

Développement de nouveaux radiopharmaceutiques pour le diagnostic et le traitement du cancer

Bouchra Hajjaj, Theodosia Maina-Nock, Panteleimon J. Marsouvanidis, Luc Brunel, Céline M'Kadmi, Ingrid L. Bakker, Jean-Alain Fehrentz, Berthold Nock, Marion de Jong et Jean Martinez

Résumé La surexpression des récepteurs GRPR (« gastrine releasing peptide ») au niveau de différents types de cancers communs offre la possibilité d'utiliser des antagonistes radiomarqués de la bombésine (un ligand endogène des récepteurs GRPR) pour leur diagnostic et leur traitement. Cet article illustre brièvement la conception, la synthèse et l'évaluation biologique de trois radiopharmaceutiques potentiels, constitués de JMV594, l'antagoniste du récepteur GRPR, d'un nombre croissant de résidus β -alanines comme bras espaceur et du DOTA, un chélatant de métaux couramment utilisé. Cette étude a pour but de déterminer la longueur du bras espaceur permettant une optimisation des propriétés biologiques.

Mots-clés Cancers, bombésine, récepteurs GRPR, antagonistes, imagerie médicale, bras espaceur, DOTA.

Abstract **Development of novel radiopharmaceuticals for the diagnosis and treatment of cancer**

The abundant expression of the gastrin releasing peptide receptor (GRPR) in many frequently occurring human cancers provides the opportunity to use radiolabeled bombesin receptor antagonists, interesting for not eliciting adverse effects after intravenous injection, for tumor visualization and treatment. This article reports the design, synthesis and biological evaluation of three radiopharmaceutical compounds, based on the GRPR-antagonist JMV594, with an increasing number of β -alanine residues in the spacer sequence and coupled to the chelator DOTA. This study aimed to determine the best linker length to optimize the biological properties.

Keywords Cancers, bombesin, GRPR, antagonists, medical imaging, spacer, DOTA.

En France, un homme sur deux et une femme sur trois se verra diagnostiquer un cancer avant 85 ans. Avec en moyenne 60 % de taux de guérison, le cancer est la première cause de mortalité chez les hommes et la deuxième chez les femmes. Les principaux cancers sont les cancers du sein, de la prostate, des poumons et du colon/rectum, qui sont responsables de près de la moitié de tous les décès par cancer en France.

L'un des moyens déployés pour détecter et évaluer l'ampleur de cette maladie est l'imagerie médicale. Ce domaine, en constant progrès, a notamment pour objectifs le dépistage précoce des tumeurs, la détermination de leur localisation exacte pour permettre une meilleure précision du geste chirurgical, l'évaluation de l'état d'avancement du cancer et l'appréciation de l'efficacité des traitements. Les progrès de l'imagerie médicale ont considérablement modifié la prise en charge des patients et devraient continuer à l'améliorer. Parmi les techniques d'imagerie, les techniques SPECT (tomographie d'émission monophotonique) et PET (tomographie par émission de positrons), basées sur l'utilisation de composés radiomarqués, ont suscité notre intérêt.

Le développement de peptides radiomarqués pour la visualisation et le traitement de cancers est un domaine de recherche en plein essor. Ainsi, certains analogues de la somatostatine radiomarqués avec de l'indium-111, tels que l'OctréoScan® ($[^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1]$ octréotide), sont à présent largement utilisés dans le monde médical pour

visualiser des tumeurs neuroendocriniennes. Cependant, de nombreux types de cancers communs, tels que le cancer du sein, de la prostate et des poumons, ne surexpriment pas les récepteurs de la somatostatine mais d'autres récepteurs tels que ceux de la bombésine [1-2]. C'est sur ce modèle et cette observation que s'est fondée la possibilité de développer des analogues de la bombésine radiomarqués pour la localisation et/ou le traitement des tumeurs surexprimant les récepteurs GRPR (« gastrin releasing peptide receptors »).

Conception de nos radiopharmaceutiques

La bombésine est un peptide actif isolé en 1971 par Anastasi *et coll.* [3] au niveau de la peau d'amphibiens (figure 1). Un de ses homologues chez les mammifères, le GRP (« gastrin releasing peptide »), est une hormone isolée en 1979 dans les tissus de l'estomac du porc par McDonald *et coll.* [4] sous la forme d'un peptide constitué de 27 acides aminés (figure 1).

- (1) pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂
- (2) H-Ala-Pro-Val-Ser-Val-Gly-Gly-Gly-Thr-Val-Leu-Ala-Lys-Met-Tyr-Pro-Arg-Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂

Figure 1 - Structure primaire de la bombésine (1) et du GRP (2) ; les acides aminés qui diffèrent sont en rouge.

On pourra noter que seul un acide aminé diffère dans la structure du décapeptide C-terminal de la bombésine et du GRP. Ceci explique la similitude de ces ligands endogènes en termes d'activité biologique. En effet, une étude basée sur la synthèse d'analogues plus ou moins longs de la bombésine [5] a permis de mettre en évidence que le peptide C-terminal constitue la séquence minimale nécessaire au maintien de l'activité biologique du GRP. Nous avons donc utilisé des analogues du nonapeptide C-terminal de la bombésine ou du GRP pour concevoir nos radiopharmaceutiques.

Pendant longtemps, la conception de ces composés radiopharmaceutiques était basée sur des composés agonistes et non antagonistes des récepteurs GRPR. Ceci est notamment dû au fait que les agonistes ont la capacité, après liaison aux récepteurs, de s'internaliser avec leurs récepteurs et permettent donc *in vivo* une grande accumulation du radioligand au niveau de la tumeur. Cependant, de récentes études montrent que les radioligands basés sur les antagonistes possèdent *in vivo* un meilleur profil en dépit de leur incapacité à être internalisés, permettant ainsi de diminuer les effets secondaires [6]. En se basant sur ces constatations, nous avons décidé de synthétiser des composés radiopharmaceutiques constitués d'un antagoniste du nonapeptide C-terminal de la bombésine, d'un chélatant qui permet de complexer un radionucléide et d'un bras espaceur constitué de résidus de β -alanine (β -ala).

Étude de l'importance du bras espaceur [7]

Le bras espaceur définit le positionnement du peptide par rapport au chélatant et donc au radionucléide. Il semble ainsi avoir un impact important sur les propriétés biologiques du radiopharmaceutique. La première étape de ce projet a été de déterminer la longueur du bras espaceur, comportant un, deux ou trois résidus de β -ala, permettant une optimisation des propriétés biologiques. Pour mener cette étude, nous avons choisi d'utiliser comme chélatant le DOTA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique), car il permet à la fois de complexer des radionucléides utilisés en imagerie médicale (^{111}In) et en thérapie (^{177}Lu , ^{90}Y , ^{213}Bi). Nous avons utilisé comme peptide le composé JMV594 qui comporte un résidu statine dans sa partie C-terminale. Ce composé antagoniste, découvert au laboratoire, possède une très bonne affinité pour les récepteurs GRPR ($K_i = 0,9 \pm 0,3$ nM chez le rat) [8]. Pour finir, le radionucléide choisi est l'indium-111, qui forme un complexe thermodynamiquement très stable avec le DOTA (figure 2).

La stratégie utilisée pour préparer ces composés a été une synthèse par fragments au niveau de la liaison Gly-His et l'introduction du DOTA en dernier lieu dans le but de limiter les coûts de synthèse (figure 3).

Cette stratégie de synthèse par fragments est rendue possible grâce à la présence de la glycine qui ne possède pas de carbone asymétrique, et qui permet donc d'éviter le risque d'épimérisation par formation d'un cycle oxazolone lors de l'activation du fragment A_x . La stratégie Fmoc/tBu a été utilisée pour synthétiser le fragment A_x sur support solide. Le fragment B a quant à lui été préparé en solution en utilisant la stratégie Boc.

Avant d'être radiomarqués, l'affinité des composés vis-à-vis des récepteurs humains GRPR a été mesurée par compétition contre la [^{125}I]Tyr4-bombésine dans des cellules PC-3 exprimant l'adénocarcinome de prostate. Les composés déplacent le radioligand des sites de liaison GRPR

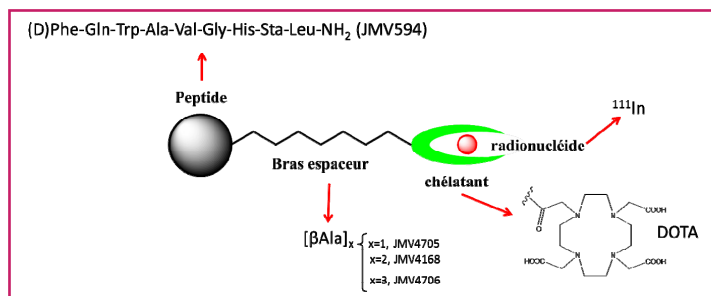


Figure 2 - Schéma des radiopharmaceutiques synthétisés.

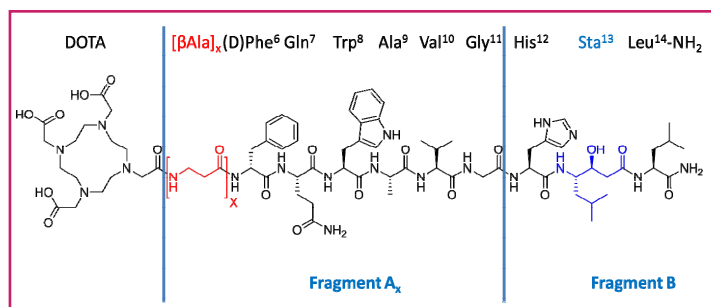


Figure 3 - Stratégie de synthèse des composés JMV4705, JMV4168 et JMV4706.

de manière monophasique et dose-dépendante. Les valeurs d' IC_{50} se situent dans les concentrations nanomolaires : JMV4705 ($x = 1$), $\text{IC}_{50} = 7,2 \pm 0,6$ nM ; JMV4168 ($x = 2$), $\text{IC}_{50} = 8,2 \pm 0,7$ nM ; JMV4706 ($x = 3$), $\text{IC}_{50} = 5,4 \pm 0,7$ nM. Leurs propriétés antagonistes ont ensuite été évaluées dans un test de libération du calcium intracellulaire induit par la bombésine dans des cellules PC-3 exprimant les GRPR. Les trois composés sont incapables d'induire la mobilisation de calcium intracellulaire, jusqu'à une concentration de 10 μM . Ils inhibent de manière monophasique et dose-dépendante la mobilisation calcique induite par 1 nM de bombésine avec des efficacités différentes : JMV4705, $\text{IC}_{50} = 11 \pm 1,6$ nM ; JMV4168, $\text{IC}_{50} = 130 \pm 34$ nM ; JMV4706, $\text{IC}_{50} = 137 \pm 16$ nM. Ces composés présentent donc bien un caractère antagoniste vis-à-vis des GRPR.

D'autre part, les tests biologiques, menés sur les peptides radiomarqués à l'indium-111, montrent que ces derniers présentent une stabilité *in vivo* chez la souris saine de l'ordre de 60 % 5 min après injection intraveineuse. Enfin, les trois radiopeptides permettent de cibler rapidement les récepteurs GRPR surexprimés au niveau des cellules humaines de la lignée tumorale prostatique PC-3 tout en étant rapidement éliminés des tissus non ciblés (non tumoraux) par les urines *via* les reins (figure 4).

Parmi ces trois radiopeptides, le composé [^{111}In]JMV4168, contenant deux résidus β -alanine, présente la plus grande rétention au niveau de la tumeur (figure 4). C'est donc le meilleur candidat pour l'imagerie médicale, montrant ainsi que le choix du bras espaceur est très important dans la conception d'un radiopharmaceutique.

Images de cancer de la prostate

Des tests d'imagerie SPECT/CT (technique d'imagerie couplant la tomographie d'émission monophotonique et la tomodensitométrie) ont été réalisés avec le composé [^{111}In]JMV4168 pour illustrer l'intérêt de ce radiopharmaceutique. Pour cela, le composé [^{111}In]JMV4168 a été

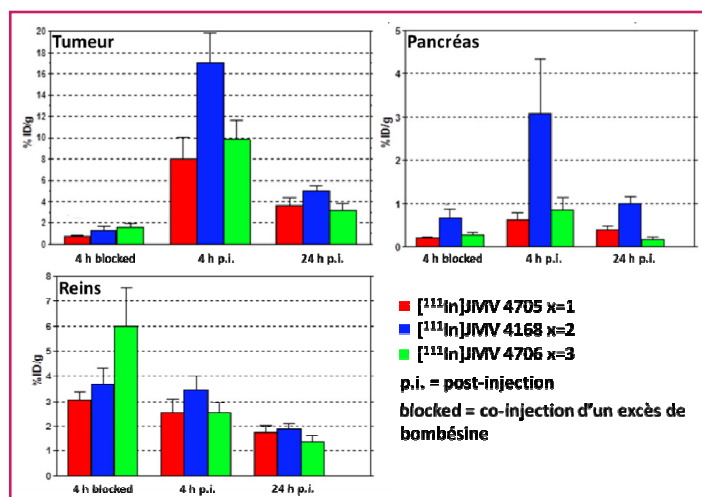


Figure 4 - Distribution chez la souris des composés constitués d'un (¹¹¹In)JMV4705), deux (¹¹¹In)JMV4168) ou trois (¹¹¹In)JMV4168) résidus β-alanine au niveau de la tumeur humaine de la prostate greffée sous la peau de la souris, du pancréas et des reins de la souris.

injecté à une souris DICS (déficit immunitaire combiné sévère) présentant une tumeur prostatique humaine (PC3) [9]. Sur ces images, la tumeur se distingue très clairement une et quatre heures post-injection intraveineuse du composé [¹¹¹In]JMV4168 (figure 5).

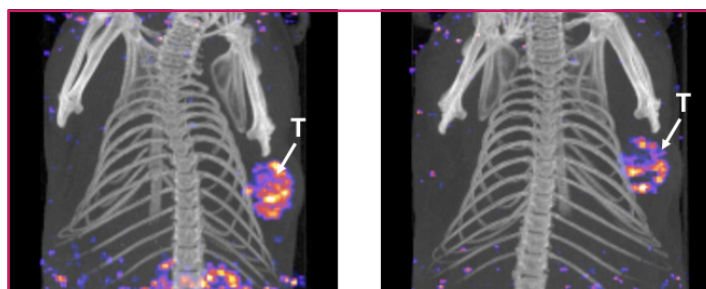


Figure 5 - Images SPECT/CT d'une tumeur (T) humaine de la prostate greffée chez une souris obtenues 1 h (gauche) et 4 h (droite) après injection intraveineuse dans un volume de 100 µL du composé [¹¹¹In]JMV4168 (250 pmol).

Vers le développement de meilleurs candidats et vers la radiothérapie

Bien que le composé [¹¹¹In]JMV4168 présente de très bonnes propriétés biologiques pour l'imagerie médicale, sa stabilité *in vivo* doit être améliorée. En se basant sur le composé JMV4168, nous envisageons de synthétiser de nouveaux radiopharmaceutiques présentant des modifications ponctuelles dans la séquence de l'antagoniste de la bombésine.

La capacité de ces radiopharmaceutiques à transporter le radioisotope au niveau des cellules cancéreuses ouvre la porte à des applications thérapeutiques. En effet, si l'on remplace dans nos molécules l'indium-111 par un radioélément émettant un rayonnement ionisant de type β⁻, tel que le lutécium-177, on peut espérer induire la destruction de ces cellules cancéreuses.

Ainsi des études préliminaires, visant à déterminer l'applicabilité dans le domaine de la radiothérapie du composé JMV4168 complexé au lutécium-177, ont montré

Bertrand Castro, un universitaire et industriel accompli

La récente disparition d'une des grandes figures de la Région Languedoc-Roussillon m'a incité à rappeler brièvement la carrière de Bertrand Castro et son rôle dans la chimie française, académique et industrielle. Ses compétences et sa personnalité atypique, ses qualités humaines et professionnelles, ont fait en effet de lui un grand scientifique et un homme de grand cœur, dont la chimie française peut s'enorgueillir.



Ingénieur, diplômé en 1961 de l'École Nationale Supérieure de Chimie de Paris, il rejoint le laboratoire du professeur Henri Normant dans lequel il prépare et obtient en 1966 une thèse sur des magnésiens. Après un passage à l'Université de Nancy I, d'abord maître de conférences puis professeur en 1975, il y codirigera avec Bernard Gross jusqu'en 1981 l'ERA 558 du CNRS « Méthodes de synthèse appliquées en série des sucres, des peptides et molécules apparentées », tout en dirigeant le Service commun Inserm 19 Peptides de synthèse. En 1981, nommé professeur de 1^{ère} classe à l'École Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, il sera l'un des artisans de la création en 1982 du Centre CNRS-Inserm de pharmacologie-endocrinologie (CCPE) de Montpellier, institut au sein duquel il est d'abord responsable de l'équipe « Chimie des peptides » et dont il devient le directeur de 1986 à 1989. Inspirateur du Groupe Français des Peptides et Protéines (GFPP), de la première réunion qui a rassemblé les « peptidistes » français en 1977, Bertrand restera le père du « BOP », agent de couplage universel.

Aussi à l'aise en chimie théorique que dans le domaine des procédés, attaché aux applications de la chimie dans le secteur de la santé et de l'environnement, Bertrand Castro fait partie des chimistes qui ont suscité l'intérêt du monde industriel. Il a ainsi, sans renier son goût pour la recherche fondamentale, rejoint en 1989 l'industrie pharmaceutique comme directeur du développement chimique industriel puis directeur scientifique pour les affaires industrielles, au sein des laboratoires Sanofi Chimie et Sanofi-Aventis.

Membre de la Société Chimique de France, lecteur assidu de *L'Actualité Chimique*, il a été distingué à plusieurs reprises par la communauté scientifique. Il a ainsi été lauréat de la Société Chimique de France (Prix Willemart, 1967, Prix Le Bel, 1976) et de l'Académie des sciences (Prix Henri Labbé, 1985). Il a reçu la Médaille d'argent du CNRS (1986) et le Grand Prix Industriel SFC-SCI (1999).

Bertrand Castro a toujours gardé des activités scientifiques, restant en contact étroit avec la recherche et l'innovation. Et il s'est, tout au long de sa vie, ressourcé dans la musique, qu'il adorait retrouver au clavier de son piano.

Jean Martinez

des résultats prometteurs dans le traitement de tumeurs humaines surexprimant les récepteurs GRPR.

Conclusion

Le développement de radiopharmaceutiques pour l'imagerie et/ou le traitement de cancers n'est pas une approche simple. Il nécessite de prendre en compte différents paramètres, tels que la longueur du bras espaceur, la stabilité des peptides ou pseudopeptides concernés. Dans ce travail, nous avons brièvement présenté la conception, la synthèse et l'évaluation biologique de trois radiopeptides dont le bras espaceur est constitué de un, deux ou trois

résidus β -alanines. Parmi ces composés, le radiopeptide présentant deux résidus β -alanines ($[^{111}\text{In}]\text{JMV4168}$) offre les meilleurs résultats précliniques. Cependant, bien que ce composé présente de très bonnes propriétés biologiques pour l'imagerie médicale, sa stabilité, qui permet son utilisation *in vivo* par co-injection d'inhibiteurs enzymatiques, peut être améliorée. Dans la même optique, nous développons également au laboratoire des antagonistes des récepteurs de la cholécystokinine pour le traitement et/ou la visualisation de cancers médullaires de la thyroïde.

Références

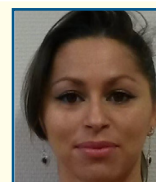
- [1] Reubi J.C., Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy, *Endocrine Reviews*, **2003**, 24, p. 389.
- [2] Patel O., Shulkes A., Baldwin G.S., Gastrin-releasing peptide and cancer, *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, 1766, p. 23.
- [3] Anastasi A., Erspamer V., Bucci M., Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians, *Bombina* and *Alytes*, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **1971**, 27, p. 166.
- [4] McDonald T.J., Jörnvall H., Nilsson G., Vagne M., Ghatei M., Bloom S.R., Mutt V., Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1979**, 90, p. 227.
- [5] Broccardo M., Falconieri Erspamer G., Melchiorri P., Negri L., de Castiglione R., Relative potency of bombesin-like peptides, *Br. J. Pharmacol.*, **1975**, 55, p. 221.
- [6] Cescato R., Maina T., Nock B., Nikolopoulou A., Charalambidis D., Piccand V., Reubi J.C., Bombesin receptor antagonists may be preferable to agonists for tumor targeting, *J. Nucl. Med.*, **2008**, 49, p. 318.
- [7] Marsouvanidis P.J., Nock B.A., Hajjaj B., Fehrentz J.A., Brunel L., M'Kadmi C., van der Graaf L., Krenning E.P., Maina T., Martinez J., de Jong M., Gastrin releasing peptide receptor-directed radioligands based on a bombesin antagonist: synthesis, (^{111}In) -labeling, and preclinical profile, *J. Med. Chem.*, **2013**, 56, p. 2374.
- [8] Azay J., Nagain C., Linares M., Devin C., Fehrentz J.A., Bernad N., Roze C., Martinez J., Comparative study of *in vivo* and *in vivo* activities of bombesin pseudopeptide analogs modified on the C-terminal dipeptide fragment, *Peptides*, **1998**, 19, p. 57.
- [9] De Jong M., Essers J., van Weerden W.M., Imaging preclinical tumor models: improving translational power, *Nature Reviews Cancer*, **2014**, 14, p. 481.



B. Hajjaj



L. Brunel



C. M'Kadmi



J.A. Fehrentz



J. Martinez



T. Maina



P.J. Marsouvanidis



B.A. Nock



I.L. Bakker

Bouchra Hajjaj est doctorante, **Luc Brunel**, ingénieur d'études, **Céline M'Kadmi**, technicien biologiste, à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM). **Jean Alain Fehrentz** est directeur adjoint et **Jean Martinez**, responsable du Département des acides aminés, peptides et protéines et directeur de l'Institut¹.



M. de Jong

Theodosia Maina est directrice de recherche, **Panteleimon J. Marsouvanidis**, doctorant, et **Berthold A. Nock**, directeur de recherche, au National Center of Scientific Research « Demokritos » à Athènes².

Ingrid L. Bakker est doctorante et **Marion de Jong**, professeur, au Département de Médecine nucléaire et radiologique, Erasmus MC, Rotterdam, Pays-Bas³.

¹ Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247 CNRS-UM1-UM2-ENSCM, 15 avenue Charles Flahault, BP 14491, F-34093 Montpellier Cedex 5.

² Molecular Radiopharmacy, INRASTES, NCSR « Demokritos », Agia Paraskei Attikis, PO Box 60037, G-15310 Athènes.

³ Département de Médecine nucléaire et radiologique, Erasmus MC, Postbus 2040, NL-3000 CA Rotterdam.

Vos attentes volent

en éclats

Repenser la spectroscopie modulaire pour les laboratoires de pointe



Le QEPro envoie les spectromètres modulaires à barrettes CCD à un niveau de performance inégalé. Le retour d'expériences de nos clients depuis plus de 20 ans, a permis de se focaliser sur des critères d'excellence nécessaires: Haute sensibilité, une très bonne fidélité des données, et une stabilité thermique performante pour la spectroscopie de fluorescence, Raman et autres mesures.



Notre représentant en France: www.idil-fibres-optiques.com | Info@idil.fr | Tel: 02 96 05 40 20