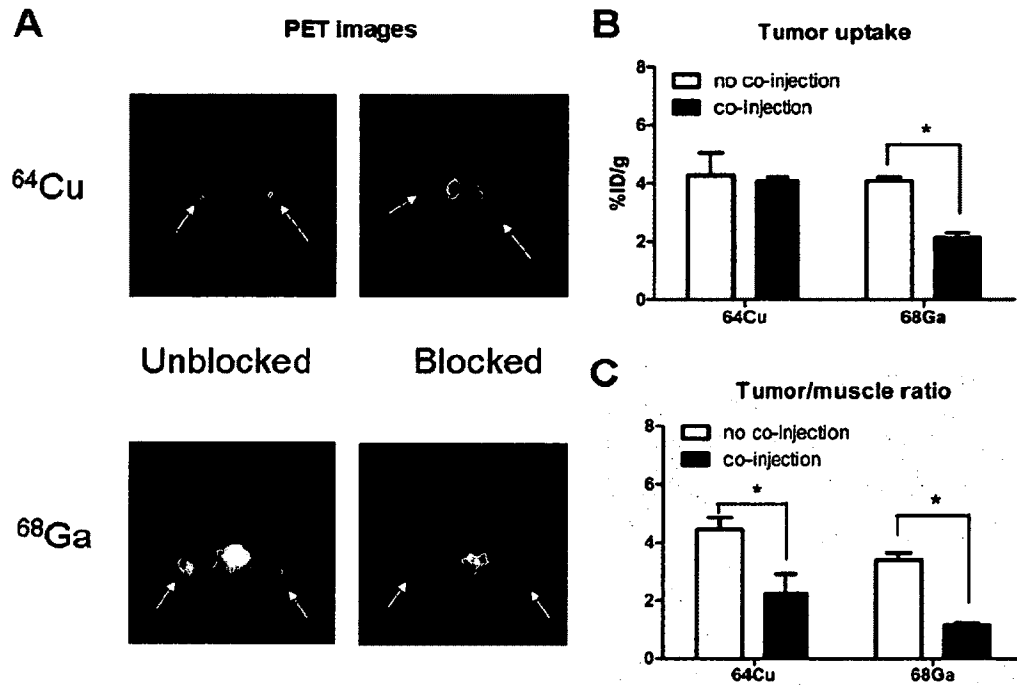


**Figure 3. PC3 and T47D tumors transaxial PET images of  $^{64}\text{Cu}$ / and  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) 30 min p.i.**



**Figure 4. Comparative biodistribution, tumor uptake and tumor-to-muscle ratio of PC3 and T47D tumor-bearing mice 30 min pi of  $^{64}\text{Cu}$ / and  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) by PET imaging and biodistribution. (A) PET-derived biodistribution of  $^{64}\text{Cu}$ / and  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14); (B) tumor uptake of PC3 and T47D tumors by PET imaging and biodistribution for  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14); (C) tumor-to-muscle ratio of PC3 and T47D tumors measured by PET imaging and biodistributions for  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14).**





**Figure 5. Comparative tumor uptake and tumor-to-muscle ratio of PC3 tumors 30 min pi of  $^{64}\text{Cu}$  and  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) by PET imaging with or without co-injection of unlabeled peptide. (A) Transaxial PET images of PC3 tumor-bearing Balb/c nude mice of  $^{64}\text{Cu}$  (Top row) and  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) (Bottom row) with (right side) and without (left side) co-injection; (B) PET-derived tumor uptake of PC3 tumors of  $^{64}\text{Cu}$  and  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) with or without co-injection; (C) PET-derived tumor-to-muscle ratio of PC3 tumors of  $^{64}\text{Cu}$  and  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) with or without co-injection. \* =  $p < 0.05$**

## TABLES

**Table 1.** Affinities of NOTA-PEG-BBN(6-14) for GRPR on breast and prostate cancer cells.

Peptide	K <sub>i</sub> GRPR on T47D (nM)	K <sub>i</sub> GRPR on PC3 (nM)
Bombesin	0.76 ± 0.54	0.59 ± 0.32
NOTA-PEG-BBN(6-14)	1.27 ± 0.95	2.51 ± 1.54
Cu(II)/NOTA-PEG-BBN(6-14)	1.60 ± 0.59	---
Ga(III)/NOTA-PEG-BBN(6-14)	4.87 ± 1.27 *	---

\* significantly higher inhibition constant than NOTA-PEG-BBN(6-14) and Cu(II)/NOTA-PEG-BBN(6-14) on T47D cells (p<0.05).

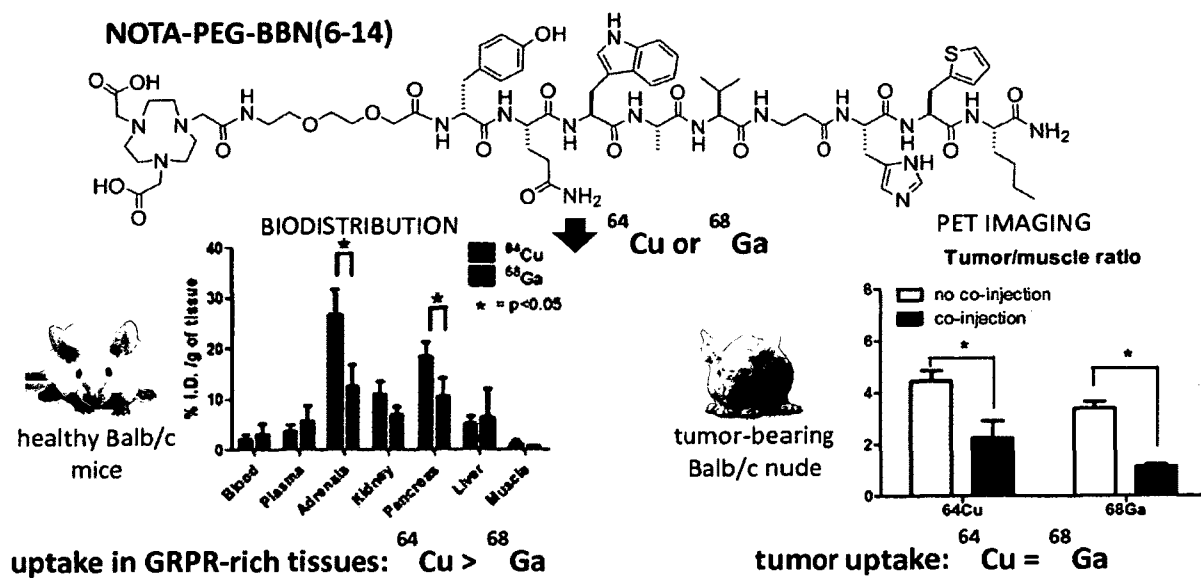
**Table 2.** Biodistributions of healthy female Balb/c mice 30 min post-injection of  $^{64}\text{Cu}/\text{NOTA-PEG-BBN}(6-14)$  or  $^{68}\text{Ga}/\text{NOTA-PEG-BBN}(6-14)$  with or without co-injection of non-radioactive peptide.

Organ	$^{64}\text{Cu}/\text{NOTA-PEG-BBN}(6-14)$		$^{68}\text{Ga}/\text{NOTA-PEG-BBN}(6-14)$	
	unblocked	blocked	unblocked	blocked
Blood	2.02 ± 0.93	3.15 ± 0.59	2.97 ± 2.07	3.62 ± 1.80
Plasma	3.50 ± 1.38	6.35 ± 1.31	5.64 ± 3.15	6.95 ± 3.44
Adrenals	26.61 ± 5.03	4.34 ± 2.14 ‡	12.39 ± 4.42 *	4.05 ± 2.60 ‡
Ovaries	5.37 ± 4.06	7.79 ± 6.83	2.21 ± 1.54	5.58 ± 3.79
Uterus	7.15 ± 3.26	5.45 ± 1.96	1.98 ± 1.40	3.97 ± 1.75
Fat	0.76 ± 0.35	1.49 ± 1.02	0.49 ± 0.13	1.43 ± 1.10
Kidney	10.88 ± 2.61	15.06 ± 4.30	6.83 ± 1.71	10.69 ± 2.00
Spleen	4.55 ± 2.10	2.51 ± 0.12	4.43 ± 2.07	1.48 ± 0.32
Pancreas	18.39 ± 2.90	3.12 ± 0.07 ‡	10.41 ± 3.75 *	2.65 ± 1.38 ‡
Liver	4.97 ± 1.69	11.39 ± 8.33	6.29 ± 5.70	3.59 ± 0.98
Heart	1.22 ± 0.40	2.29 ± 1.48	1.04 ± 0.42	2.27 ± 1.86
Lungs	3.92 ± 2.27	4.79 ± 2.68	2.67 ± 1.20	5.59 ± 4.51
Muscle	1.06 ± 0.76	1.34 ± 0.49	0.61 ± 0.08	1.83 ± 0.99
Bone	0.73 ± 0.20	1.21 ± 1.15	0.90 ± 0.46	1.48 ± 1.28
Brain	0.13 ± 0.06	0.21 ± 0.13	0.11 ± 0.03	0.22 ± 0.15

\* Significantly lower than  $^{64}\text{Cu}/\text{NOTA-PEG-BBN}(6-14)$  for the same organ ( $p < 0.05$ ).

‡ Co-injection significantly lowered the uptake for the same organ for the corresponding tracer ( $p < 0.05$ ).

# Table of content graphic



## ARTICLE II

Étude comparative de monomère et dimères du  $^{64}\text{Cu}/\text{NOTA}-[\text{D-Tyr}^6, \beta\text{Ala}^{11}, \text{Thi}^{13}, \text{Nle}^{14}]\text{BBN}(6-14)$  pour l'imagerie TEP du cancer de la prostate

Patrick Fournier, Véronique Dumulon-Perreault, Samia Ait-Mohand, Réjean Langlois, François Bénard, Roger Lecomte et Brigitte Guérin

*European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Research* 2012, **2**:8  
doi:10.1186/2191-219X-2-8

Cette étude porte sur l'impact de la valence du composé peptidique sur son potentiel de détection au niveau du cancer de la prostate. Ces travaux présentent d'abord une méthode de synthèse des composés peptidiques homodimériques et permettent d'illustrer le potentiel diagnostique d'un homodimère ciblant le GRPR. Les résultats ont démontré que les composés homodimériques présentent une captation dépendante du GRPR accrue ainsi qu'une rétention supérieure à la tumeur. Il s'agit des premières étapes dans le développement de nouveaux traceurs peptidiques homodimériques ciblant le GRPR. De plus, cette étude démontre que l'importance de l'espacement entre les deux ligands est un facteur important à considérer dans le développement de composés dimériques.

Comparative study of  $^{64}\text{Cu}/\text{NOTA}-[\text{D-Tyr}^6, \beta\text{Ala}^{11}, \text{Thi}^{13}, \text{Nle}^{14}]\text{BBN}(6-14)$  monomer and dimers for prostate cancer PET imaging

Fournier Patrick<sup>1</sup>, Dumulon-Perreault Véronique<sup>1</sup>, Ait-Mohand Samia<sup>1</sup>, Langlois Réjean<sup>1</sup>, Bénard François<sup>2</sup>, Lecomte Roger<sup>1</sup>, Guérin Brigitte<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke (CIMS), Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Université de Sherbrooke, 3001, 12th North Avenue Sherbrooke, Qc, Canada, J1H 5N4*

<sup>2</sup>*BC Cancer Agency Research Centre, Vancouver, BC, Canada.*

To whom correspondence should be addressed. Prof. Brigitte Guérin, Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke (CIMS), Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Université de Sherbrooke, 3001, 12th North Avenue Sherbrooke, Qc, Canada, J1H 5N4.

Phone: (819) 820-6868 ext. 15285

Fax: (819) 829-3238

E-mail: [Brigitte.Guerin2@USherbrooke.ca](mailto:Brigitte.Guerin2@USherbrooke.ca)

## Abstract

**Background:** Gastrin-releasing peptide receptors (GRPR) are highly overexpressed in multiple cancers and have been studied as a diagnostic target. Multimeric GRPs are expected to have enhanced tumor uptake and affinity for GRPR. In this study, a  $^{64}\text{Cu}$ -labeled NOTA-monomer and two NOTA-dimers of [D-Tyr<sup>6</sup>,βAla<sup>11</sup>,Thi<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>]bombesin(6-14) [BBN(6-14)] were compared.

**Methods:** Monomeric and dimeric peptides were synthesized on solid phase support and radiolabeled with  $^{64}\text{Cu}$ . NOTA-dimer **1** consists of asymmetrically linked BBN(6-14), while NOTA-dimer **2** has similar spacer between the two BBN(6-14) ligands and the chelator. *In vitro* GRPR-binding affinities were determined with competitive binding assays on PC3 human prostate cancer cells. *In vivo* stability and biodistribution of radiolabeled compounds were assessed in Balb/c mice. Cellular uptake and efflux were measured with radiolabeled NOTA-monomer and NOTA-dimer **2** on PC3 cells for up to 4h. *In vivo* biodistribution kinetics were measured in PC3 tumor-bearing Balb/c nude mice by  $\mu\text{PET}$  imaging and confirmed by dissection and counting.

**Results:** NOTA-monomer, NOTA-dimers **1** and **2** were prepared with purity of 99%. The inhibition constants of the three BBN peptides were comparable and in the low nanomolar range. All  $^{64}\text{Cu}$ -labeled peptides were stable up to 24 h in mouse plasma and 1h *in vivo*.  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer **2** featuring a longer spacer between the two BBN(6-14) ligands is a more potent GRPR-targeting probe than  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer **1**. PC3 tumor uptake profiles are slightly different for  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-monomer and  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer **2**; the monomeric BBN peptide tracer exhibited higher tumor uptake during the first 0.5 h and a fast renal

clearance resulting in higher tumor to muscle ratio when compared to  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer 2. The later exhibited higher tumor to blood ratio and was retained longer at the tumor site when compared with  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-monomer. Lower ratios of tumor to blood and tumor to muscle in blocking experiments showed GRPR-dependant tumor uptake for both tracers.

**Conclusion:** Both  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-monomer and  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer 2 are suitable for detecting GRPR-positive prostate cancer *in vivo* by PET. Tumor retention was improved *in vivo* with  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer 2 by applying polyvalency effect and/or statistical rebinding.

*Keywords: bombesin, homodimer,  $^{64}\text{Cu}$ , PET imaging, Gastrin releasing peptide receptors, PC3 tumor*

## **Background**

Prostate cancer is the most frequently diagnosed cancer and the second-leading cause of cancer-related deaths for males in the US. One promising approach in prostate cancer diagnosis is the utilization of target-specific radiolabeled peptides for PET imaging. Previous researches have shown that bombesin (BBN) analogs can be used to target gastrin-releasing peptide receptors (GRPR) with high affinity and selectivity. Gastrin releasing peptide (GRP) is a 27 amino acids peptide that displays a wide range of physiological effects, including gastric and pancreatic secretion, nervous system stimulation, smooth muscle contraction, blood pressure and the regulation of cell growth in some malignant cell lines [1,2]. The presence of GRPR has been documented in small cell lung cancers [3], prostate cancers [4,5], breast cancers [6-8] and others [9]. In prostate



cancer, the GRPR expression has been tied to neoplastic transformation [10], cell migration [11,12], proliferation [10,13] and invasion capacity [14-16]. GRPR is overexpressed on 84% of all human prostate cancers according to a study by Markwalder and Reubi [5]. These receptors represent an interesting molecular target for radiolabeled BBN analogs as diagnostic or radiotherapeutic applications for prostate cancer. BBN, a 14 amino acids potent GRPR agonist found in the skin of the fire-bellied toad *bombina bombina*, was first described by Anastasi *et al.* [17]. BBN is involved in regulating exocrine secretion, smooth muscle contraction and gastrointestinal hormone release [18] and it is widely expressed in the central nervous system [19]. [D-Tyr<sup>6</sup>,βAla<sup>11</sup>,Thi<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>]bombesin(6-14) [BBN(6-14)] is a potent modified GRPR agonist peptide that binds to GRPR with high affinity [20]. Various BBN analogs have been labeled with radiometals and used for PET imaging of GRPR-positive tumors. Schuhmacher *et al.* labeled a DOTA-PEG<sub>2</sub>-[D-Tyr<sup>6</sup>,βAla<sup>11</sup>,Thi<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>]BBN(6-14) with <sup>68</sup>Ga [21] for PET imaging, while Chen *et al.* used DOTA-Lys<sup>3</sup>-bombesin with <sup>64</sup>Cu [22]. Smith *et al.* successfully labeled modified BBN(7-14) analogs with <sup>64</sup>Cu for potential use in diagnostic imaging using NOTA or NO<sub>2</sub>A as chelating agents and obtained stable compounds [23,24].

To improve peptide binding affinity, a multivalency approach has been introduced [25]. Traditionally, this approach involves the use of peptide homodimers or homomultimers in which peptide ligands of the same type are constructed with suitable linkers. The key for bivalency, binding to two receptors at the same time, is the distance between the two peptide motifs. The ability of a dimer peptide to achieve bivalency depends also on the receptor density [25]. If the receptor density is very high, the distance between two

neighboring receptor sites will be short, which makes it easier for the dimer peptide to achieve the bivalency. While GRPR density on PC3 tumor cells is widely documented *in vitro* and *in vivo*, its expression is heterogeneous making it difficult to establish an average distance between receptors [26]. Even if the distance between the two peptide motifs is not optimal, the local BBN peptide levels may still be high in the vicinity of GRPR sites once the first BBN ligand is bound. The detachment of the dual action ligand from the receptor is more likely to be followed by reattachment if there are GRPR binding copies close to it, resulting in higher receptor affinity for homodimers and better tumor uptake with longer tumor retention [27]. Potential benefits of multimeric targeting peptides are accepted, but many questions concerning the mechanisms are still to be answered. A few studies on BBN-based homodimers have been reported with varying results. Carrithers *et al.* observed modest improvement in affinity for GRPR with their homodimer [28], while Gawlak *et al.* noted no difference in affinity between their monomer and homodimer [29]. Abiraj *et al.* observed higher cellular uptake and retention of their homodimers radiolabeled with  $^{177}\text{Lu}$  on GRPR-overexpressing PC3 cells [30].

$^{64}\text{Cu}$  has mean positron energy similar to that of  $^{18}\text{F}$  and a half-life of 12.7 h permitting PET evaluation of slow biochemical pathways, such as protein and peptide interactions with cellular targets [31]. Our laboratory has reported the synthesis and the characterization of DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N,N',N'',N'''*-tetraacetic acid) and NOTA (1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid)-BBN derivatives and showed that the NOTA-BBN(6-14) had an inhibition constant ( $K_i$ ) value slightly lower than that of the analogue DOTA-BBN(6-14) [32]. NOTA has been radiolabeled efficiently with  $^{64}\text{Cu}$  and shown to have higher resistance to transmetallation reactions *in*

*in vivo* as compared to DOTA [23,33]. In the present study, we studied the GRPR affinity, the cellular uptake and efflux, the *in vivo* stability and the biodistribution of radiolabeled NOTA-BBN monomer and NOTA-BBN homodimers **1** and **2** which differed by the spacer length between the two peptide ligands (Fig. 1). Our design is based on the only example available of radiolabeled BBN-based homodimer from Abiraj *et al.* [30]. They used lysine side chain or a 6-aminohexanoic acid spacer for their homodimer and obtained promising *in vitro* results. We used one and two PEG spacers between the binding sequences to fine-tune biological properties of our homodimers. In addition, we report a convenient synthetic approach for the preparation of two NOTA-BBN homodimers and their labeling with  $^{64}\text{Cu}$  (Fig. 2).  $\mu\text{PET}$  imaging on PC3 human prostate carcinomas xenografted in Balb/c nude mice were also performed to compare the diagnostic properties of  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-BBN homodimers to those of the  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-BBN monomer.

## Methods

## Materials

All chemicals and solvents (reagent grade) were used as supplied from the vendors cited below without further purification, unless otherwise noted. NovaSyn® TGR resin and Sieber amide resin were obtained from NovaBiochem®. Fmoc-protected amino acids and benzotriazol-1-yl-oxytrityrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) were obtained from EMD NovaBiochem® (Gibbstown, NJ, USA) or Chem-Impex International Inc. (Wood Dale, IL, USA). 1,4,7-Triazacyclononane was obtained from TCI America (Portland, OR, USA). 2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-

tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU) was purchased from Chem-Impex International Inc. 6-Chloro-1-hydroxy-1H-benzotriazole (ClHOBT) were purchased from ChemPep (Wellington, FL, USA) and Matrix Innovation (Quebec, QC, CA) respectively. HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), amphotericin B, HAMS'S/F-12, PBS (phosphate-buffered saline), trypsin, penicillin, streptomycin, and fetal bovine serum were purchased from Wisent (St-Bruno, QC, CA). *N,N*-Diisopropylethylamine (DIEA), thioanisole, triisopropylsilane (TIPS) were obtained from Aldrich Chemical Co. Bovine serum albumin, and bombesin were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Acetonitrile, dichloromethane (DCM), *N,N*-dimethylformamide (DMF), isopropyl alcohol (*i*-Pr-OH) were obtained from Fisher Scientific (Ottawa, ON, CA). <sup>125</sup>I-bombesin was purchased from Perkin Elmer Life Science Products (Boston, MA, USA). Finally, T47D human breast cancer and PC3 prostate cancer cell lines were obtained from ATCC (Manassas, VA, USA). DMF was dried over 4 Å molecular sieves at least one week to remove trace amount of amine present in the solvent and filtered before its use.

## **Peptide Synthesis**

We recently reported the synthesis, the characterization and the biological activity of NOTA-BBN(6-14) peptide [32]. The general procedure for the preparation of NOTA-BBN(6-14) dimers on solid support is summarized in Fig. 2.

The south BBN peptide segment was synthesized on amide Sieber resin by a continuous flow method on a Pioneer Peptide Synthesis System (PerSeptive Biosystems) using the Fmoc strategy. A 2-fold excess of Fmoc-protected amino acid over available resin substitution sites was used for coupling in amine free DMF. Fmoc-protected amino acids

were activated for coupling with an equimolar amount of HATU, and 2 equiv. of DIEA. Fmoc deprotection was performed in 20% piperidine in DMF and monitored through absorbance at 364 nm. The resin was washed thrice with DMF, MeOH, DMF, MeOH and DCM, subsequently. The partially protected peptide-resin was swelled in 2 mL of DMF and then treated with 3 mL of DMF containing succinic anhydride (10 equiv.) and DIEA (10 equiv.). This coupling procedure was performed twice (30 min and 1 h). The resin was washed as described above and the desired peptide was cleaved from the support by treatment with a cocktail of 4% TFA in 10 mL DCM at room temperature under mechanical agitation for 3 min. The solution was filtered into a flask containing 5% Et<sub>3</sub>N in MeOH. The cleavage step was repeated 10 times. Combined filtrates containing the partially protected peptide were evaporated under reduced pressure to 5% of the volume. 40 mL of cold water was added to the residue and the mixture was cooled with ice to aid precipitation of the product. The precipitated peptides were centrifuged at 1200 rpm for 15 min. The water solution was decanted and the white solid was dried under vacuum. Purity of the crude peptide was verified by high performance liquid chromatography (HPLC) and its identity was confirmed by API 3000 LC/MS/MS.

The north BBN peptide segment was synthesized on NovaSyn® TGR resin and the automated system following the procedure described above. After completion of the BBN fragment, the Fmoc-NH-(PEG)<sub>1</sub>-CO<sub>2</sub>H and Fmoc (ivDde)Lys-OH were coupled manually to the peptide on resin. The Fmoc-NH-(PEG)<sub>1</sub>-CO<sub>2</sub>H (2.5 equiv.) was dissolved in 2 mL of DMF at 0 °C, DIEA (2.5 equiv.) and PyBOP (2.5 equiv.) were added to the cold solution. After 15 min of stirring, the mixture was added to the partially protected peptide-resin pre-swelled with DCM and mixed with ClHOBt (2.5 equiv.) and DIEA (2.5 equiv.) while mechanical agitation was maintained for 2 h at room temperature. The resin was

washed three times with DMF, MeOH, DMF, MeOH and DCM, subsequently. Fmoc deprotection was performed in 20% piperidine in DMF during 15 min, and the resin was washed as described above. For the preparation of the NOTA-dimer **1**, steps 1 and 2 of Fig. 2 were not performed. The Fmoc-Lys(ivDde)-OH was dissolved in 2 mL of DMF at 0 °C and HATU (2.5 equiv.) was added to the cold solution. The mixture was added to the partially protected peptide-resin pre-swelled with DCM and DIEA (2.5 equiv.) and then mechanically stirred for 1 h. The resin, the Fmoc group, and the last Fmoc-NH-(PEG)<sub>1</sub>-CO<sub>2</sub>H was respectively washed, deprotected and coupled as described above. The resulting *N*-terminal Fmoc was deprotected in 20% piperidine in DMF during 15 min, and the resin was washed as described above. The coupling and the Fmoc deprotection steps were followed by a Kaiser's test on resin; the reaction between resin and ninhydrin was followed colorimetrically whereby free primary amines after Fmoc deprotection were detected as blue beads and their absence as yellow beads. The resin was washed as described above.

Coupling of the north BBN segment to the south peptide: The solution of HO-Suc-partially protected-BBN(6-14) was activated with PyBOP (1.5 equiv.), ClHOBT (1.5 equiv.) and DIEA (3 equiv.) in DMF:NMP (1:1 v v). The pre-activation mixture was stirred for 15 min and then added to the NH<sub>2</sub>-PEG-Lys(ivDde)-(PEG)-Gly-BBN-peptide on TGR resin pre-swelled in DMF (2 mL). The reaction was allowed to proceed 12 h at room temperature, under mechanical agitation. The coupling was performed twice with another equivalent of the HO-Suc-partially protected-BBN(6-14). After the north BBN segment coupling, the NOTA group was built on solid phase as described previously by our group [31]. The resin was washed as described above and the peptide was deprotected and cleaved from the support by treatment with a cocktail of TFA/H<sub>2</sub>O/thioanisole

(92:2:6, v/v/v) for 4 h at room temperature under mechanical agitation to yield the desired peptide. The resin was removed by filtration and washed with TFA. Combined filtrates were added dropwise to cold diethyl ether; for each 1 mL of TFA solution, 10 mL of diethyl ether was used. The precipitated peptides were centrifuged at 1200 rpm for 15 min. The ether solution was decanted and the white solid was dissolved in water, frozen and lyophilized. The crude peptide was purified by flash chromatography on a Biotage SP4 system equipped with a C<sub>18</sub> column. Purity of the peptides was verified by HPLC and their identity was confirmed by API 3000 LC/MS/MS and MALDI. Analytical HPLC was performed on an Agilent 1200 system equipped with a Zorbax Eclipse XDB C18 reversed-phase column (4.6 × 250 mm, 5μ) and Agilent 1200 series diode array UV-Vis detector, using a linear gradient of 0% to 100% acetonitrile in water with 0.1% TFA over 30 min at a flow rate of 1 mL/min. Following these methods, NOTA-PEG-BBN(6-14) (denoted as NOTA-monomer), BBN(6-14)-Suc-PEG-Lys(NOTA)-Gly-BBN(6-14) (denoted as NOTA-dimer 1) and BBN(6-14)-Suc-PEG-Lys(NOTA)-PEG-Gly-BBN(6-14) (denoted as NOTA-dimer 2) were prepared.

## **Cell culture**

The human prostate cancer PC3 cell line was used in their 8<sup>th</sup> to 12<sup>th</sup> passage after receipt and was cultured in HAM'S/F12 medium supplemented with 2.5 mM glutamin, 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin, 100 ng/mL amphotericin B and 10% fetal bovine serum. Cells were grown in 5% CO<sub>2</sub> in air at 37°C; the medium was changed 3 times per week.

## Competitive binding assays

Competition assays were performed in 24-well plates using PC3 cells. The cells were cultured until near confluence and the medium was replaced by 400  $\mu\text{L}$  of reaction medium (RPMI complemented with 2 mg/mL BSA, 4.8 mg/mL HEPES, 1 U/mL penicillin G and 1  $\mu\text{g/mL}$  streptomycin). For the assay, equal volumes of radioactive and non-radioactive ligands were added. The concentration of [ $^{125}\text{I-Tyr}^4$ ]bombesin (74 TBq/mmol; Perkin Elmer Life Science Products, Boston, MA) was  $10^{-12}\text{M}$ . Increasing concentrations ( $10^{-6}$  to  $10^{-14}$ ) of the GRPR ligand is added. The plates were incubated for 40 min at  $37^\circ\text{C}$  with agitation. After the incubation, the reaction medium was removed and the cells were washed three times with PBS at room temperature. The cells were harvested and counted in a gamma counter (Cobra II auto-gamma counter, Packard, MN).

Experiments were realized three times in triplicate. Data were analysed with GraphPad Prism 5 Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) to determine the  $\text{IC}_{50}$ . Finally, the inhibition constant ( $K_i$ ) was determined using Cheng and Pursoff's formula [34]. The  $K_d$  value for [ $^{125}\text{I-Tyr}^4$ ]bombesin has been determined from experiments done under similar conditions and is  $1.5 \times 10^{-10}\text{ M}$ .

## Peptide radiolabeling with $^{64}\text{Cu}$

Our cyclotron facility provides  $^{64}\text{Cu}$  isotope on a routine basis for research purposes, using a target system developed in collaboration with Advanced Cyclotron Systems Inc. (ACSI, Richmond, BC, CA).  $^{64}\text{Cu}$  was prepared on an EBCO TR-19 cyclotron by the  $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$  nuclear reaction using an enriched  $^{64}\text{Ni}$  target electroplated on a rhodium disc [35]. [ $^{64}\text{Cu}$ ]CuCl<sub>2</sub> was recovered from the target following the procedure of



McCarthy *et al.*[36] and converted to [<sup>64</sup>Cu]copper[II] acetate by dissolving the [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> in ammonium acetate (0.1 M; pH 5.5). Peptides were labeled with <sup>64</sup>Cu following conditions optimized in our laboratory. Briefly, peptides (5 µg) were dissolved in a 0.1M ammonium acetate buffer at pH 5.5 with [<sup>64</sup>Cu]Cu(OAc)<sub>2</sub> (8-10 mCi, 296-370 MBq) in a total volume of 250-300 µL and then the resulting solution was incubated at 100°C for 10 min. The labeled product was purified by HPLC using a C-18 column and a radiodetector. The amount of radiolabeled peptide was determined by the peak area of the tracer in the UV-chromatogram compared to the UV peak area of the standard unlabelled peptide (Fig. 3). In all cases, starting materials and radiolabelled peptides were separable. The peptide fraction was collected, evaporated and counted in a Capintec Radioisotope Calibrator to calculate the specific activity of the product. Since <sup>64</sup>Cu-labeled NOTA-dimer 1 and NOTA-dimer 2 were poorly soluble in physiological media, a mixture of DMF-PBS (10/90 v/v) was used to solubilize peptides.

### ***In vivo* stability studies**

Plasma and *in vivo* stability studies were realized as previously described by our group [33]. Briefly, after peptide reconstitution, studies were carried out by incubating the tracers in mouse plasma for a period of 24h and by injecting around 15-25 MBq (400-650 µCi; 100 µL) of <sup>64</sup>Cu/peptide to female Balb/c mice; 3 mice per peptide. After 24h, a portion of the incubation mixtures in plasma or blood samples taken from the back paw were quenched with equal amounts of MeCN, chilled (4°C), centrifuged, and the supernatant was assayed by HPLC. The stability was also determined by radioTLC directly from plasma and blood samples without further handling; free <sup>64</sup>Cu and purified radiolabeled peptides were used as standards. The radioTLCs were eluted on C-18-coated

plastic sheets with 0.1 M sodium citrate buffer at pH 5.5 using an Instant Imager system for the radiodetection.

### **Biodistribution studies in Balb/c mice**

To determine the *in vivo* GRPR-targeting efficacy of labeled peptides, biodistribution of female Balb/c mice were realized with a minimum of 4 mice for each condition. Briefly, mice were injected with 370-740 kBq (10-20  $\mu$ Ci; 100  $\mu$ L) of either  $^{64}$ Cu/NOTA-monomer,  $^{64}$ Cu/NOTA-dimer 1 or  $^{64}$ Cu/NOTA-dimer 2 via the caudal vein. The animals were sacrificed with CO<sub>2</sub> at 30 min post-injection (p.i.). Organs of interest were then collected, weighted and measured in a gamma-counter. The results were expressed as percentage of the injected dose per gram of tissue (%ID/g).

### **Cellular uptake and efflux**

Cellular uptake and efflux studies were realized three times in triplicate on PC3 cells in presence of NOTA-monomer and NOTA-dimer 2 radiolabeled with  $^{64}$ Cu. First, PC3 cells were seeded in 12-wells plates at a density of  $2 \times 10^5$  cells per well 48 h prior to the experiment. Before the experiment, the cells were washed three times with PBS then 950  $\mu$ L of culture medium was added. For cellular uptake, PC3 cells were incubated 15, 30, 60, 120 and 240 min with 37 kBq (1  $\mu$ Ci; 50  $\mu$ L) of radiolabeled peptide per well at 37 °C with agitation. Once the incubation was over, the medium was removed and the cells were washed three times with PBS. The cells were harvested and counted in a gamma counter. The results were expressed as percentage of added dose retained per  $10^5$  cells (%AD/ $10^5$  cells). For efflux studies, plated-PC3 cells were incubated 1 h with 37 kBq (1  $\mu$ Ci; 50  $\mu$ L) of radiolabeled peptide. Then, the cells were washed with PBS and fresh medium was added.

After 0, 15, 30, 60, 120 and 240 min, the cells were washed thrice with PBS. Finally, the cells were harvested and counted in a gamma counter. The results were expressed as percentage of activity retained by cells relative to baseline at 0 min.

### **PET imaging**

PET scans were performed using a LabPET8 (Gamma Medica Inc.) small animal scanner with a field of view of 7.5 cm. Female Balb/c nude mice were implanted with  $10^7$  PC3 prostate cancer cells. Cells were injected in 150  $\mu\text{L}$  of Matrigel (BD Biosciences) and PBS (2:1). Tumors were given 3 weeks to grow to the size of 5 mm in diameter. For  $\mu\text{PET}$  studies, PC3 xenografted female Balb/c nude mice were injected with 3.7-7.4 MBq (100-200  $\mu\text{Ci}$ ; 100  $\mu\text{L}$ ) of  $^{64}\text{Cu}/\text{NOTA}$ -monomer or  $^{64}\text{Cu}/\text{NOTA}$ -dimer **2** via the caudal vein under isoflurane anesthesia with a minimum of 3 mice for each tracer. Each animal had a 2 h dynamic scan from the injection. The images were reconstructed by a 2-dimensional MLEM algorithm implemented on an analytically derived system matrix [37]. Region of interest (ROI) were traced for tumor, liver, kidney and muscle and the activity contained in each organ was measured at multiple time points, resulting in time-activity curves.

### **Biodistribution studies in PC3 tumor-bearing Balb/c nude mice**

Tumor-bearing Balb/c nude mice were injected with 370-740 kBq (10-20  $\mu\text{Ci}$ ; 100  $\mu\text{L}$ ) of  $^{64}\text{Cu}/\text{NOTA}$ -monomer and  $^{64}\text{Cu}/\text{NOTA}$ -dimer **2** via the caudal vein and sacrificed with  $\text{CO}_2$  at different periods of time after injection. Organs of interest were then collected, weighted and radioactivity was measured in a gamma-counter. The blocking experiments

were realized by co-injecting 0.1  $\mu\text{mol}$  of non-radiolabeled peptide. The results were expressed as %ID/g with a minimum of 3 mice for each condition.

## **Results**

### **Peptide synthesis**

NOTA-monomer, NOTA-dimers **1** and **2** were prepared with overall yields of 38, 28 and 31%, respectively, based on the substitution rate of the resin determined photometrically from the amount of Fmoc chromophore released upon treatment of the resin with piperidine/DMF. According to analytical HPLC, the purity was 99% for all peptides, as reported in Table 1. The purity of the crude south BBN peptide segment was 84%. The peptide was used for the coupling without further purification; the partially protected peptide degrades when purified by HPLC. All measured peptide masses are in agreement with the calculated mass values (Table 1).

### **Competitive binding assays**

All three peptide conjugates inhibited the binding of [ $^{125}\text{I}$ -Tyr<sup>4</sup>]bombesin to GRPR of PC3 cells in a concentration-dependant manner. The inhibition constant ( $K_i$ ) values for NOTA-monomer, NOTA-dimer **1** and NOTA-dimer **2** were respectively  $2.51 \pm 1.54$ ,  $1.82 \pm 1.16$  and  $1.70 \pm 1.30$  nM (see Table 1). Natural bombesin was used as a standard and a  $K_i$  value of  $0.59 \pm 0.32$  nM was obtained under the same conditions (Table 1). No significant difference was observed between the different compounds in terms of GRPR affinity.

## Peptide radiolabeling with $^{64}\text{Cu}$ , purification and *in vivo* stability

All NOTA-peptides were successfully radiolabeled with  $^{64}\text{Cu}$  with yields not decay corrected greater than 95% (Table 1). The specific activities measured were 74-93 TBq/mmol (2000-2500 Ci/mmol) for NOTA-monomer and 93-130 TBq/mmol (2500-3500 Ci/mmol) for  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimers **1** and **2**. Fig. 4 shows radio-HPLC chromatograms of  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-monomer and  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer **2**. The two tracers were stable in mouse plasma over 24h and *in vivo* over 1h (Fig. 4a and 4b respectively). The amount of radiolabeled peptide in mouse blood was not sufficient after 24h to run a radioHPLC. Instead, stability results were performed by radioTLC using free  $^{64}\text{Cu}$  and purified radiolabeled peptides as standards. Fig. 5 shows radioTLC chromatograms of  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-monomer and  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer **2** at various time points in mouse plasma and *in vivo*. The absence of free  $^{64}\text{Cu}$  *in vivo* 24 h p.i. confirmed that  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA complexes of the monomer and the dimer **2** are stable (Fig. 5). No metabolites were found under all conditions when the stability was followed by radioTLC.

## Biodistribution in Balb/c mice

The GRPR-targeting *in vivo* efficacy of  $^{64}\text{Cu}$ -labeled peptides was first tested by biodistribution in female Balb/c mice 30 min p.i. using the pancreas, a GRPR-rich tissue, as a target for specific receptor-mediated accumulation. We also determined the biodistribution profiles of our peptides (Fig. 6). Both dimers present higher liver, spleen, lung and kidney uptake. Pancreas uptake were respectively  $18.4 \pm 2.9$ ,  $15.6 \pm 2.0$  and  $57 \pm 16$  %ID/g for NOTA-monomer, NOTA-dimer **1** and NOTA-dimer **2**. NOTA-dimer **2** exhibits a 3.6-fold higher pancreas uptake than NOTA-monomer and NOTA-dimer **1**.

## Cellular uptake and efflux

To further investigate the polymeric effect observed, we studied cellular uptake and efflux of NOTA-monomer and NOTA-dimer **2** on PC3 cells. The expected advantages of multimeric compound are a higher uptake and retention of the peptide on GRPR-expressing tumor cells. Results are presented in Fig. 7. For uptake studies, a significantly higher cellular uptake is observed for the labeled NOTA-monomer at multiple time points ( $p < 0.05$ ). However, efflux studies demonstrate a higher retention of the labeled NOTA-dimer **2** when compared to NOTA-monomer at 1, 2 and 4 h ( $p < 0.05$ ).

## PET imaging

Representative decay-corrected transaxial images at 30, 60 and 120 min after injection are shown in Fig. 8. White arrows indicate the location of the PC3 tumors which were clearly visible at all times with both radiolabeled tracers. From these images, it is evident that the monomer is eliminated from non-target tissue faster than the dimer. Fig. 9 presents time-activity curves of liver, kidney, muscle and PC3 tumor with both tracers for the 2 h dynamic scan. From these results, no significant difference was observed between both tracers in terms of muscle accumulation. However,  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer **2** exhibits higher liver ( $p < 0.05$ ) and kidney ( $p < 0.05$ ) uptake than the  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-monomer. PC3 tumor uptake profiles are slightly different for both tracers during the first hour p.i.; the monomer exhibits higher uptake during the first half-hour that decreases rapidly to be lower for the next 30 min when compared to NOTA-dimer **2**. After 1 h, the dimer exhibits higher retention at the tumor site, in accordance with the higher retention of the NOTA-dimer **2** in cell efflux studies (Fig 7).

## **Biodistribution in Balb/c nude mice**

In order to validate the results obtained by PET imaging, biodistribution in PC3 tumor-bearing female Balb/c nude mice were realized for  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-monomer at 0.5h and  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer **2** at 0.5h and 2h. Results are presented in Table 2.  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-monomer displayed fast blood clearance with  $1.35\pm 0.47$  %ID/g remaining in the blood at 0.5 h after injection. Blocking studies revealed an increased uptake of  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-monomer in all organs except pancreas. Ratios of tumor to blood and the tumor to muscle between unblocked and blocked mice decreased for this tracer. The uptake in the blood, kidney, liver, spleen, lungs and tumor are higher for  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer **2**. A modest decreased uptake was observed at the PC3 tumor site for the dimer **2** with co-injection of  $0.1\ \mu\text{mol}$  of non-radiolabeled peptide, but the tumor to blood ratio between unblocked and blocked mice significantly diminished. The uptake in the pancreas, which is known to express GRPR, was high and specific for the dimer **2**. Surprisingly, a significant reduced uptake was also observed in the liver.

## **Discussion**

In this study, we investigated the potential benefits of dimeric BBN-based peptide radiotracers for GRPR-mediated prostate cancer PET imaging. Multimeric compounds are expected to have higher affinity, when targeting receptor at the surface of tumor cells, and a higher tumor uptake and retention than their monomeric counterparts [27]. The binding affinity for GRPR on PC3 cells of NOTA-monomer, NOTA-dimer **1** and NOTA-dimer **2** were all similar in the low nanomolar range. The incorporation of the NOTA chelator seems to have a minimal effect on the receptor binding affinity of the peptides [32].

Competitive binding assays demonstrated no advantage in terms of receptor affinity through dimerization. Previous studies also suggested that homodimers show no or modest improvement in affinity for GRPR [28, 29].

The specific activities of the dimers were slightly higher than that of the monomer when calculated on a molar basis. Although the amount of peptide conjugate was kept constant for the labeling, i.e. 5 µg, the quantity of radioactivity varied in each case explaining the observed variations in specific activity. <sup>64</sup>Cu/NOTA monomer and <sup>64</sup>Cu/NOTA dimer **2** are stable after 24h incubation in mouse plasma and 1h *in vivo* as no trace of free <sup>64</sup>Cu or metabolite was detected by radioHPLC (Fig. 4). Although <sup>64</sup>Cu/NOTA complexes of the monomer and the dimer **2** are stable over 24 h *in vivo* (Fig. 5), the stability of the peptide itself cannot be established by radioTLC because the peptide separation from its potential metabolites may be extremely difficult using this method. The biodistribution in female Balb/c mice demonstrated that our monomeric and dimeric peptides have different biodistribution profiles (Fig. 6). Both dimers presented slightly higher blood retention and a significantly increased uptake in the spleen, lungs, kidney and liver as compared to the monomer. These results appear to correlate to a higher molecular weight rather than GRPR-mediated polyvalency effect since none of these organs express high level of GRPR. The same observation was reported by Liu *et al.* while testing their dimer and tetramer of RGD [38]. Higher uptake in liver for both dimers seems to indicate a different elimination pathway and kinetics. The liver is an important organ in the metabolism of copper. However, *in vivo* stability studies indicated absence of free <sup>64</sup>Cu in the blood circulation at all the time points studied (Fig 5) demonstrating that the observed liver uptake is due to hepatobiliary excretion of the dimers. Higher uptake in the kidneys for



both dimers can be explained by the higher molecular weight since larger molecules are more slowly excreted, but also, under physiological conditions, our dimers are more positively charged than the monomer. Positively charged molecules are known to be more retained in the kidneys than neutral molecule [39] which could also explain our results. Labeled NOTA-dimer **2** exhibited a 3.6-fold higher pancreas uptake compared to NOTA-monomer or NOTA-dimer **1** in Balb/c mice. This augmentation cannot be explained by the molecular weight difference. Therefore, this higher uptake could be associated to polymeric effect. We further investigated this effect on PC3 cells *in vitro* and *in vivo* with NOTA-monomer and NOTA-dimer **2**. Since NOTA-dimer **1** did not present any advantage over the two other tracers, we stopped its further development.

During *in vitro* experiments,  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer **2** exhibited lower cellular uptake, but higher tumor retention on PC3 when compared to  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-monomer. The lower cellular uptake could reflect differences in biological activities between the two peptides. Our efflux experiments supported the multimeric effect:  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer **2** was retained by PC3 cells longer than  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-monomer in the same conditions.

PET imaging in PC3 tumor-bearing mice was used to compare the pharmacokinetics and distribution of the monomeric and the dimeric BBN. Dynamic PET was used to obtain time-activity curves describing the activity profile of the tracer for each ROI as a function of time. Time-activity curves for liver, kidney, muscle and tumor with  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-monomer and  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer **2** showed that liver and kidney uptake was higher at all times for the dimer, while muscle uptake was similar for both tracers. These results correspond to the pattern observed in the biodistribution studies. Results from cellular

uptake studies predicted higher tumor uptake for  $^{64}\text{Cu}/\text{NOTA}$ -monomer. In fact, PC3 tumor uptake was higher for  $^{64}\text{Cu}/\text{NOTA}$ -monomer for the first 30 min post-injection. Afterwards, the tumor uptake of the dimer was significantly higher than the monomer. This can be explained by the slower tumor washout of the dimer. The longer retention of the dimer by PC3 cells observed in the efflux studies is also observed *in vivo*. Blocking studies by biodistribution in PC3 tumor-bearing mice were realized to validate the results obtained by PET imaging, confirming the GRPR-mediated uptake of the tracer. After co-injection of the non-radiolabeled peptide, the radioactivity level of  $^{64}\text{Cu}/\text{NOTA}$ -monomer slightly decreased in the pancreas. Surprisingly, an important increase of  $^{64}\text{Cu}/\text{NOTA}$ -monomer in all other organs was noticed by co-injection of the non-radiolabeled peptide. In this study, 0.1  $\mu\text{mol}$  of non-radiolabeled peptide were co-administered intravenously with radiotracer injection, which apparently led to serious damage to the kidney functions and significant inhibition of blood clearance of the radiotracer, as suggested by a 9-fold increase in the blood radiotracer level and a more than 7-fold increase in the kidney levels over animals not receiving the non-radiolabeled peptide. Therefore, the absence of any blocking effect of the non-radiolabeled peptide in the tumor and other organs may be explained by interference from an increased influx of the radioligand from the blood. At 1 h after the injection of  $^{64}\text{Cu}/\text{NOTA}$ -monomer, the radioligand was still in the form of its parent in the blood suggesting that the increased uptake of the tracer may not be related to the uptake of metabolites for the blocking experiments. Meanwhile, lower tumor to blood ratio of  $0.38 \pm 0.01$  and tumor to muscle ratio of  $1.59 \pm 0.44$  were obtained 0.5h p.i for blocked  $^{64}\text{Cu}/\text{NOTA}$ -monomer, with  $1.49 \pm 0.41$  and  $7.42 \pm 0.41$  for the unblocking experiments respectively ( $p < 0.05$ , Table 2), showing that the tumor localization of  $^{64}\text{Cu}/\text{NOTA}$ -monomer was a result of the GRPR. For dimer **2**, the uptake in blood,

kidney, spleen, and muscle is non-specific since no difference is noted by co-injection of the non-radiolabeled peptide. The co-injection of the non-radiolabeled peptide significantly reduced the pancreas uptake from  $13.35 \pm 7.38$  to  $1.43 \pm 0.61$  %ID/g ( $p < 0.05$ , Table 2). Since GRPR are highly express in this organ, this confirms that pancreas uptake of  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer 2 is GRPR-mediated. The liver uptake of  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer 2 was also reduced by co-injection of unlabeled peptide ( $p < 0.05$ ). Since GRPR expression in the liver is very low, it is likely that diminution of liver accumulation may reflect saturation of the hepatobiliary elimination pathway by the non-radiolabeled peptide. PC3 tumor uptake of  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer 2 was modestly lowered from  $6.28 \pm 2.87$  %ID/g to  $3.25 \pm 1.15$  %ID/g following the co-injection of the non-labeled peptide again indicating a GRPR dependant response.

To demonstrate that the higher tumor retention of  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer 2 observed *in vivo* is not only due to higher molecular weight, we compared the tumor to non-target tissue ratio of radiolabeled NOTA-monomer and NOTA-dimer 2. If tumor uptake was only due to size difference among the monomer and the dimer, then muscle uptake would have increased accordingly resulting in similar ratios of tumor to blood and tumor to muscle for both tracers. Results indicate that the  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-monomer offers the highest tumor to muscle ratio during the course of our study (Table 2).  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer 2 exhibits higher tumor to blood ratio after 2 h and is also retained longer at the tumor site. In addition, this tracer displays lower tumor to liver ratio and similar ratios of tumor to kidney and tumor to pancreas than the NOTA-monomer at all time points. These ratios are modulated by the different elimination pathway and kinetic of both tracers.

Multimeric compounds could have enhanced affinity due to statistical rebinding or simultaneous binding to receptors. All peptides in the current research feature only short

linkers limiting the possibility of multiple binding to targets simultaneously. Therefore, statistical rebinding seems to be the major factor explaining the results observed at the pancreas for the dimer **2**. The receptor binding of one BBN(6-14) unit will significantly enhance the local concentration of the other BBN(6-14) unit in the vicinity of the receptor which might facilitate further binding. However, statistical rebinding is dependant on the density of receptor present at the surface of the cell. GRPR are characterized by the presence of high and low affinity states to agonist depending on the coupling of guanine nucleotide (GDP or GTP) on the G-protein [40]. Therefore, available receptors that could bind with our peptides at the tumor are likely even lower than expected. In fact, we observed significantly higher uptake in mouse pancreas, which has a very high density of GRPR, but no difference in uptake for PC3 tumors that have a lower GRPR density [1]. This difference in receptor densities might be a factor reducing the efficacy of our dimer. Longer spacers in the dimer might allow bivalency implying that both BBN(6-14) units can bind simultaneously to GRPR. However, it is important to note that tumor retention did not seem to be altered by lower receptor densities. It is possible that in the case of the dimeric tracers different mechanisms are involved in tumor uptake and retention. Overall, our data show that  $^{64}\text{Cu}/\text{NOTA}$ -dimer **2** presents similar affinity for GRPR and PC3 uptake *in vivo*, greater tumor retention *in vitro* and *in vivo*, but also higher uptake in the liver and kidney when compared to  $^{64}\text{Cu}/\text{NOTA}$ -monomer.

## Conclusions

Monomeric and dimeric BBN(6-14) peptides have been successfully synthesized and labeled with  $^{64}\text{Cu}$  as potential tracers for prostate cancer PET imaging. In this study, we present—to our knowledge, for the first time—*in vivo* characterization of radiolabeled

dimeric BBN-based peptides. Both  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-monomer and  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer **2** are suitable for detecting GRPR-positive prostate cancer *in vivo* by PET. Tumor retention was improved *in vivo* with  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer **2** by applying polyvalency effect and/or statistical rebinding. Our study is the first step in developing effective dimeric BBN-based tracers in prostate cancer PET imaging.

### List of abbreviations

The abbreviations for the common amino acids are in accordance with the recommendations of [41]. Additional abbreviations: BBN, bombesin; BBN(6-14), [D-Tyr<sup>6</sup>, $\beta$ Ala<sup>11</sup>,Thi<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>] bombesin(6-14); ClHOBT, 6-chloro-1-hydroxy-1H-benzotriazole; DCM, dichloromethane; DIEA, *N,N*-diisopropylethylamine; DMF, *N,N*-dimethylformamide; DOTA, 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N,N',N'',N'''*-tetraacetic acid; GRP, gastrin releasing peptide; GRPR, gastrin releasing peptide receptor; HATU, 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid; HPLC, high performance liquid chromatography; GDP, guanidine diphosphate; GTP, guanidine triphosphate; *i*-Pr-OH, isopropyl alcohol;  $K_i$ , inhibition constant; MeCN, acetonitrile; NMP, *N*-methyl-2-pyrrolidone; NOTA, 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid; PBS, phosphate buffered saline; PET, positron emission tomography; p.i., post-injection; PyBOP, benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino phosphonium hexafluorophosphate; ROI, region of interest; TFA, trifluoroacetic acid;  $\mu$ PET, micro-positron emission tomography.

## **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests with respect to this work.

## **Author's contribution**

PF carried out *in vitro* and *in vivo* experiments, data analysis and drafted the manuscript.

VDP carried out *in vivo* experiments. SAM carried out peptide synthesis,  $^{64}\text{Ni}$  target electroplating and  $^{64}\text{Cu}$ -labeling. R Langlois participated to  $^{64}\text{Ni}$  target electroplating and  $^{64}\text{Cu}$ -labeling.

FB participated in the conception and design of the study. R Lecomte participated in the coordination of the study, and reviewed the manuscript. BG conceived of the study and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## **Acknowledgments**

BG and RL are members of the *Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel* funded by the Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ). The work was financially supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Canadian Institute of Health Research (CIHR grant MOP-89875) and the BC Leadership Chair in Functional Cancer Imaging. PF had support from Graduate Scholarships (CIHR 98147 and FRSQ 21116).

## References

- 1) Mantey S, Frucht H, Coy DH, Jensen RT. **Characterization of bombesin receptors using a novel, potent, radiolabeled antagonist that distinguishes bombesin receptor subtypes.** *Mol Pharmacol* 1993;**43**:762-774.
- 2) Yegen BC. **Bombesin-like peptides: candidates as diagnostic and therapeutic tools.** *Curr Pharm Des* 2003;**9**:1013-1022.
- 3) Moody TW, Bertness V, Carney DN. **Bombesin-like peptides and receptors in human tumor cell lines.** *Peptides* 1983;**4**:683-686.
- 4) Reile H, Armatis PE, Schally AV. **Characterization of high-affinity receptors for bombesin/gastrin releasing peptide on the human prostate cancer cell lines PC-3 and DU-145: internalization of receptor bound <sup>125</sup>I-(Tyr<sup>4</sup>) bombesin by tumor cells.** *Prostate* 1994;**25**:29-38.
- 5) Markwalder R, Reubi JC. **Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation.** *Cancer Research* 1999;**59**:1152-1159.
- 6) Pagani A, Papotti M, Sanfilippo B, Bussolati G. **Expression of the gastrin-releasing peptide gene in carcinomas of the breast.** *International Journal of Cancer* 1991;**47**:371-375.
- 7) Halmos G, Wittliff JL, Schally AV. **Characterization of bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in human breast cancer and their relationship to steroid receptor expression.** *Cancer Research* 1995;**55**:280-287.
- 8) Gugger M, Reubi JC. **Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast.** *American Journal of Pathology* 1999;**155**:2067-2076.

- 9) Reubi JC, Wenger S, Schmuckli-Maurer J, Schaer JC, Gugger M. **Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand (125)I-[D-Tyr(6), beta-Ala(11), Phe(13), Nle(14)] bombesin(6-14).** *Clinical Cancer Research* 2002;**8**:1139-1146.
- 10) Albrecht M, Doroszewicz J, Gillen S, Gomes I, Wilhelm B, Stief T, Aumüller G. **Proliferation of prostate cancer cells and activity of neutral endopeptidase is regulated by bombesin and IL-1beta with IL-1beta acting as a modulator of cellular differentiation.** *Prostate* 2004;**58**:82-94.
- 11) Aprikian AG, Tremblay L, Han K, Chevalier S. **Bombesin stimulates the motility of human prostate-carcinoma cells through tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and of integrin-associated proteins.** *Int J Cancer* 1997;**72**:498-504.
- 12) Nagakawa O, Ogasawara M, Fujii H, Murakami K, Murata J, Fuse H, Saiki I. **Effect of prostatic neuropeptides on invasion and migration of PC-3 prostate cancer cells.** *Cancer Letters* 1998;**133**:27-33.
- 13) Bologna M, Festuccia C, Muzi P, Biordi L, Ciomei M. **Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro.** *Cancer* 1989;**63**:1714-1720.
- 14) Festuccia C, Angelucci A, Gravina G, Eleuterio E, Vicentini C, Bologna M. **Bombesin-dependent pro-MMP-9 activation in prostatic cancer cells requires beta1 integrin engagement.** *Exp Cell Res* 2002;**280**:1-11.
- 15) Ishimaru H, Kageyama Y, Hayashi T, Nemoto T, Eishi Y, Kihara K. **Expression of matrix metalloproteinase-9 and bombesin/gastrin-releasing peptide in human prostate cancers and their lymph node metastases.** *Acta Oncologica* 2002;**41**:289-296.



- 16) Festuccia C, Guerra F, D'Ascenzo S, Giunciuglio D, Albini A, Bologna M. **In vitro regulation of pericellular proteolysis in prostatic tumor cells treated with bombesin.** *Int J Cancer* 1998;**75**:418-431.
- 17) Anastasi A, Erspamer V, Bucci M. **Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombina and Alytes.** *Experientia* 1971;**27**:166-167.
- 18) Delle Fave G, Annibale B, De Magistris L, Severi C, Bruzzone R, Puoti M, Melchiorri P, Torsoli A, Erspamer V. **Bombesin effects on human GI functions.** *Peptides* 1985 ;**6**:113-116.
- 19) Martinez V, Tache Y. **Bombesin in the brain-gut axis.** *Peptides* 2000;**21**:1617-1625
- 20) Pradhan TK, Katsuno T, Taylor JE, Kim SH, Ryan RR Mantey SA, Donohue PJ, Weber HC, Sainz E, Battey JF, Coy DH. **Identification of a unique ligand which has high affinity for all four bombesin receptor subtypes.** *Eur J Pharmacol* 1998;**343**:275-287
- 21) Schuhmacher J, Zhang H, Doll J, Maecke HR, Matys R, Hauser H, Henze M, Haberkorn U, Eisenhut M. **GRP Receptor-Targeted PET of a Rat Pancreas Carcinoma Xenograft in Nude Mice with a <sup>68</sup>Ga-Labeled Bombesin(6-14) Analog.** *J Nucl Med* 2005;**46**:691–699.
- 22) Chen X, Park R, Hou Y, Tohme M, Shahinian AH, Bading JR, Conti PS. **MicroPET and Autoradiographic Imaging of GRP Receptor Expression with <sup>64</sup>Cu-DOTA-[Lys<sup>3</sup>]Bombesin in Human Prostate Adenocarcinoma Xenografts.** *J Nucl Med* 2004;**45**:1390–1397.
- 23) Prasanphanich AF, Nanda PK, Rold TL, Ma L, Lewis MR, Garrison JC, Hoffman TJ, Sieckman GL, Figueroa SD, Smith CJ. **[<sup>64</sup>Cu-NOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH<sub>2</sub>] targeting**

- vector for positron-emission tomography imaging of gastrin-releasing peptide receptor-expressing tissues.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007;**104**:12462–12467.
- 24) Lane SR, Nanda P, Rold TL, Sieckman GL, Figueroa SD, Hoffman TJ, Jurisson SS, Smith CJ. **Optimization, biological evaluation and microPET imaging of xenografted mouse model.** *Nucl Med Biol* 2010;**37**:751–761.
- 25) Yan Y, Chen X. **Peptide heterodimers for molecular imaging.** *Amino acids* 2011; **41**:1081-1092.
- 26) Reile H, Armatis PE, Schally AV. **Characterization of high-affinity receptors for bombesin/Gastrin Releasing Peptide on the human prostate cancer cell lines PC-3 and DU-145: Internalization of receptor bound <sup>125</sup>I-(Tyr<sup>4</sup>) bombesin by tumor cells.** *Prostate*; 1994; **25**:29-38.
- 27) Handl HL, Vagner J, Han H, Mash E, Hruba VJ, Gillies RJ. **Hitting multiple targets with multimeric ligands.** *Exp Opin Ther Targets* 2004;**8**:565-586.
- 28) Carrithers MD, Lerner MR. **Synthesis and characterization of bivalent peptide ligands targeted to G-protein-coupled receptors.** *Chemistry & Biology* 1996;**3**:537-542.
- 29) Gawlak SL, Kiener PA, Braslawsky GR, Greenfield RS. **Homodimeric forms of bombesin act as potent antagonist of bombesin on swiss 3T3 cells.** *Growth Factor* 1991;**5**:159-170.
- 30) Abiraj K, Jaccard H, Kretschmar M, Helm L, Maecke HR. **Novel DOTA-based prochelator for divalent peptide vectorization: synthesis of dimeric analogues for multimodality tumor imaging and therapy.** *Chem Commun* 2008;3248-3250.
- 31) Williams HA., Robinson S, Julyan P, Zweit J, Hastings D. **A comparison of PET imaging characteristics of various copper radioisotopes.** *Eur J Nucl Mol Imaging* 2005;**32**:1473–1480.

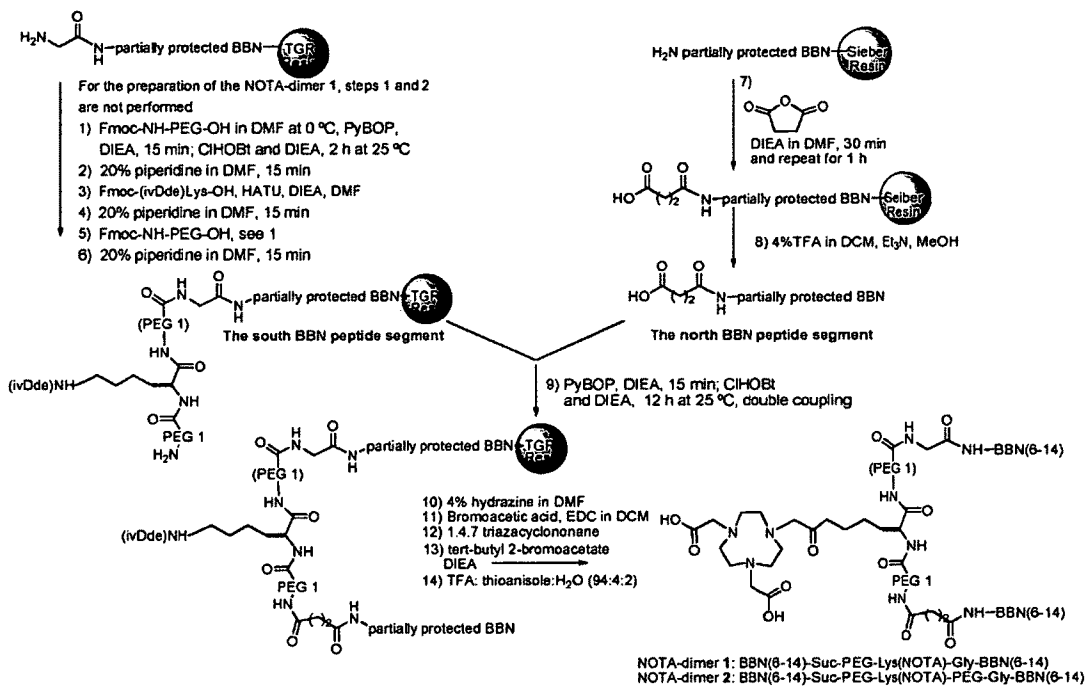
- 32) Guérin B, Ait-Mohand S, Tremblay M-C, Dumulon-Perreault V, Fournier P, Bénard F. **Total Solid-Phase Synthesis of NOTA-Functionalized Peptides for PET or SPECT Imaging.** *Org. Lett.* 2010;**12**:280–283.
- 33) Ait-Mohand S, Fournier P, Dumulon-Perreault V, Keifer GE, Jurek P, Ferreira CL, Bénard F, Guérin B. **Evaluation of  $^{64}\text{Cu}$ -labeled bifonctionnal chelate-bombesin conjugates.** *Bioconjugate Chem.* 2011;**22**:1729-1735.
- 34) Cheng Y, Prusoff WH. **Relationship between the inhibition constant ( $[K_i]$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $[I_{50}]$ ) of an enzymatic reaction.** *Biochem Pharmacol* 1973;**22**:3099–3108.
- 35) Zeisler SK, Pavan RA, Orzechowski J, Langlois R, Rodrigue S, van Lier JE. **Production of  $^{64}\text{Cu}$  on the Sherbrooke TR-PET cyclotron.** *J Radioanal Nucl Chem* 2003;**257**:175–177.
- 36) McCarthy DW, Shefer RE, Klinkowstein RE, Bass LA, Margeneau WH, Cutler CS, Anderson CJ, and Welch MJ. **Efficient production of high specific activity  $^{64}\text{Cu}$  using a biomedical cyclotron.** *Nucl.Med Biol* 1997;**24**:35–43.
- 37) Selivanov V, Picard Y, Cadorette J, Rodrigue S, Lecomte R. **Detector response models for statistical iterative image reconstruction in high resolution PET.** *IEEE Transactions on Nuclear Science* 2000;**47**:1168-1175.
- 38) Liu S. **Radiolabeled cyclic RGD peptides as Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -targeted radiotracers: maximizing binding affinity via bivalency.** *Bioconjugate Chem* 2009;**20**:2199-2213.
- 39) Behr TM, Goldenberg DM, Becker W. **Reducing the renal uptake of radiolabeled antibody fragments and peptides for diagnosis and therapy: present status, future prospects and limitations.** *Eur J Nucl Med* 1998;**25**:201-212.

40) Conklin BR, Bourne HR. **Structural elements of G $\alpha$  subunits that interact with G $\beta\gamma$ , receptors and effectors.** *Cell* 1993;**73**:631–641.

41) IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature: **Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides.** *Eur J Biochem* 1984, **138**:9-37.

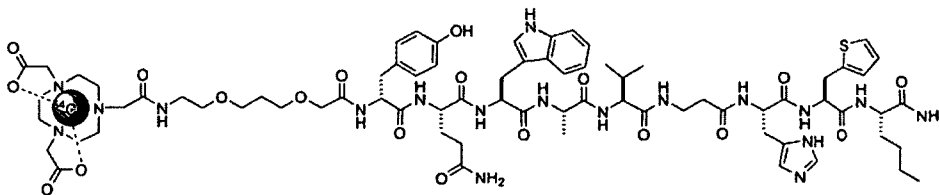
## Figures

**Fig. 1** Synthesis scheme for NOTA BBN-based dimers.

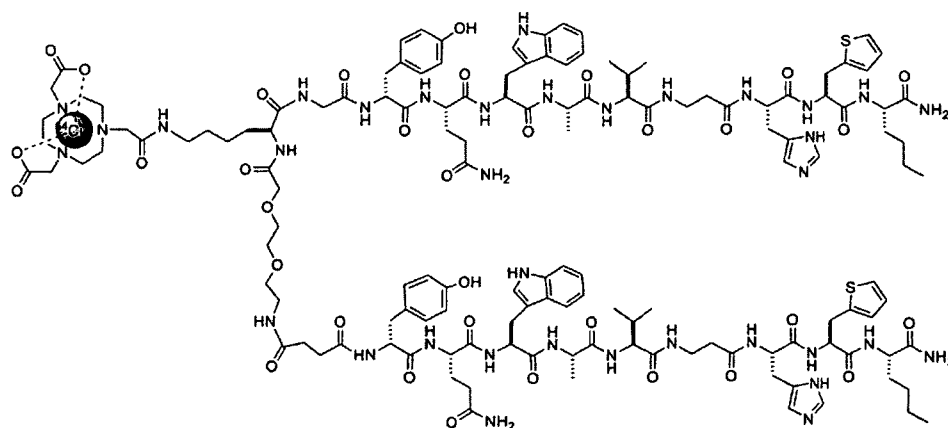


**Fig. 2** Amino-acid sequences of NOTA-bombesin monomer and dimers used in imaging with  $^{64}\text{Cu}$ .

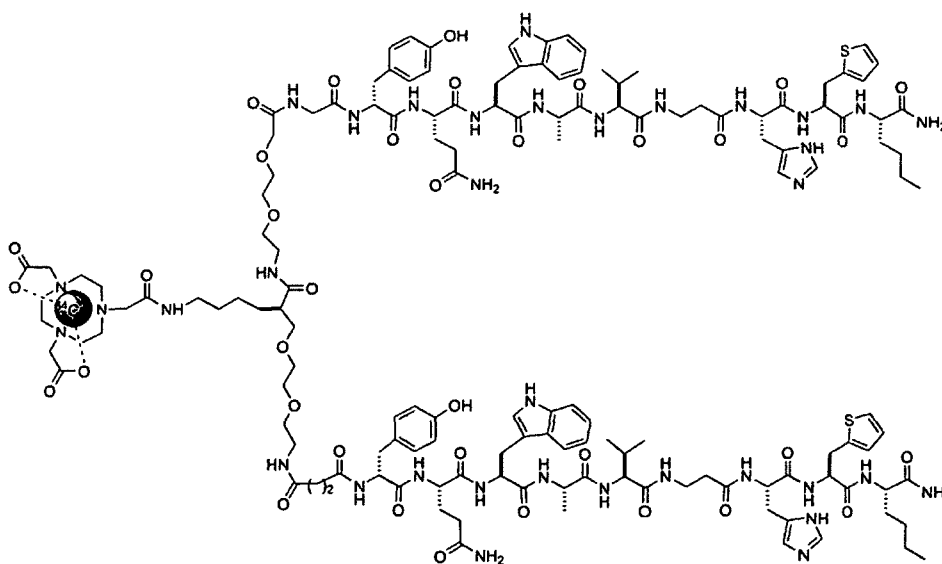
$^{64}\text{Cu}$ /NOTA-monomer



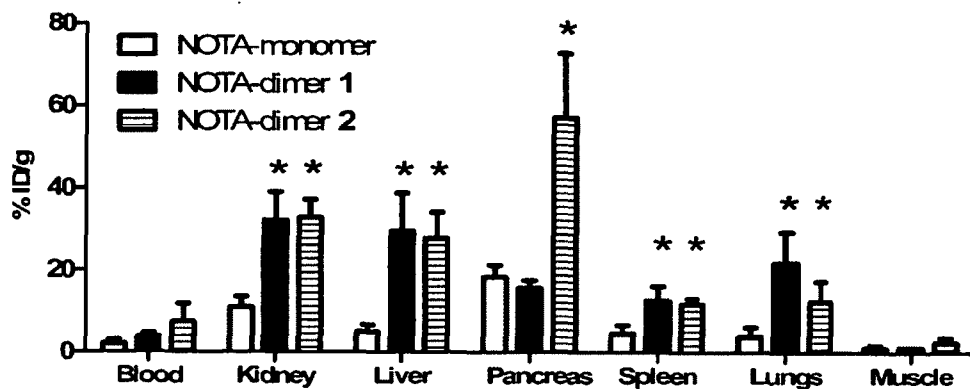
$^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer 1



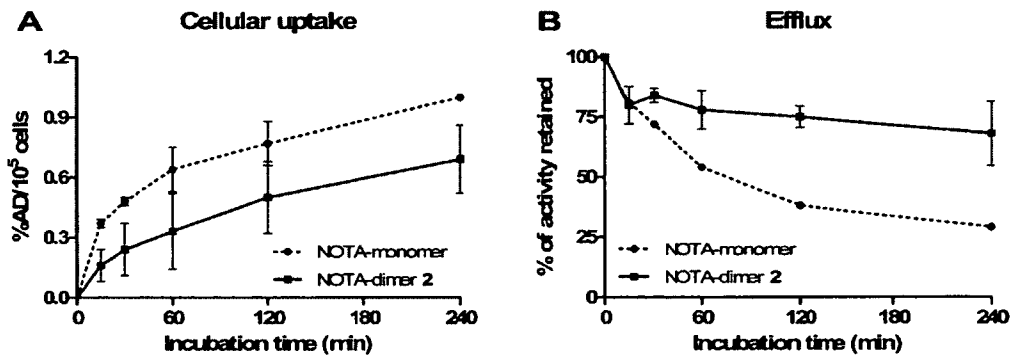
$^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer 2



**Fig. 3** Biodistribution of  $^{64}\text{Cu}$ -labeled NOTA-monomer, NOTA-dimer 1 and NOTA-dimer 2 at 0.5 h post-injection in Balb/c female mice (four mice/group). Results are presented as mean %ID/g  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$ . The p value refers to difference between NOTA-dimer 1 and NOTA-monomer or NOTA-dimer 2 and NOTA-monomer.

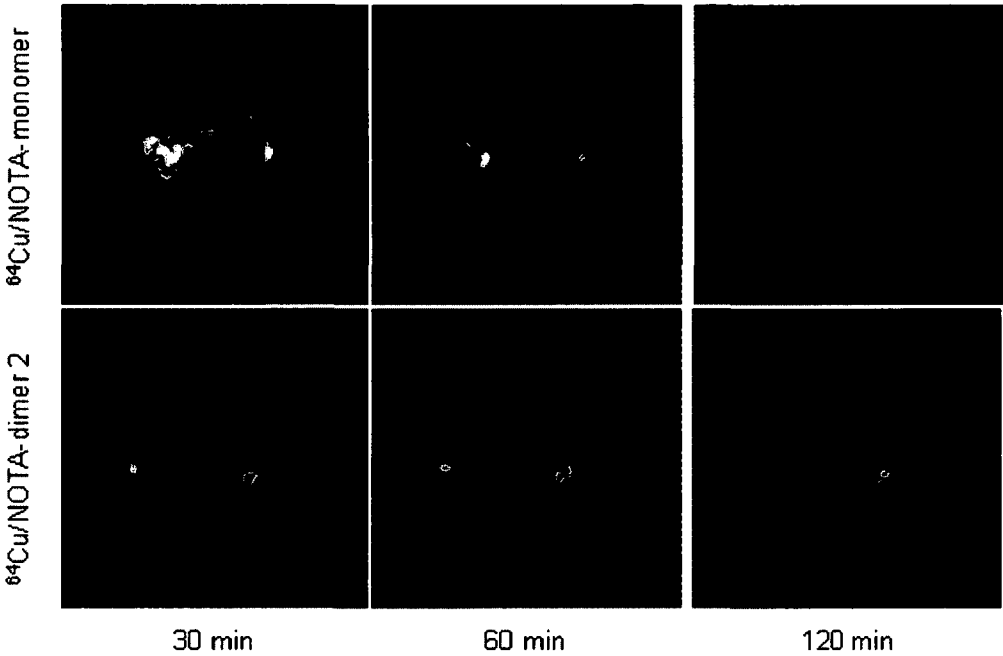


**Fig. 4** Cellular uptake (A) and efflux (B) of  $^{64}\text{Cu}$ -labeled NOTA-monomer and NOTA-dimer 2 on PC3 cells (n=3).

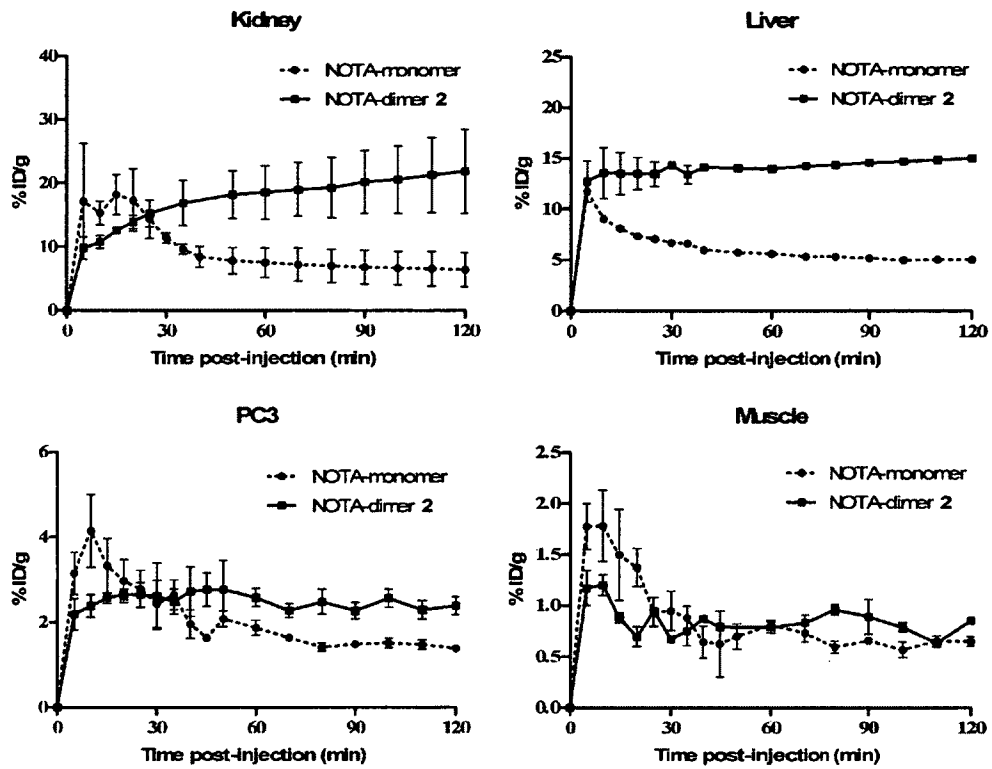




**Fig. 5** Decay-corrected transaxial microPET images of PC3 tumor-bearing mice at 30, 60 and 120 minutes post-injection of  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-monomer or  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer 2.



**Fig. 6** PET-derived time-activity curves for liver, kidney, muscle and PC3 tumor of tumor-bearing mice injected with  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-monomer or  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer 2.



**Fig. 7** Biodistribution of  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer 2 on PC3 tumor-bearing female Balb/c nude mice 120 min post-injection unblocked and blocked by co-injection of 10 mg/kg of unlabeled NOTA-dimer 2. \* $p < 0.05$ . The p value refers to the difference in uptake of  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimer 2 between blocked and unblocked group.



**TABLES**

**Table 1. Analytical data for NOTA-BBN(6-14) monomer and dimers.**

Peptide	[M] <sup>+</sup>		yield (%)	purity (%) <sup>b</sup>	K <sub>i</sub> <sup>c</sup> (nM)	labeling yield <sup>d</sup> (%)
	calcd	Found <sup>a</sup>				
Bombesin					0.59±0.32	
NOTA-monomer	1570	1571	38	99	2.51±1.54 <sup>e</sup>	>95
<u>South BBN peptide</u> <u>segment</u>	1879	1880		84 <sup>f</sup>		
NOTA-dimer 1	2976	2976	28	99	2.00±1.59	>95
NOTA-dimer 2	3122	3122	31	99	1.76±1.30	>95

<sup>a</sup>Mass values were obtained by MALDI TOF mass spectroscopy or LC/MS/MS. <sup>b</sup>Purity was determined by HPLC analysis. <sup>c</sup>Affinities for GRPR were determined with [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>4</sup>]bombesin in PC3 human prostate cancer cell line. <sup>d</sup>Labeling yield (not decay corrected) was determined by radio-HPLC analysis based on <sup>64</sup>Cu starting activity. <sup>e</sup>Similar K<sub>i</sub> values were obtained for the free chelate (1.30±0.74) and the 'cold' Cu/NOTA-monomer (1.60 ± 0.59) when tested in triplicate in human breast cancer T47D cells. <sup>f</sup>HPLC yield of the crude peptide.

**Table 2. Biodistribution and tumor to non-target organ ratios for <sup>64</sup>Cu/NOTA-monomer and <sup>64</sup>Cu/NOTA-dimer 2 at 30 and 120 min post-injection.**

Organ	<sup>64</sup> Cu/NOTA-monomer		<sup>64</sup> Cu/NOTA-dimer 2		
	30 min		30 min	120 min	
	unblocked	Blocked*	unblocked	unblocked	Blocked*
Blood	1.35 ± 0.47	12.72 ± 3.42	3.13 ± 0.67	1.34 ± 0.15	3.32 ± 2.78
Plasma	2.48 ± 0.63	21.69 ± 6.16	5.27 ± 1.27	2.45 ± 0.27	6.14 ± 4.89
Adrenal	4.29 ± 1.13	16.57 ± 0.37	9.23 ± 5.01	11.56 ± 4.91	3.63 ± 2.43
Fat	0.65 ± 0.54	3.22 ± 4.29	1.86 ± 0.81	0.68 ± 0.61	3.46 ± 2.74
Kidney	10.42 ± 1.29	75.13 ± 36.20	17.02 ± 6.24	26.37 ± 8.13	23.00 ± 5.37
Spleen	1.63 ± 1.82	3.29 ± 0.16	5.31 ± 1.43	5.50 ± 2.61	3.31 ± 0.95
Pancreas	5.10 ± 2.50	4.57 ± 2.65	4.60 ± 0.57	13.35 ± 7.38	1.43 ± 0.61 <sup>‡</sup>
Liver	5.38 ± 8.12	8.12 ± 0.70	41.79 ± 5.58	23.11 ± 2.36	12.20 ± 2.78 <sup>‡</sup>
Heart	1.05 ± 0.91	4.65 ± 0.33	4.42 ± 1.59	2.68 ± 0.13	1.58 ± 0.80
Lungs	1.77 ± 1.28	14.26 ± 1.58	7.22 ± 2.73	5.07 ± 1.58	34.42 ± 23.31
Muscle	0.40 ± 0.33	3.45 ± 2.06	1.59 ± 1.16	1.13 ± 0.62	1.41 ± 0.98
Bone	0.43 ± 0.46	1.52 ± 0.58	0.78 ± 0.21	0.83 ± 0.19	1.15 ± 0.44
Brain	0.08 ± 0.07	0.63 ± 0.09	0.38 ± 0.06	0.22 ± 0.05	0.16 ± 0.09
Tumor	1.79 ± 0.46	4.82 ± 0.91	3.95 ± 0.26	6.28 ± 2.87	3.25 ± 1.15
Tumor/Blood	1.49 ± 0.41	0.38 ± 0.01 <sup>‡</sup>	1.39 ± 0.30	4.09 ± 1.79	1.04 ± 0.60 <sup>‡</sup>
Tumor/Muscle	7.42 ± 3.17	1.59 ± 0.44 <sup>‡</sup>	3.95 ± 1.98	4.46 ± 1.86	2.31 ± 1.46
Tumor/Liver	2.07 ± 1.13	0.60 ± 0.13	0.10 ± 0.01	0.22 ± 0.07	0.24 ± 0.09
Tumor/Kidney	0.17 ± 0.04	0.07 ± 0.01 <sup>‡</sup>	0.28 ± 0.09	0.22 ± 0.11	0.12 ± 0.03
Tumor/Pancreas	0.44 ± 0.17	1.18 ± 0.32 <sup>‡</sup>	0.89 ± 0.11	0.36 ± 0.09	1.80 ± 0.39 <sup>‡</sup>

\* Blocked by injecting 0.1 μmol of non-radiolabeled peptide together with the radiopeptide.

<sup>‡</sup> Co-injection significantly lowered the uptake of the same organ for the corresponding tracer (p<0.05).

## DISCUSSION

Au Canada, les cancers du sein et de la prostate tiennent la première place parmi les cancers diagnostiqués chez les femmes et chez les hommes respectivement. Ces deux cancers combinés ont représenté environ 9650 décès au cours de l'année 2010. Avec le vieillissement de la population, ces cancers toucheront de plus en plus de femmes et d'hommes au cours des prochaines décennies (Association Canadienne du Cancer). Sachant que le dépistage d'un cancer en phase précoce est associé avec un meilleur pronostic et le nombre grandissant de cas de cancers de la prostate et du sein, il est capital de développer des stratégies efficaces de détection précoce.

Les méthodes de dépistage actuellement utilisées ne permettent pas de cibler les cellules cancéreuses de façon spécifique. Elles sont basées sur des caractéristiques physiques telles la densité du tissu (échographie ou IRM) ou des métabolismes généraux non-spécifiques comme la consommation de glucose (TEP et  $^{18}\text{F}$ -FDG). Ces méthodes sont limitées pour la détection de certaines pathologies plus difficilement discernables tel le cancer du sein et de la prostate. En effet, les cellules cancéreuses prostatiques ne présentent pas systématiquement une augmentation de leur consommation de glucose et le positionnement de la prostate derrière la vessie rend l'imagerie plus complexe. Par ailleurs, les cancers mammaires sont difficilement discernables, surtout chez les femmes pré-ménopausées, dû entre autre à la densité du tissu mammaire sain. Pour pallier à ces problèmes, nous proposons d'utiliser une caractéristique des cellules cancéreuses pour le dépistage. Les cellules cancéreuses prostatiques et mammaires surexpriment le récepteur

du peptide de la relâche de la gastrine (GRPR) à leur surface dans 63% et 65-68% des cas, respectivement. Pour cibler ces récepteurs, un peptide, le BBN(6-14), a été conjugué à un chélateur NOTA et marqué à l'aide d'un radio-isotope afin de permettre le ciblage de ces récepteurs *in vivo* et de façon non-invasive par imagerie TEP.

Au cours des dernières années, plusieurs peptides radiomarqués ont été testés chez les petits animaux. De ces études, quelques facteurs déterminants ont été observés pouvant permettre l'amélioration des traceurs disponibles tel la solubilité du composé, l'espaceur utilisé, l'atome radioactif utilisé pour le marquage, la multivalence ainsi que les propriétés agonistes/antagonistes du composé. Dans le cadre de ce projet, nous avons investigué deux paramètres : le radio-isotope utilisé et la multivalence du ligand.

#### 1. Le radio-isotope utilisé pour le marquage des peptides

Le premier objectif était de comparer un peptide, le NOTA-PEG-BBN(6-14) (Figure 1), marqué au  $^{64}\text{Cu}$  et au  $^{68}\text{Ga}$  en tant qu'outils diagnostiques pour la détection du cancer du sein et de la prostate par imagerie TEP.

Le NOTA-PEG-BBN(6-14) présente une excellente affinité pour le GRPR sur les lignées tumorales humaines T47D (cancer du sein) et PC3 (cancer de la prostate), ayant une valeur de constante d'inhibition de l'ordre du nanomolaire ce qui est similaire à celle obtenue pour le ligand naturel, la bombésine. Nous avons également évalué la constante d'inhibition du peptide lorsque complexé avec du Cu(II) ou du Ga(III). Ces mesures d'affinité ont été réalisées sur les cellules T47D. Le Cu(II)/NOTA-PEG-BBN(6-14)

présente une affinité similaire ( $1,60 \pm 0,59$  nM) à celle du peptide non-complexé ( $1,27 \pm 0,95$  nM) indiquant que la présence du Cu(II) à l'intérieur du chélateur ne semble pas influencer l'affinité mesurée. Par contre, le Ga(III)/NOTA-PEG-BBN(6-14) présente une affinité significativement plus faible ( $4,9 \pm 1,3$  nM) pour le GRPR que le NOTA-PEG-BBN(6-14) libre ou complexé avec le Cu(II). Cette différence en affinité peut s'expliquer par la présence d'une charge positive supplémentaire au niveau du complexe Ga(III)/NOTA par rapport au complexe Cu(II)/NOTA. En effet, en contexte physiologique, le chélateur NOTA de notre peptide possède deux groupements carboxylates chargés négativement. Ainsi, le complexe Cu(II)/NOTA est neutre tandis que le complexe Ga(III)/NOTA est chargé positivement. Nous croyons que le contre-ion de cette charge pourrait causer un encombrement stérique nuisant à la liaison entre le peptide et le récepteur réduisant ainsi l'affinité mesurée.

La stabilité des peptides radiomarqués a été évaluée par chromatographie sur couche mince à partir d'aliqots sanguins prélevés à différents temps chez la souris. D'après ces études, le  $^{68}\text{Ga}$ / et le  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) sont stables jusqu'à deux et 20 heures post-injection, respectivement. Ces résultats confirment que les mesures de radioactivité *in vivo* sont dues à la distribution du traceur et non à la présence de métabolites marqués ou de radiométal libre. Des études de captation cellulaire ont été réalisées dans le but d'évaluer les comportements des deux traceurs au niveau des cellules cancéreuses. Les NOTA-PEG-BBN(6-14) marqués au  $^{64}\text{Cu}$  et au  $^{68}\text{Ga}$  présentent une captation cellulaire comparable tant sur les cellules PC3 que T47D. Ainsi, la différence d'affinité observée ne semble pas se traduire par une interaction moins forte avec les GRPR à la surface des cellules cancéreuses *in vitro*.



Les propriétés biologiques *in vivo* des peptides radiomarqués ont été évaluées par études de biodistribution et par imagerie TEP. Les études de biodistribution chez des souris Balb/c femelles présentent une accumulation similaire du  $^{64}\text{Cu}$ / et du  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) au niveau des organes n'exprimant pas le GRPR, tels que le foie, les reins et les muscles. Ces résultats suggèrent que les deux traceurs ont un profil d'élimination similaire, majoritairement via la voie rénale.

Le ciblage des GRPR *in vivo* est connu pour être hautement dépendant de l'affinité des traceurs pour le GRPR plutôt que sur leur capacité d'internalisation. Étant donné que le  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) présente une affinité plus faible sur les cellules T47D, une accumulation spécifique plus faible est attendue pour ce traceur. D'après les études de biodistribution chez les souris Balb/c normales, une accumulation significativement plus faible a été observée au niveau du pancréas et des glandes surrénales, deux organes exprimant le GRPR à haute densité, pour le traceur marqué au  $^{68}\text{Ga}$ . Ces organes présentent une accumulation dépendante du GRPR, telle que démontrée lors des expériences de blocage par co-injection d'un excès de traceur non-marqué autant pour le peptide marqué au  $^{64}\text{Cu}$ / qu'au  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14).

Chez la souris Balb/c nue femelle portant des xénogreffes PC3 et T47D, nous avons d'abord comparé la captation du  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) au niveau des deux types de tumeur. Le traceur présentait une captation et un ratio tumeur/muscle similaires pour les modèles tumoraux étudiés. De plus, les résultats obtenus sont comparables à des valeurs rapportées dans la littérature pour des traceurs équivalents (LANE *et al.*, 2010;

PRASANPHANICH *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2004). Toutefois, les valeurs découlant de l'imagerie TEP pour les tumeurs T47D sont légèrement plus faibles que celle obtenues par biodistribution ce qui pourrait s'expliquer par la densité du tissu tumoral. Les tumeurs T47D sont moins denses que les tumeurs PC3. Ainsi, lorsque la région d'intérêt (ROI) pour l'analyse de l'imagerie TEP est tracée, un moins grand nombre de cellules T47D est contenu pour le même volume de la ROI. Par conséquent, un signal plus faible est observé. Par contre, lors des études de biodistribution, les résultats sont normalisés par unité de masse tumorale et la différence de densité des tissus tumoraux est corrigée. Ainsi, nos méthodes d'analyse ont été jugées valides et ont été utilisées pour les tumeurs PC3.

La captation du  $^{64}\text{Cu}$ / et du  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) des tumeurs PC3 a, par la suite, été comparée par imagerie TEP. La captation tumorale et le ratio tumeur/muscle sont comparables pour les deux traceurs au niveau de la tumeur PC3. De plus, la co-injection d'un excès de peptide non-marqué a significativement diminué l'accumulation du peptide à la tumeur et le ratio tumeur/muscle, démontrant une captation dépendante du GRPR au niveau de la tumeur.

Généralement, le pancréas est considéré comme un bon indicateur des propriétés de ciblage du GRPR d'un peptide lors du développement de traceurs. Par contre, plusieurs études démontrent que ce paradigme n'est pas toujours véridique dû à des différences inter-espèces du GRPR. En effet, dans le cadre de notre étude, nous avons observé une accumulation significativement plus faible pour le  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) au niveau du pancréas et des glandes surrénales exprimant le GRPR de souris. Toutefois, au niveau des tumeurs exprimant le GRPR humain, aucune différence n'a été observée.

Ainsi, nos travaux indiquent que le traceur devrait toujours être évalué au niveau du GRPR de l'espèce considérée.

En conclusion de cette section, nous avons développé deux radiotraceurs ciblant le GRPR présentant d'excellentes propriétés pharmacocinétiques pour l'imagerie *in vivo* du cancer du sein et de la prostate. De plus, nos travaux démontrent que le radio-isotope utilisé pour le marquage module l'affinité pour le récepteur ainsi que les propriétés pharmacocinétiques de peptides radiomarqués ciblant le GRPR. Finalement, une différence inter-espèce a été observée entre le GRPR de souris et de l'humain.

## 2. La multiplicité du ligand peptidique

Le second objectif de cette étude était d'étudier les bénéfices potentiels de l'utilisation d'un composé homodimérique ciblant les GRPR dans la détection du cancer de la prostate par imagerie TEP. Une affinité supérieure, une captation et une rétention tumorale accrues sont attendues pour les composés dimériques par rapport aux composés monomériques.

Les affinités mesurées pour le GRPR sur les cellules PC3 pour le NOTA-PEG-BBN(6-14) [NOTA-monomer], le NOTA-dimer **1** et le NOTA-dimer **2** sont similaires et de l'ordre du nanomolaire. ( $2,5 \pm 1,5$ ,  $2,0 \pm 1,6$  et  $1,8 \pm 1,3$  respectivement). Les études de compétition n'ont démontré aucun avantage pour les composés dimériques.

Par la suite, les traceurs ont été caractérisés par biodistribution chez la souris Balb/c femelle. Ces études ont démontré que ces trois composés ont des profils de

biodistribution différents. Les deux composés homodimériques présentent une accumulation plus importante que le monomère dans la circulation sanguine, la rate, les poumons et les muscles. Ces résultats sont corrélés avec une augmentation des poids moléculaires des composés plutôt qu'une augmentation due à un effet de polyvalence médié par le GRPR, puisque ces organes n'expriment que faiblement ou pas le récepteur. De plus, Liu *et al* ont rapporté des résultats semblables pour leur homodimère ciblant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (LIU *et al.*, 2009). Une accumulation plus grande au niveau du foie pour les deux composés dimériques semble indiquer des voies d'élimination différentes par rapport au monomère. Effectivement, cette accumulation suggère une élimination hépatobiliaire tandis que le monomère était éliminé principalement par la voie rénale. Le foie est un organe important dans le métabolisme du cuivre. Toutefois, les études de stabilité *in vivo* indiquaient une absence de  $^{64}\text{Cu}$  libre au niveau de la circulation sanguine, ce qui démontre que l'accumulation hépatique observée serait principalement due à une excrétion des dimères. Une accumulation accrue au niveau des reins pour les dimères a également été observée et pourrait s'expliquer par le poids moléculaire élevé de ces composés. Les dimères, étant de masse plus élevée, sont éliminés plus lentement par les reins, et en contexte physiologique, ils sont chargés plus positivement que le composé monomère. Les molécules chargées positivement sont mieux retenues par les reins que les composés neutres (BEHR, GOLDENBERG et BECKER, 1998). Le  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimère 2 présente une captation pancréatique 3,6 fois plus élevée que le  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-monomère et le  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimère 1 chez la souris Balb/c femelle, le GRPR étant fortement exprimé dans le pancréas. Cette augmentation marquée ne peut s'expliquer par le poids moléculaire puisque le NOTA-dimère 1 et NOTA-dimère 2 ont un poids moléculaire similaire, mais une captation différente. De plus, des études de blocage en présence de

produit non-radiomarqué ont démontré que la captation pour les trois traceurs est dépendante du GRPR. Ainsi, cette hausse pourrait s'expliquer par un effet statistique de polyvalence. Le NOTA-monomère et le NOTA-dimère **2** ont ensuite été caractérisés *in vitro* et *in vivo* sur les cellules PC3. Étant donné que le NOTA-dimère **1** ne présentait aucun avantage marqué par rapport aux deux autres traceurs, son développement a été arrêté à cette étape.

*In vitro*, le  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimère **2** présente une captation cellulaire plus faible, mais une rétention à la tumeur accrue par rapport au monomère. La captation cellulaire diminuée pourrait refléter une différence au niveau de l'activité biologique des composés. Tel que démontré par Gawlak *et al.*, un monomère agoniste ne résulte pas nécessairement en un dimère agoniste (GAWLAK *et al.*, 1991). Advenant que le NOTA-dimère **2** soit un agoniste partiel tout en ayant une affinité similaire pour le GRPR, il présenterait une internalisation et une captation cellulaire plus faibles. Cet aspect n'a pas été davantage étudié puisque les antagonistes présentent certains avantages comme traceurs pour l'imagerie TEP malgré leur internalisation moins importante (CESCACO *et al.*, 2008). Au niveau des études d'efflux, le NOTA-dimère **2** présente une rétention accrue par les cellules cancéreuses prostatiques PC3 lorsque comparé au NOTA-monomère. Ces résultats pourraient s'expliquer par un effet statistique dû à la multiplicité du composé dimérique.

Les études d'imagerie TEP chez la souris nue portant des tumeurs PC3 ont été utilisées pour comparer la pharmacocinétique et la distribution du NOTA-monomère et du NOTA-dimère **2**. L'imagerie TEP dynamique a permis d'obtenir des courbes d'activité en

fonction du temps qui décrivent l'activité de chaque composé pour la tumeur, le foie, les reins et le muscle en fonction du temps. Le  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimère **2** présente une captation supérieure au niveau du foie et des reins tandis qu'une accumulation similaire pour les deux composés a été observée pour le muscle. Ces résultats correspondent aux données obtenues à partir des études de biodistribution. La captation tumorale est similaire pour les deux composés lors de la première heure post-injection. Ensuite, la rétention tumorale du NOTA-dimère **2** est significativement plus élevée que celle du NOTA-monomère. Ces résultats pourraient s'expliquer par une élimination plus lente pour le NOTA-dimère **2** au niveau de la tumeur, ce qui corrèle avec les résultats observés lors des études d'efflux. Les études de captation cellulaire ont prédit une captation tumorale plus élevée pour le  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-monomère. Toutefois, aucune différence n'a été mesurée *in vivo*. Il a été rapporté que la captation tumorale *in vivo* dépend grandement de l'affinité pour le GRPR tandis que le taux d'internalisation ne joue qu'un rôle mineur (MAINA *et al.*, 2005). Afin de démontrer que la hausse de rétention tumorale du  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimère **2** observée n'est pas simplement due au poids moléculaire, les ratios tumeur/muscle des deux composés ont été comparés. Ainsi, en plus de la rétention accrue à la tumeur, le  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimère **2** présente un ratio tumeur/muscle supérieur. Toutefois, les ratios tumeur/foie et tumeur/reins sont plus faibles pour le  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimère **2**.

Des études de biodistribution ont été réalisées suite à une co-injection d'un excès de traceur non-marqué dans le but de valider les résultats obtenus en imagerie TEP. Ces résultats démontrent une accumulation non-spécifique au niveau de la circulation sanguine, des reins, de la rate et des muscles. La captation hépatique du  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-dimère **2** est diminuée lors de la co-injection. Étant donné que le foie n'exprime que

faiblement le GRPR, cette diminution pourrait s'expliquer par la saturation de l'élimination hépato-biliaire. De plus, une accumulation dépendante du GRPR de nos traceurs a été observée tant au niveau du pancréas que de la tumeur PC3.

Les composés multimériques peuvent présenter une affinité supérieure due à l'effet statistique ou à la liaison simultanée à plusieurs récepteurs. Tous les peptides utilisés dans cette étude présentent seulement de courts espaceurs limitant la possibilité de liaisons multiples simultanées. Ainsi, l'effet statistique semble être le facteur majeur expliquant les résultats observés au niveau du pancréas pour le NOTA-dimère **2**. La liaison au récepteur d'un ligand BBN(6-14) augmente la concentration locale des autres ligands à proximité du récepteur. De cette façon, la dissociation du ligand au récepteur peut être plus facilement suivie de l'attachement d'un autre ligand. Ce phénomène est dépendant de la densité de récepteurs disponibles à la surface des cellules. Le pancréas est un organe exprimant à très haute densité le GRPR tandis que les cellules PC3 l'exprime à une densité plus faible (MANTEY *et al.*, 1993). Cette différence pourrait être un facteur limitant dans le design de nos composés. Les deux dimères testés présentent des espaceurs différents. Ainsi, le NOTA-dimère **2** est composé d'un espaceur plus long que le NOTA-dimère **1**. Lors des études de biodistribution, les deux dimères n'ont pas présenté la même accumulation au niveau du pancréas. Il est possible que l'espacement du NOTA-dimère **2** permet l'effet statistique tandis que le NOTA-dimère **1** ne puisse pas. Au niveau de la tumeur, la densité de GRPR étant plus faible que celle du pancréas, il est possible que l'espacement du NOTA-dimère **2** ne soit pas suffisant pour favoriser cet effet statistique. Ainsi, cette étude démontre la première caractérisation comparative de traceurs

peptidiques homodimériques et monomériques *in vitro* et *in vivo* ainsi que le potentiel diagnostique de ces composés.

## CONCLUSION

L'imagerie TEP est une modalité d'imagerie efficace et non-invasive permettant la détection de nombreux cancers ainsi que leurs métastases. Malheureusement, les traceurs actuellement disponibles en clinique ne sont que peu spécifiques et limitent ainsi l'efficacité de détection de certains types de tumeurs. Par conséquent, le développement de nouveaux traceurs liant des récepteurs surexprimés sélectivement à la surface de cellules cancéreuses permettrait d'augmenter la spécificité de détection pour certains cancers. Au niveau du cancer du sein et de la prostate, le GRPR est un récepteur hautement surexprimé. Ainsi, développer des composés radiomarqués ciblant spécifiquement le GRPR permettrait d'améliorer le diagnostic pour ces cancers. Pour les cibler, un peptide modèle, le NOTA-PEG-BBN(6-14), a été préparé. Puis, deux différents paramètres ont été étudiés afin d'évaluer leur impact sur la capacité de détection du cancer du sein et de la prostate par imagerie TEP.

Dans un premier temps, l'impact du radio-isotope utilisé pour le marquage a été étudié. Pour ce faire, les  $^{64}\text{Cu}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) et  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) ont été comparés. Une baisse de l'affinité pour le GRPR ainsi que de l'accumulation au niveau d'organes exprimant de haut niveau de GRPR a été notée pour le peptide marqué au  $^{68}\text{Ga}$ . Toutefois, au niveau des tumeurs humaines du sein et de la prostate greffées chez la souris, aucune différence n'a été observée. Cette étude démontre l'importance du radio-



isotope utilisé. Ces recherches soulignent également l'importance de la variabilité inter-espèce du GRPR. En effet, le  $^{64}\text{Cu}$  et le  $^{68}\text{Ga}$ /NOTA-PEG-BBN(6-14) présentent une différence d'accumulation spécifique pour les organes exprimant le GRPR murin, mais aucune différence n'est observée au niveau de la tumeur exprimant le GRPR humain.

Le second facteur étudié est la valence du composé sur la capacité de détection du cancer de la prostate par imagerie TEP. Dans ce but, le NOTA-PEG-BBN(6-14) a été comparé à deux homodimères. Cette étude a démontré que les composés homodimériques présentent des accumulations non-spécifiques augmentées au niveau des reins, du foie, des poumons et de la rate qui seraient dues à leurs poids moléculaires élevés. De plus, une augmentation accrue au niveau du pancréas, un organe présentant un haut niveau de GRPR, a été observée uniquement pour le NOTA-dimère **2**, indiquant que l'espacement entre les deux ligands est crucial pour observer un avantage par dimérisation. Ce même composé présente également une rétention accrue au niveau de la tumeur PC3 lorsque comparé au monomère tant *in vitro* qu'*in vivo*. Toutefois, aucune augmentation de la captation tumorale n'a été observée. Ces études représentent les premiers pas dans le développement de traceurs dimériques efficaces ciblant le GRPR.

## **PERSPECTIVE D'AVENIR**

Toutes les données cumulées au cours de ces recherches ont démontré que le développement de traceurs peptidiques ciblant le GRPR est d'abord possible et qu'il s'agit d'un domaine prometteur. Plusieurs aspects restent à être explorés pour l'optimisation du design des composés à utiliser.

D'abord, il serait important et intéressant de vérifier que l'effet de la température d'incubation lors des expériences de liaisons afin de nous assurer que nous œuvrons dans des conditions d'équilibre.

Bien que nous ayons fait varier la valence du composé peptidique et le radio-isotope utilisé pour le marquage, plusieurs autres facteurs seraient intéressants à étudier, tels la méthode de marquage avec des radio-isotopes non-métalliques, le chélateur choisi et le ligand sélectionné.

Dans le cadre de ce projet, le marquage par chélation de radiométaux a été sélectionné et est considéré comme une méthode simple et efficace pour le marquage de peptide. Il serait intéressant de le comparer aux composés marqués au  $^{18}\text{F}$  par exemple. Bien que la chimie soit plus complexe, il serait hautement intéressant de comparer les résultats obtenus à partir de ces deux méthodes de marquage. Actuellement, notre collaborateur au British Columbia Cancer Agency, le Dr François Bénard, étudie les analogues marqués au F-18 de ces mêmes composés.

Plusieurs groupes de recherche ont exploré différents chélateurs, mais rarement une étude comparative est rapportée. Parmi les chélateurs intéressants, il y a le CB-TE2A (GARRISON *et al*, 2007), la SarAR (LEARS *et al*, 2011), le Oxo-DO3A et le PCTA (FERREIRA *et al*, 2010; AIT-MOHAND *et al*, 2011). Nous anticipons des profils de biodistribution différents pour les différents traceurs. Ces études comparatives pourraient nous permettre de moduler la biodistribution d'une classe de composé selon les besoins de l'étude.

Ces études reposent sur un analogue agoniste de la bombésine, le BBN(6-14). Par contre, plusieurs autres ligands antagonistes ont été explorés au cours des dernières années et présentent des résultats surpassant ceux des agonistes. Il serait donc intéressant de comparer notre design agoniste au même design antagoniste.

Une fois tous ces paramètres étudiés, il sera possible de déterminer la meilleure combinaison selon tous les paramètres et de développer un traceur optimal ciblant le GRPR pour l'imagerie TEP du cancer sein et de la prostate.

## RÉFÉRENCES

ABD-ELGALIEL WR, GALLAZZI F, GARRISON JC, ROLD TL, SIECKMAN GL, FIGUEROA SD, HOFFMAN TJ, LEVER SZ. Design, synthesis and biological evaluation of antagonist-bombesin analogue as targeting vector. *Bioconjugate Chemistry* 2008; 19: 2040-2048.

ABIRAJ K, JACCARD H, KRETZSCHMAR M, HELM L. Novel DOTA-based prochelator for divalent peptide vectorization: synthesis of dimeric bombesin analogues for multimodality tumor imaging and therapy. *Chemical Communications* 2008; 28: 3248-3250.

AIT-MOHAND S, FOURNIER P, DUMULON-PERREAULT V, KEIFER GE, JUREK P, FERREIRA C, BENARD F, GUERIN B. Evaluation of <sup>64</sup>Cu-labelled bifunctional chelate-bombesin conjugates. *Bioconjugate Chemistry* 2011; 22: 1729-1735.

ALBRECHT M, DOROSZEWICZ J, GILLEN S, GOMES I, WIHELM B, STIEF T, AUMÜLLER G. Proliferation of prostate cancer cells and activity of neutral endopeptidase is regulated by bombesin and IL-1beta with IL-1beta acting as a modulator of cellular differentiation. *Prostate* 2004;58 :82-94.

APRIKIAN AG, TREMBLAY L, HAN K, CHEVALIER S. Bombesin stimulates the motility of human prostate-carcinoma cells through tyrosine phosphorylation of focal

adhesion kinase and of integrin-associated proteins. *International Journal of Cancer* 1997;72:498-504.

ANASTASI A, ERSPAMER V, BUCCI M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombina and Alytes. *Experientia*. 1971; 27: 166-167

BARTHOLDI MF, WU JM, PU H, TRONCOSO P. In situ hybridization for gastrin-releasing peptide receptor (GRP receptor) expression in prostatic carcinoma. *International Journal of Cancer* 1998;79: 82-90.

BECKER WM, KLEINSMITH LJ, HARDIN J. The world of the cell. (6e édition). Édition Pearson Education, 2006, 796p.

BEHR TM, GOLDENBERG DM, BECKER W. Reducing the renal uptake of radiolabeled antibody fragments and peptides for diagnosis and therapy: present status, future prospects and limitations. *European Journal of Nuclear Medicine* 1998;25:201-212.

BISSIG K-D, HONER M, ZIMMERMANN K, SUMMER KH et SOLIOZ M. Whole animal copper flux assessed by positron emission tomography in the long-Evans cinnamon rat- a feasibility study. *BioMetals* 2005;18:83-88

BOLD RJ, ISHIIZUKA J, YAO CZ, TOWNSEND CM, THOMPSON JC. Bombesin stimulates in vitro growth of human breast cancer independent of estrogen receptor status. *Anticancer Research* 1998;18:4051-4056

BOLOGNA M, FESTUCCIA C, MUZI P, BIORDI L, CIOMEI M. Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer* 1989;63:1714-1720.

BREEMAN WAP, VERBRUGGEN AM. The  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generator has high potential, but when can we use  $^{68}\text{Ga}$ -labelled tracers in clinical routine? *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2007;34:978-981.

CARRITHERS MD, LERNER MR. Synthesis and characterization of bivalent peptide ligands targeted to G-protein-coupled receptors. *Chemistry & Biology* 1996; 3(7): 537-542.

CESCATO R, MAINA T, NOCK B, NIKOLOPOULOU A, CHARALAMBIDIS D, PICCAND V, REUBI JC. Bombesin receptor antagonist may be preferable to agonist for tumor targeting. *Journal of Nuclear Medicine* 2008;49:318-326.

CHAVE HS, GOUGH AC, PALMER K, PRESTON SR, PRIMROSE JN. Bombesin family receptor and ligand gene expression in human colorectal cancer and normal mucosa. *British Journal of Cancer* 2000; 82 (1): 124-130.

CHEN X, PARK R, HOU Y, TOHME M, SHAHINIAN AH, BADING JR, CONTI PS. MicroPET and autoradiographic imaging of GRP receptor expression with  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-

[Lys<sup>3</sup>]Bombesin in human prostate adenocarcinoma xenografts. *Journal of Nuclear Medicine* 2004; 45: 1390-1397.

CORJAY MH, DOBRZANSKI DJ, WAY JM, VIALLET J, SHAPIRA H, WORLAND P, SAUSVILLE EA, BATTLE JF. Two distinct bombesin receptor subtypes are expressed and functional in human lung carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 1991; 266: 18771-18779.

DIJKGRAAF I, YIM C-B, FRANSSEN GM, SCHUIT RC, LUURTSEMA G, LIU S, OYEN WJG, BOERMAN OC. PET imaging of  $\alpha_v\beta_3$  integrin expression in tumors with <sup>68</sup>Ga-labelled mono-, di- and tetrameric RGD peptides. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2011;38:128-137.

DIJKGRAAF I, KRUIJTZER JAW, LIU S, SOEDE AC, OYEN WJG, CORSTENS FHM, LISKAMP RMJ, BOERMAN OC. Improved targeting of the  $\alpha_v\beta_3$  integrin by multimerisation of RGD peptides. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2007; 34: 267-273.

DOWNS-HOLMES C, SILVERMAN P. Breast cancer: overview and updates. *Nurse Practitioner* 2011; 36: 20-26

EHLERS RA, KIM S, ZHANG Y, ETHRIDGE RT, MURRILO C, HELLMICH MR, EVANS DB, TOWNSEND CM Jr, MARK EVERS B. Gut peptide receptor expression in human pancreatic cancers. *Annals of Surgery* 2000; 231 (6): 838-848.

ERSPAMER V, ERSPAMER GF, INSELVINI M. Some pharmacological actions of alytesin and bombesin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1970; 22 (11):875-876

FERREIRA CL, YAPP DTT, CRISP S, SUTHERLAND BW, NG SSW, GLEAVE M, BENSIMON C, JUREK P, KIEFER GE. Comparison of bifunctional chelates for <sup>64</sup>Cu antibody imaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2010;37: 2117–2126.

FERREIRA CL, LAMSA E, WOODS M, DUAN Y, FERNANDO P, BENSIMON C, KORDOS M, GUENTHER K, JUREK P, KIEFER GE. Evaluation of bifunctional chelates for the development of gallium-based radiopharmaceuticals. *Bioconjugate Chemistry* 2010;21: 531–536.

FERRO-FLORESG, ARTEAGA DE MURPHY C, RODRIGEZ-CORTES J, PEDRAZA-LOPEZ M, RAMIREZ-IGLESIAS MT. Preparation and evaluation of <sup>99m</sup>Tc-EDDA/HYNIC-[Lys 3]-bombesin for imaging gastrin-releasing peptide receptor-positive tumours. *Nuclear Medicine Communications*. 2006; 27 (4): 371-376.

FESTUCCIA C, ANGELUCCI A, GRAVINA G, ELEUTERIO E, VICENTINI C, BOLOGNA M. Bombesin-dependent pro-MMP-9 activation in prostatic cancer cells requires beta1 integrin engagement. *Experimental Cell Research* 2002;280:1-11.



FESTUCCIA C, GUERRA F, D'ASCENZO S, GIUNCIUGLIO D, ALBINI A, BOLOGNA M. In vitro regulation of pericellular proteolysis in prostatic tumor cells treated with bombesin. *International Journal of Cancer* 1998;75:418-431.

FLEISCHMAN A, WASER B, GEBBERS J O, REUBI J C. Gastrin-releasing peptide receptors in normal and neoplastic human uterus: involvement of multiple tissue compartments. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2005; 90 (8): 4722-4729.

GARRISON JC, ROLD TL, SIECKMAN GL, FIQUEROA SD, VOLKERT WA, JURISSON SS, HOFFMAN TJ. In vivo evaluation and small-animal PET/CT of a prostate cancer mouse model using <sup>64</sup>Cu bombesin analogs: side-by-side comparison of CB-TE2A and DOTA chelation systems. *Journal of Nuclear Medicine* 2007;48:1327-1337.

GAWLAK SL, KIENER PA, BRASLAWSKY GR, GREENFIELD RS. Homodimeric forms of bombesin as potent antagonists of bombesins on Swiss 3T3 cells. *Growth Factors*. 1991; 3: 159-170.

GILBERT, FJ. Breast cancer screening in high risk women. *Cancer Imaging*. 2008;4:S6-9.

GRIDER JR. Gastrin-releasing peptide is a modulatory neurotransmitter of the descending phase of the peristaltic reflex. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology* 2004; 287:G1109-G1115.

GUÉRIN B, AIT-MOHAND S, TREMBLAY MC, DUMULON-PERREAULT V, FOURNIER P, BÉNARD F. Total solid-phase synthesis of NOTA-functionalized peptides for PET imaging. *Organic Letters* 2010; 12 (2): 280-283.

GUÉRIN B, DUMULON-PERREAULT V, TREMBLAY MC, AIT-MOHAND S, FOURNIER P, DUBUC C, AUTHIER S, BENARD F. [Lys(DOTA)<sub>4</sub>]BVD15, a novel and potent neuropeptide Y analog designed for Y1 receptor-targeted breast tumor imaging. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010; 20 (3): 950-953.

GUGGER M, REUBI JC. Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. *American Journal of Pathology* 1999; 155 (6): 2067-2076.

HALMOS G, WITTLIFF JL, SCHALLY AV. Characterization of bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in human breast cancer and their relationship to steroid receptor expression. *Cancer Research* 1995; 55 (2): 280-287.

HANDL HL, VAGNER J, HAN H, MASH E, HRUBY VJ, GILLIES RJ. Hitting multiple targets with multimeric ligands. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2004; 8:565-586.

HEPPELER A, FROIDEVAUX S, EBERLE AN, MAECKE HR. Receptor targeting for tumor localisation and therapy with radiopeptides. *Current Medicinal Chemistry* 2000; 7: 971-994.

HEUSER M, SCHLOTT T, SCHALLY AV, KAHLER E, SCHLIEPHAKE R, LAABS SO, HEMMERLEIN B. Expression of gastrin releasing peptide receptor in renal cell carcinomas : a potential fonction for the regulation of neoangiogenesis and microvascular perfusion. *Journal of Urology* 2005; 173:2154-2159.

HOFFMAN TJ, QUINN TP, VOLKERT WA. Radiometallated receptor-avid peptide conjugates for specific *in vivo* targeting of cancer cells. *Nuclear Medicine & Biology* 2001; 28:527-539.

ISHIMARU H, KAGEYAMA Y, HAYASHI T, NEMOTO T, EISHI Y, KIHARA K. Expression of matrix metalloproteinase-9 and bombesin/gastrin-releasing peptide in human prostate cancers and their lymph node metastases. *Acta Oncologica* 2002;41:289-296.

JENSEN RT, BATTEY JF, SPINDEL ER, BENYA RV. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian Bombesin Receptors: Nomenclature, distribution, pharmacology, signaling and functions in normal and disease states. *Pharmacological Reviews* 2008; 60 (1): 1-42.

KALLINGAL GJ, MINTZ EM. Gastrin-releasing peptide and neuropeptide Y exert opposing actions on circadian phase. *Neuroscience Letters* 2007; 422: 59-63.

LANTRY LE, CAPPELLETTI E, MADDALENA ME, FOX JS, FENG W, CHEN J, THOMAS R, EATON SM, BOGDAN NJ, ARUNACHALAM T, REUBI JC, RAJU N, METCALFE EC, LATTUADA L, LINDER KE, SWENSON RE, TWEEDLE MF, NUNN AD. <sup>177</sup>Lu-AMBA: Synthesis and characterization of a selective <sup>177</sup>Lu-labeled GRP receptor agonist for systemic radiotherapy of prostate cancer. *Journal of Nuclear Medicine* 2006; 47: 1144-1152.

LEARS KA, FERDANI R, LIANG K, ZHELEZNYAK A, ANDREWS R, SHERMAN CD, ACHILEFU S, ANDERSON CJ, ROGERS BE. In vitro and in vivo evaluation of <sup>64</sup>Cu-labeled SarAR-Bombesin analogs in gastrin-releasing peptide receptor-expressing prostate cancer. *Journal of Nuclear Medicine* 2011;52:470-477.

LECOMTE R, BENTOURKIA M, BÉNARD F. Tomographie d'émission par positrons en oncologie. *Physics in Canada*. 2002;109-116.

LI ZB, CHEN K, CHEN X. <sup>68</sup>Ga-labeled multimeric RGD peptides for microPET imaging of integrin  $\alpha_v\beta_3$  expression. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2008; 35: 1100-1108.

LIU S. Radiolabelled Cyclic RGD Peptides as integrin  $\alpha_v\beta_3$ -targeted radiotracers: maximising binding affinity via bivalency. *Bioconjugate Chemistry* 2009 20 (12): 2199-2213.

LIU Z, NIU G, WANG F, CHEN Z.  $^{68}\text{Ga}$ -labeled NOTA-RGD-BBN peptide for dual integrin and GRPR-targeted tumor imaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2009; 36: 1483-1494.

MAINA T, NOCK BA, ZHANG H, NIKOLOPOULOU A, WASER B, REUBI JC, MAECKE HR. Species differences of bombesin analog interactions with GRP-R define the choice of animal models in the development of GRP-R-targeting drugs. *Journal of Nuclear Medicine* 2005;46:823-830.

MANTEY S, FRUCHT H, COY DH, JENSEN RT. Characterization of bombesin receptors using a novel, potent, radiolabeled antagonist that distinguishes bombesin receptor subtypes. *Molecular Pharmacology* 1993;43:762-774.

MANTEY SA, WEBER HC, SAINZ E, AKESON M, RYAN RR, PRADHAN TK, SEARLES RP, SPINDEL ER, BATTEY JF, COY DH, JENSEN RT. Discovery of a high affinity radioligand for the human orphan receptor, bombesin receptor subtype 3, which demonstrates it has a unique pharmacology compared to other mammalian bombesin receptors. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272 (41): 26062-26071.

MARKWALDER R, REUBI J C. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. *Cancer Research* 1999; 59: 1152-1159.

MCDONALD TJ, JÖRNVALL H, NILSSON G, VAGNE M, GHATEI M, BLOOM SR, MUTTV. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1979; 90: 227-233.

MCDONALD TJ, NILSSON G, VAGNE M, GHATEI M, BLOOM SR, MUTT V. A gastrin releasing peptide from the porcine non-antral gastric tissue. *Gut* 1978; 19: 767-774.

MINAMINO N, KANGAWA K, MATSUO H. Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1983; 114 (2):541-548.

NAGAKAWA O, OGASAWARA M, FUJII H, MURAKAMI K, MURATA J, FUSE H, SAIKI I. Effect of prostatic neuropeptides on invasion and migration of PC-3 prostate cancer cells. *Cancer Letters* 1998;133:27-33.

NOCK B, NIKOLOPOULOU A, CHIOTELLIS E, LOUDOS G, MAINTAS D, REUBI JC, MAINA T. [<sup>99m</sup>Tc]Demobesin 1, a novel potent bombesin analogue for GRP receptor-targeted tumor imaging. *European Journal of Nuclear Medicine* 2003; 30: 247-258.

NOCK B, NIKOLOPOULOU A, GALANIS A, CORDOPATIS P, WASER B, REUBI JC, MAINA T. Potent bombesin-like peptides for GRP-receptor targeting of tumors with <sup>99m</sup>Tc: a preclinical study. *Journal of Medicinal Chemistry* 2005; 48: 100-110.

PATEL O, SHULKES A, BALDWIN GS. Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1766: 23-41.

PRASANPHANICH A F, NANDA P K, ROLD T L, MA L, LEWIS M R, GARRISON J C, HOFFMAN T J, SLECKMAN G L, FIGUEROA S D, SMITH C J. [<sup>64</sup>Cu-NOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH<sub>2</sub>] targeting vector for positron-emission tomography imaging of gastrin-releasing peptide receptor-expressing tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007; 30: 12462-12467.

PUJATTI PB, SANTOS JS, MASSICANO AV, MENGATTI J, DE ARAUJO EB. Development of a new bombesin analog radiolabeled with lutetium-177: in vivo evaluation of the biological properties in balb-C mice. *Cellular and Molecular Biology* 2010; 56 (2): 18-24.

RAVINDER M, SCHELLHAMMER PF. Treatment options for localized prostate cancer. *American Family Physician*. 2011; 84(4):413-420.

REUBI JC. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocrine Reviews*. 2003; 24 (4): 389-427.

REUBI JC, MÄCKE HR, KRENNING EP. Candidates for peptide receptor Radiotherapy: today and in the future. *Journal of Nuclear Medicine* 2005; 46 suppl: 67S-75S.

REUBI J C, WENGER S, SCHMUCKLI-MAURER J, SCHAER JC, GUGGER M. Bombesin receptor subtypes in human cancers : detection with the universal radioligand (<sup>125</sup>I)-[D-TYR(6),beta-ALA(11), PHE(13), NLE(14)]bombesin(6-14). *Clinical Cancer Research* 2002; 8(4): 1139-1146.

ROESLER R, HENRIQUES JA, SCHWARTSMANN G. Gastrin-releasing peptide receptors as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *Central Nervous System & Neurological Disorders - Drug Targets* 2006; 5: 197-204.

SAHA GB. Fundamentals of nuclear pharmacy. (5e édition). Édition Springer, 2003, 382p.

SANO H, FREIGHNER SD, HRENIUK DL, IWASSA H, SAILER AW, PAN J, REITMAN ML, KANATANI A, HOWARD AD, TAN CP. Characterization of the bombesin-like peptide receptor family in primates. *Genomics*. 2004; 84:139-146.

SAURIN JC, ROULAT JP, ABELLO J, BERGER F, REMY L, CHAYVIALLE JA. High gastrin-releasing peptide receptor mRNA level is related to tumor dedifferentiation and lymphatic vessel invasion in human colon cancer. *European Journal of Cancer*. 1999; 35 (1): 125-132.



SCHEFFEL U, POMPER MG. PET imaging of GRP receptor expression in prostate cancer. *Journal of Nuclear Medicine* 2004; 45(8):1277-1278.

SCHUHMACHER J, ZHANG H, DOLL J, MÄCKE HR, MATYS R, HAUSER H, HENZE M, HABERKORN U, EISENHUT M. GRP receptor-targeted PET of a rat pancreas carcinoma xenograft in nude mice with a <sup>68</sup>Ga-labeled bombesin(6-14) analog. *Journal of Nuclear Medicine* 2005; 46: 691-699.

SILVA OE, ZURRIDA S. Breast cancer: a practical guide. (2e édition). Édition Elsevier Science B.V. 2000, 542p.

SMITH CJ, GALI H, SIECKMAN GL, HAYES DL, OWEN NK, MAZURU DG, VOLKERT WA, HOFFMAN TJ. Radiochemical investigations of <sup>177</sup>Lu-DOTA-8-Aoc-BBN[7-14]NH<sub>2</sub>: an in vitro/in vivo assessment of the targeting ability of this new radiopharmaceutical for PC-3 human prostate cancer cells. *Nuclear Medicine & Biology* 2003; 30 (2): 101-109.

SMITH CJ, SIECKMAN GL, OWEN NK, HAYES DL, MAZURU DG, VOLKERT WA, HOFFMAN TJ. Radiochemical investigations of [<sup>188</sup>Re(H<sub>2</sub>O)(CO)<sub>3</sub>-diaminopropionic acid-SSS-bombesin(7-14)NH<sub>2</sub>]: synthesis, radiolabeling and in vitro/in vivo GRP receptor targeting studies. *Anticancer Research*. 2003; 23: 63-70.

SMITH CJ, VOLKERT WA et HOFFMAN TJ. Gastrin releasing peptide (GRP) receptor targeted radiopharmaceuticals: a concise update. *Nuclear Medicine & Biology* 2003;30;861-868.

SOCIÉTÉ CANADIENNE DU CANCER. Cancer du sein : comprendre le diagnostic. 2011, 26p.

SOCIÉTÉ CANADIENNE DU CANCER. Cancer de la prostate : comprendre le diagnostic. 2007, 21p.

SUN B, HALMOS G, SCHALLY AV, WANG X, MARTINEZ M. Presence of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide and mRNA for three receptor subtypes in human prostate cancers. *Prostate*. 2000; 42 (4): 295-303.

SUN B, SCHALLY AV, HALMOS G. The presence of receptors for bombesin/GRP and mRNA for three receptor subtypes in human ovarian epithelial cancers. *Regulatory Peptides* 2000; 90 (1-3): 77-84.

TANG C, BLEMOND I, OFFERHAUS GJ ET AL. Expression of receptors for gut peptides in human pancreatic adenocarcinoma and tumor-free pancreas. *British Journal of Cancer*. 1997; 75 (10): 1467-1473.

UCHINDA K, KOJIMA A, MOROKAWA N, TANABE O, ANZAI C, KAWAKAMI M, ETO Y, YOSHIMURA K. Expression of progastrin-releasing peptide and gastrin-

releasing peptide receptor mRNA transcripts in tumor cells of patients with small cell lung cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2002; 128 (12): 633-640.

WEINER RE, THAKUR ML. Radiolabeled peptides in the diagnosis and therapy of oncological diseases. *Applied Radiation and Isotopes* 2002; 57(5): 749-763.

XIAO D, CHINNAPPAN D, PESTELL R, ALBANESE C, WEBER HC. Bombesin regulates cyclin D1 expression through the early growth response protein Egr-1 in prostate cancer cells. *Cancer Research* 2005;65(21):9934-42.

XIAO D, WANG J, HAMPTON LL, WEBER C. The human gastrin-releasing peptide receptor gene structure, its tissue expression and promoter. *Gene*. 2001; 264: 95-103.

YANG YS, ZHANG X, XIONG Z, CHEN X. Comparative in vitro and in vivo evaluation of two <sup>64</sup>Cu-labeled bombesin analogs in a mouse model of human prostate adenocarcinoma. *Nuclear Medicine and Biology*. 2006; 33: 371-380.

ZHANG H, SCHUHMACHER J, WASER B, WILD D, EISENHUT M, REUBI JC, MAECKE HR. DOTA-PESIN, a DOTA-conjugated bombesin derivative designed for the imaging and targeted radionuclide treatment of bombesin receptor-positive tumors. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2007; 34: 1198-1208.

ZHANG X, CAI W, CAO F, SCHREIBMANN E, WU Y, WU JC, XING L, CHEN X.

<sup>18</sup>F-Labeled bombesin analogs for targeting GRP receptor-expressing prostate cancer.

*Journal of Nuclear Medicine* 2006; 47: 492-501.