

Radioimmunothérapie préciblée de la carcinose péritonéale par chimie bioorthogonale

Aurelie Rondon

▶ To cite this version:

Aurelie Rondon. Radioimmunothérapie préciblée de la carcinose péritonéale par chimie bioorthogonale. Sciences agricoles. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT: 2018CLFAS009. tel-02275818

HAL Id: tel-02275818 https://theses.hal.science/tel-02275818

Submitted on 2 Sep 2019

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

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

UNIVERSITÉ CLERMONT-AUVERGNE

Année 2018 N° d'ordre :

École Doctorale Des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement

Thèse

Présentée à l'Université Clermont-Auvergne Pour l'obtention du grade de DOCTEUR (Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Soutenue le 11 décembre 2018

Par

Aurélie RONDON

RADIOIMMUNOTHÉRAPIE PRÉCIBLÉE DE LA CARCINOSE PÉRITONÉALE PAR CHIMIE BIOORTHOGONALE

Rapporteurs: Pr. Françoise Kraeber-Bodéré, PU-PH, Université de Nantes

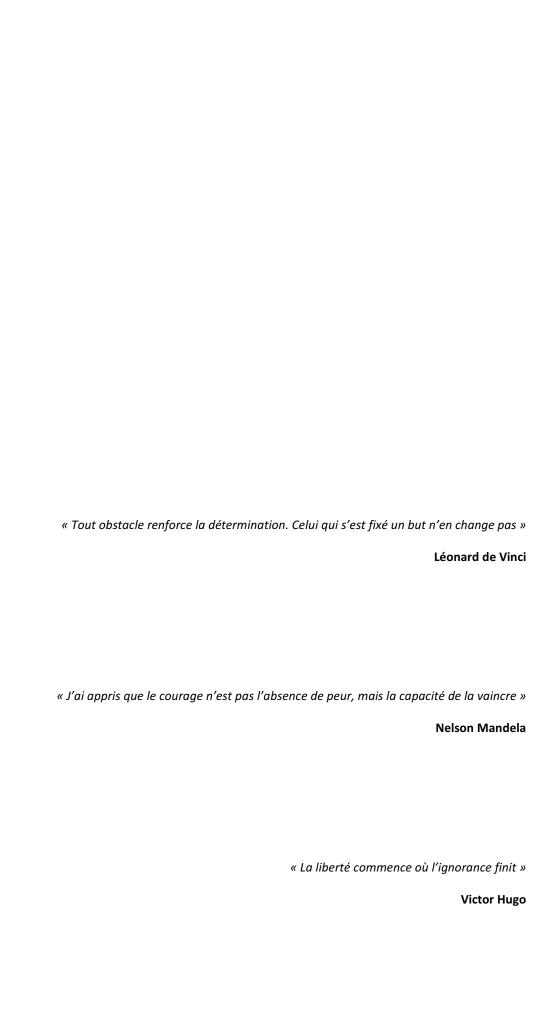
Dr. Nicolas Joubert, MCU, Université de Tours

Membres du jury : Dr. Claude Boucheix, DR INSERM, U935, Villejuif

Pr. Jean-Michel Chezal, PR, UMR 1240, Université Clermont-Auvergne,

Directeur de thèse : Dr. Françoise Degoul, CR INSERM, UMR1240, Clermont-Ferrand Co-Directeur : Dr. Isabelle Navarro-Teulon, CR IRCM, U1194 INSERM, Montpellier

Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques (IMoST) Université Clermont-Auvergne/INSERM UMR 1240 58 Rue Montalembert, 63005 Clermont-Ferrand Cedex



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le P^r Françoise Kraeber-Bodéré et le D^r Nicolas Joubert de me faire l'honneur d'évaluer ces travaux en ayant accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci également au D^r Claude Boucheix et au P^r Jean-Michel Chezal pour avoir accepté d'être examinateur ainsi que pour votre aide et vos conseils pertinents concernant le projet pretargeting. Merci à vous de faire partie de ce jury.

Je remercie également le D^r Elisabeth Miot-Noirault, directrice de l'UMR 1240 et le D^r Jean-Pierre Pouget, directeur d'équipe à l'IRCM de Montpellier ainsi que l'entreprise Cyclopharma pour leurs soutiens respectifs.

Un grand merci à mes directrices de thèse, D' Françoise Degoul et D' Isabelle Navarro-Teulon pour leur encadrement durant ces trois années. Isabelle, bien que je n'ai pas passé autant de temps à Montpellier que ce qui était initialement prévu, j'ai néanmoins beaucoup apprécié les échanges que nous avons eu et je tiens à te remercier pour ton aide et ta disponibilité.

Un grand merci également aux chimistes et analyticiens de la team pretargeting (anciennement projet PEARL): D' Emmanuel Moreau, D' Nancy Ty, D' Sébastien Schmitt, D' Mercedes Quintana, P' Bernadette Bouchon et D' Jean-Baptiste Bequignat pour leur grande contribution dans ce projet. Sans vos molécules, les conjugaisons aux anticorps et les radiomarquages nous n'aurions pas pu aller bien loin dans ce projet donc merci à vous. Manu, je tiens à te remercier pour ton grand investissement sur ce projet. Nancy, Seb, partir en congrès avec vous en Allemagne aura été une belle aventure. Entre les ratés au niveau des transports en commun et les nombreuses péripéties du voyage j'en garderai un excellent souvenir, merci.

Je tiens à remercier le D^r Arnaud Briat pour ses formations, sa disponibilité et son aide précieuse concernant l'imagerie du petit animal. Merci à toi pour toutes les fois où je t'ai fais rester tard au labo, entre autres pour les SPECT de dernières minutes.

Je souhaiterai remercier Tiffany Witkowski et Sophie Besse pour leur aide technique et leurs conseils sur de nombreuses manips. De même, je tiens à remercier Mélodie Malige pour son aide dans toutes les manips. Tu as été sur tous les fronts pendant les 9 mois de ton contrat à l'unité, tu as géré! Merci également au D^r Jacques Rouanet pour son aide précieuse concernant les injections i.v.

J'aimerai remercier le D^r Mathilde Bonnet et le D^r Jérémy Denizot de m'avoir donné l'opportunité de découvrir ce qu'était l'enseignement. Merci pour votre confiance, enseigner fut une excellente expérience.

Merci au D' Caroline Vachias et Christelle Blavignac pour leurs formations et conseils concernant la microscopie confocale et la cytométrie en flux. De plus, je remercie également le D' Pierre Pouchin pour les algorithmes de calcul en fluorescence.

J'adresse également mes remerciements au D' Patrice Flore, qui a encadré mon stage de Master 2 au laboratoire HP2 de Grenoble. Merci à toi Patrice de m'avoir montré ce qu'était la recherche de

m'avoir donné envie de poursuivre en doctorat. Grâce à toi j'ai retrouvé confiance en moi et me suis lancée dans cette grande aventure qu'a été la thèse.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'unité 1240 et en particulier mes collègues doctorants : Yvain, Ludivine, Axel, Jacques, Solène, Élodie et Élise, courage à vous pour la fin de vos thèses. Merci également aux anciens de l'unité, qui sont dorénavant partis vers de nouveaux horizons : Audrey, Jean-Jacques, Hussein et Jianrong.

Enfin, merci à mes deux supers collègues de bureau, Tiffany et Jacques, avec qui j'ai passé de très bons moments pendant ces 3 ans. Vous avez apporté de la bonne humeur au quotidien, avec des blagues parfois (souvent ?) mal placées, et vous avez su également me réconforter dans les moments de doute donc merci à vous deux.

De façon un peu moins formelle :

Françoise, je tiens à te remercier tout particulièrement. Merci d'avoir accepté de me prendre en thèse et de m'avoir laissé une chance de faire mes preuves sur un projet qui s'est avéré bien plus difficile que prévu. Tu m'as soutenue tout au long de ces 3 ans, écoutant mes idées et mes envies et tu m'as appris énormément de choses. Merci également pour ta patience et même si nous n'avons pas toujours été d'accord (je ne sais pas qui est la plus têtue des deux), tu es quelqu'un que j'apprécie et tu vas me manquer.

Audrey, je tiens à te remercier pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton soutien au cours de ces dernières années. Je retiendrai principalement trois choses : 1)-Je pars vivre en théorie car en théorie tout se passe bien ; 2)-« Don't give up ! » et 3)-Il est absolument impossible de te cacher quoique ce soit, surtout quand l'on va boire un coup au Still ou chez toi. Cependant, nos discussions scientifiques (et surtout moins scientifiques) m'ont permis d'avancer, à de nombreux niveaux, donc merci beaucoup. Merci également à Jianrong, qui a apporté un petit bout de Chine à Clermont-Ferrand, pour sa sympathie.

Tiff, merci également à toi pour ton accueil chaleureux et pour ta bonne humeur contagieuse tout du long. Je garderai toujours en mémoire le « Tu verras, ici les soirées étudiantes c'est tous les jeudi soirs, comme à Grenoble, tu ne seras pas dépaysée », phrase que tu m'as sortie à la fin de mon entretien de thèse ; j'ai su à ce moment là qu'on s'entendrait bien. Ne change rien et surtout prends bien soin du têtard!

Ludivine, merci pour ta gentillesse, ta présence et ta patience. Nous nous sommes rapprochées à un moment où les choses étaient difficiles pour moi et tu as su trouver les mots pour m'aider et me réconforter. Ta « blonde attitude » et tes nombreuses gaffes vont énormément me manquer. Fonce pour la fin de ta thèse, tu vas tout déchirer! Max, courage également pour tes deux thèses à venir. Je n'ai aucun doute sur le fait que tu réussiras haut la main si tu t'en donnes les moyens, crois en toi et en tes capacités.

Merci également à tous mes amis proches éparpillés aux quatre coins de la France : Aurel, Kiwi, Nody, Val, Fanny², Laeti, et à tous les autres un peu moins proches. Sans vous je n'aurai pas été bien loin ! Pour la plupart je vous connais (ou plutôt vous me supportez) depuis de très nombreuses années et

même si l'on ne se voit pas autant qu'on le voudrait vous êtes toujours là. Vous avez été mon carburant tout au long de ces années donc un grand merci à chacun d'entre vous.

Yvain, je t'adresse des remerciements tout particuliers. Nous avons commencé nos thèses le même jour et nous allons les terminer en même temps, à une semaine d'intervalle. Tu auras été mon pilier tout au long de ces trois ans, en étant toujours là pour moi quoiqu'il arrive. Même s'il y a eu des hauts et des bas tu m'as toujours soutenue, réconfortée et aidée, aussi bien dans la vie que dans les manips (tu es d'ailleurs fin prêt pour passer une thèse de biologie). Petit chimiste est devenu grand, je t'ai vu évoluer au cours de ces dernières années et devenir un gars super! Une belle amitié est née entre nous et est partie pour durer très longtemps. Merci à toi pour tout.

Pour terminer je souhaite remercier toutes les personnes qui ont cru en moi et m'ont toujours soutenue, et surtout un grand merci à mes parents sans qui je n'en serai pas là aujourd'hui. Emé la paciènci, si vèn à bout de tout. Marci pèr tout, vous ama.

Soutiens

Cette thèse a bénéficié d'une bourse régionale FEDER (Fonds Européen de Développement Économique et Régional) pour la période de 2015-2018 et a été effectuée en co-direction entre les laboratoires IMoST UMR 1240, INSERM, UCA (Clermont-Ferrand) et IRCM U1194, INSERM (Montpellier).

Liste des publications

Publication acceptée :

<u>Aurélie Rondon</u>*, Nancy Ty*, Jean-Baptiste. Bequignat, Mercedes Quintana, Arnaud Briat, Tiffany Witkowski, Bernadette Bouchon, Claude Boucheix, Elisabeth Miot-Noirault, Jean-Pierre Pouget, Jean-Michel Chezal, Isabelle Navarro-Teulon, Emmanuel Moreau and Françoise Degoul. *Antibody PEGylation in bioorthogonal pretargeting with transcyclooctene/tetrazine cycloaddition:* in vitro *and* in vivo *evaluation in colorectal cancer models.* **Scientific Reports, 2017**. Doi: 10.1038/s41598-017-15051-y.

Publications soumises:

<u>Aurélie Rondon</u>, Sébastien Schmitt, Arnaud Briat, Nancy Ty, Mercedes Quintana, Jean-Baptiste Bequignat, Lydia Maigne, Brian Zeglis, Rosemary Membreno, Isabelle Navarro-Teulon, Emmanuel Moreau and Françoise Degoul. *Pretargeted SPECT imaging of peritoneal carcinomatosis using bioorthogonal click chemistry: probe selection and first proof of concept.* **Submitted**, **2018**.

Jean-Baptiste Bequignat, Nancy Ty, <u>Aurélie Rondon</u>, Ludivine Taiariol, Jean-Michel Chezal, Damien Canitrot, Claude Boucheix, Mercedes Quintana, Isabelle Navarro-Teulon, Françoise Degoul and Emmanuel Moreau. *Optimized syntheses of PEGylated trans-cyclooctene derivatives for highly efficient bioorthogonal chemistry*. **Submitted, 2018**.

^{*} co-premier auteur

Liste des communications

Communications orales:

EANM (European Association of Nulear Medicine): du 13 au 17 octobre 2018, Dusseldörf (Allemagne) - Synthesis of trans-cyclooctene derivatives with restricted isomerization rate for optimal in vitro and in vivo pretargeting strategies - Jean-Baptiste Bequignat*, Aurélie Rondon*, Ariane Baufond, Mercedes Quintana, Claude Boucheix, Jean-Pierre Pouget, Elisabeth Miot-Noirault, Jean-Michel Chezal, Isabelle Navarro-Teulon, Françoise Degoul, Emmanuel Moreau et Nancy Ty.

21èmes journées de l'École Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement: 14 et 15 juin 2018, Clermont-Ferrand (France) - Radioimmunothérapie préciblée de la carcinose péritonéale par chimie bioorthogonale - Aurélie Rondon, Nancy Ty, Sébastien Schmitt, Arnaud Briat, Mercedes Quintana, Claude Boucheix, Isabelle Navarro-Teulon, Emmanuel Moreau et Françoise Degoul. Prix CLARA de la meilleure communication orale

E-MSR (European Materials Research Society): du 19 au 22 juin 2018, Strasbourg (France) - Antibody functionalization for pretargeted imaging and radiotherapy - Ludivine Taiariol*, Aurélie Rondon*, Mercedes Quintana, Sophie Besse, Isabelle Navarro-Teulon, Claude Boucheix, Carole Chaix, Elisabeth Miot-Noirault, Jean-Michel Chezal, Françoise Degoul, Emmanuel Moreau et Nancy Ty.

Journée des étudiants en thèse (JET): 22 juin 2017, Montpellier (France) — Pretargeted radioimmunotherapy (PRIT) of peritoneal carcinomatosis using bioorthogonal chemistry — <u>Aurélie Rondon</u>, Nancy Ty, Jean-Baptiste Bequignat, Mercedes Quintana, Arnaud Briat, Tiffany Witkowski, Bernadette Bouchon, Claude Boucheix, Elisabeth Miot-Noirault, Jean-Pierre Pouget, Jean-Michel Chezal, Isabelle Navarro-Teulon, Emmanuel Moreau et Françoise Degoul.

CGO (Congrès International Grand Ouest): du 21 au 24 septembre 2016, Le Bono (France) - Radioimmunotherapy of colorectal cancer: pretargeting using click chemistry - Aurélie Rondon, Jean-Baptiste Bequignat, Nancy Ty, Emmanuel Moreau, Tiffany Witkowski, Aurélie Maisonial-Besset, Claude Boucheix, Bernadette Bouchon, Elisabeth Miot-Noirault, Jean-Michel Chezal, Isabelle Navarro-Teulon et Françoise Degoul.

^{*} co-premier auteur

^{*} co-premier auteur

Communications affichées :

EANM: du 13 au 17 octobre 2018, Dusseldörf (Allemagne) - Pretargeted radioimmunotherapy of colorectal cancer through bioorthogonal chemistry - <u>Aurélie Rondon</u>, Nancy Ty, Sébastien Schmitt, Arnaud Briat, Mercedes Quintana, Claude Boucheix, Isabelle Navarro-Teulon, Emmanuel Moreau et Françoise Degoul.

EANM : du 21 au 25 octobre 2017, Vienne (Autriche) - *Pretargeted imaging of peritoneal carcinomatosis using bioorthogonal chemistry* - <u>Aurélie Rondon</u>, Nancy Ty, Jean-Baptiste Bequignat, Mercedes Quintana, Arnaud Briat, Tiffany Witkowski, Bernadette Bouchon, Claude Boucheix, Elisabeth Miot-Noirault, Jean-Pierre Pouget, Jean-Michel Chezal, Isabelle Navarro-Teulon, Emmanuel Moreau et Françoise Degoul.

RICT (Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique): du 5 au 7 juillet 2017, Toulouse (France) - Pretargeting through bioorthogonal chemistry: from the synthesis of bioorthogonal moieties to the immunofluorescent imaging of tumors — Jean-Baptiste. Bequignat, Aurélie Rondon, Mercedes Quintana, Claude Boucheix, Isabelle Navarro-Teulon, Elisabeth Miot-Noirault, Jean-Michel Chezal, Françoise Degoul, Nancy Ty et Emmanuel Moreau.

Journée des étudiants en thèse (JET): 22 juin 2017, Montpellier (France) — Pretargeted imaging of peritoneal carcinomatosis using bioorthogonal chemistry — <u>Aurélie Rondon</u>, Nancy Ty, Jean-Baptiste Bequignat, Mercedes Quintana, Arnaud Briat, Tiffany Witkowski, Bernadette Bouchon, Claude Boucheix, Elisabeth Miot-Noirault, Jean-Pierre Pouget, Jean-Michel Chezal, Isabelle Navarro-Teulon, Emmanuel Moreau et Françoise Degoul.

Vulgarisations et animations scientifiques

- 1- Organisation des 21^{èmes} Journées de l'École Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement. Les 14 et 15 juin 2018.
- 2- Concours « Ma thèse en 180 secondes » (MT180, CNRS, CPU), 2018.
- 3- Festival Pint of Science, conférence orale Radioactivité et Cancer, Clermont-Ferrand, 2018.
- **4** Journée des microscopistes Clermontois, *Imagerie en fluorescence in vitro et in vivo pour la sélection d'anticorps modifiés*, Clermont-Ferrand, **2017**.

Encadrement de stages et enseignements

Encadrement de stages :

Boutheina Mekhalif: Master 2^{ème} année, Ingénierie pour la Santé et le Médicament spécialité Chimie Médicinale et Innovation Pharmacologique, Université Grenoble Alpes. <u>Sujet</u>: Pretargeted radioimmunotherapy through bioorthogonal chemistry: from in vivo biodistributions to in vitro investigations of Ts29.2-TCO_n mAbs diffusion in a 3D-spheroid model of colorectal cancer. Durée: 6 mois, **2018**.

Anne-Sophie Galvardon: Licence 3^{ème} année Sciences Technologies, Santé parcours Pharmacologie, Université Clermont-Auvergne. <u>Sujet</u>: Optimisation d'une technique de préciblage TCO-tetrazine en fluorescence. Durée : 5 semaines, **2016**.

Enseignements:

2017-2018 : (**64 h ETD**) Biologie Cellulaire, 2^{ème} année de DUT Analyses Biologiques et Biochimiques (ABB2), IUT Génie Biologique, Clermont-Ferrand. Enseignements dirigés et travaux pratiques.

2016-2017 : (**64 h ETD**) Biologie Cellulaire, 2^{ème} année de DUT ABB2, IUT Génie Biologique, Clermont-Ferrand. Encadrement de travaux pratiques.

Résumé

La radioimmunothérapie (RIT) est une stratégie théranostique associant la spécificité de reconnaissance d'anticorps monoclonaux (AcMs) (ou de formes dérivées) vis-à-vis des antigènes tumoraux et les propriétés des radionucléides (imagerie/thérapie). L'efficacité de la RIT est cependant limitée sur les tumeurs solides à cause de la lente diffusion des AcMs et de leur longue demi-vie plasmatique. Les approches de radioimmunothérapie préciblée (PRIT), qui dissocient l'injection des AcMs de celle des radioligands constituent des alternatives pertinentes envisagées pour diminuer l'hématotoxicité et améliorer l'efficacité thérapeutique de la RIT classique. Nous avons ainsi travaillé sur une stratégie de PRIT utilisant la chimie bioorthogonale par interaction entre un trans-cyclooctène (TCO) et une tétrazine (TZ), à la fois pour l'imagerie et pour la thérapie de la carcinose péritonéale (CP) d'origine colorectale (modèle A431-CEA-Luc/ AcM 35A7). Dans un premier temps nous avons évalué à la fois in vitro et in vivo dans le modèle de CP ainsi que dans un modèle sous-cutané de cancer colorectal (modèle HT29/ AcM Ts29.2) l'effet des modifications apportées aux AcMs. Nous avons ainsi montré que les modifications d'AcMs influencent l'interaction entre les TCO et la TZ, sans pour autant altérer leur immunoréactivité. L'ajout d'espaceurs PEGylés (polyéthylène glycol) entre les AcMs et les TCO induit une diminution significative de l'interaction TCO/TZ. De plus, nous avons montré que les TCO sont sujets à l'isomérisation en cis-cyclooctènes, inactifs vis-à-vis de la TZ, et que la PEGylation aggrave ce phénomène. Ces études ont ainsi montré à la fois que les AcMs-TCO ne contenant pas d'espaceur PEGylé étaient les plus favorables pour le préciblage mais également, qu'il était primordial de contrôler le taux d'isomérisation des TCO avant greffage aux AcMs pour ne pas altérer l'interaction vis-à-vis des TZ. Dans un second temps nous avons effectué avec succès la preuve de concept de l'imagerie SPECT de la CP par préciblage entre l'AcM 35A7-TCO et la TZ-PEG₄-DOTA-¹⁷⁷Lu (i.e. TZ-1). Un ciblage spécifique des tumeurs péritonéales a ainsi été obtenu, avec un très bon contraste. L'étude de PRIT effectuée avec cette même sonde TZ-1 a cependant échoué à mettre en évidence une amélioration des médianes de survie ou un ralentissement de la croissance tumorale, nous amenant ainsi à reconsidérer la structure de la TZ-1. Trois autres TZ (i.e. TZ-2-4) ont donc été évaluées par la suite, en biodistribution, afin de déterminer la meilleure pour la PRIT de la CP. Ainsi, la TZ-3, qui comporte un espaceur PEGylé plus long que la TZ-1, s'est avérée être la plus favorable dans ce type de stratégie et sera prochainement utilisée pour une nouvelle étude de thérapie.

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis de démontrer la faisabilité du concept de préciblage par chimie bioorthogonale utilisant l'interaction TCO/TZ pour l'imagerie de tumeurs disséminées dans la cavité péritonéale. Cette stratégie reste néanmoins compliquée à mettre en place du fait de l'instabilité des TCO et des problèmes de réactivité de certaines sondes TZ et nécessite encore de nombreuses optimisations avant de pouvoir envisager une application thérapeutique.

Abstract

Radioimmunotherapy (RIT) consists to combine the specificity of monoclonal antibodies (mAbs), or mAbs derived structures, towards tumor antigens with the imaging/therapy properties of radionuclides, representing thus a theranostic strategy. RIT efficiency in solid tumors is limited due to both mAbs slow diffusion and long blood clearance. Pretargeted radioimmunotherapy (PRIT) appears as an alternative to circumvent hematotoxicity and improve therapeutic efficacy. We have thus worked on PRIT based on bioorthogonal click chemistry relying on the interaction between trans-cyclooctene (TCO) and tetrazine (TZ). Application of this strategy was made for imaging and therapy of peritoneal carcinomatosis (PC) from colorectal origin (A431-CEA-Luc model/ 35A7 mAb). We have first assessed the influence of mAbs modifications, in vitro and in vivo experiments made on both PC model and subcutaneous colorectal cancer (HT29 model/ Ts29.2 mAb). We thus demonstrated that mAbs modifications influence the interaction between TCO and TZ without decreasing their antigen binding capacities. Indeed, addition of PEGylated (polyethylene glycol) linkers between mAbs and TCO induced a significant decrease of TCO/TZ interaction. In addition, we also demonstrated that TCO moieties undergo severe isomerization to cis-cyclooctene (CCO) moieties which are unreactive towards TZ. Addition of PEG linkers also increased the isomerization rate of TCO to CCO. Our results highlighted that a non PEGylated mAb should represent the best structure for PRIT to avoid isomerization and consequently to control the ratio of CCO before mAbs coupling to maximize TCO/TZ interaction. In disseminated PC, we have made for the first time the proof of concept of SPECT imaging between 35A7-TCO and TZ-PEG₄-DOTA-¹⁷⁷Lu (i.e. TZ-1). We indeed obtained a specific signal corresponding to PC tumors with a very good contrast. However, a PRIT experiment using TZ-1 did not allow observing neither improvement of median survivals nor tumor growth slow down. Those disappointing results led to reconsider the TZ-1 structure and evaluate three new TZ (i.e. TZ-2-4). The TZ-3, bearing a longer PEG linker than TZ-1, appears as the most appropriate for PRIT studies and will soon be considered for a new therapy experiment.

In conclusion, we demonstrated the possibility to do pretargeted imaging of peritoneal disseminated tumors using bioorthogonal click chemistry with TCO/TZ interaction. Nevertheless, this strategy is quite complicated to do due to both TCO isomerization and reactivity of radiolabelled TZ probes. Further optimizations will be mandatory before therapy can be transferred to clinic.

Table des matières

| Abréviations | i |
|--|-------------|
| Figures | |
| Tableaux | vi i |
| Introduction générale | 1 |
| ŭ | |
| Partie 1 : Données bibliographiques | |
| Chapitre 1 : le cancer colorectal | |
| I. Épidémiologie | |
| II. Tumorigénèse adénome-carcinome | |
| III. Diagnostic du CCR | 7 |
| IV. Traitements du CCR | 8 |
| a. Chirurgie | 9 |
| b. Radiothérapies | 9 |
| c. Chimiothérapies | 10 |
| d. Thérapies ciblées | 11 |
| Chapitre 2 : La carcinose péritonéale | 15 |
| I. Épidémiologie et tumorigénèse | 15 |
| II. Dépistage | 16 |
| a. Imagerie et marqueurs sanguins | 16 |
| b. Évaluation de l'envahissement péritonéal <i>per</i> opératoire | 16 |
| III. Traitements de la carcinose péritonéale d'origine colorectale | 19 |
| a. Exérèse chirurgicale | 19 |
| b. Chimiothérapies | 19 |
| c. Chimio-hyperthermie intrapéritonéale (CHIP) | 20 |
| d. Thérapies expérimentales | 22 |
| e. Indicateurs de pronostics | 24 |
| Chapitre 3 : Radioimmunothérapie des cancers | 25 |
| I. Anticorps et formes dérivées | 25 |
| a. Immunoglobulines G : caractéristiques et production | 25 |

| b. Dérivés d'IgG | 27 |
|--|----|
| c. Anticorps monoclonaux conjugués | 31 |
| d. Anticorps bispécifiques | 33 |
| II. Médecine nucléaire : imagerie et thérapie | 38 |
| a. Radionucléides | 38 |
| b. Imagerie nucléaire | 41 |
| c. Radioimmunothérapie | 42 |
| III. Cibles d'intérêt pour la RIT du cancer colorectal | 44 |
| a. Tétraspanine 8 | 44 |
| b. Antigène carcino-embryonnaire | 45 |
| Chapitre 4 : La radioimmunothérapie préciblée | 47 |
| I. Système avidine-biotine | 47 |
| a. Ciblage direct | 47 |
| b. Ciblage indirect | 48 |
| II. Anticorps bispécifiques | 51 |
| III. Oligonucléotides | 55 |
| IV. De la chimie « click » à la chimie bioorthogonale | 57 |
| a. Réaction de Staudinger | 59 |
| b. CUAAC | 61 |
| c. SPAAC | 62 |
| d. IEDDA | 65 |
| i. Généralités et applications pour l'imagerie du petit animal | 65 |
| ii. Chimie bioorthogonale inversée | 68 |
| iii. Radioimmunothérapie préciblée de tumeurs sous-cutanées | 70 |
| i.v. Stabilité et réactivité des composants bioorthogonaux | 73 |
| V. Bilan, dernières avancées dans la PRIT et perspectives | 76 |
| Partie 2 : Objectifs de thèse | 80 |
| Partie 3 : Matériels et Méthodes | 82 |
| I. Lignées cellulaires et anticorps | 82 |
| II. Pharmaco-modulation des anticorps | 82 |
| a. Variation du nombre de TCO | 82 |

| b. Variation de la longueur de l'espaceur PEG83 |
|--|
| II. Sondes tétrazines84 |
| a. Tétrazines fluorescentes84 |
| b. Tétrazines radiomarquées85 |
| III. Études moléculaires par SDS-PAGE87 |
| IV. Études in vitro87 |
| a. Culture cellulaire en 3D87 |
| b. Cytométrie en flux89 |
| 1. Évaluation de la reconnaissance AcM-PEGn-TCO/Ag |
| par CMF quantitative89 |
| 2. Étude de l'interaction AcM-PEGn-TCO/TZ-5-FAM89 |
| c. Immunofluorescence89 |
| 1. Sur cellules en monocouches (2D)89 |
| 2. Sur sphéroïdes (3D)90 |
| 3. Paramètres d'acquisition en microscopie confocale92 |
| 4. Quantification des signaux membranaires fluorescents92 |
| IV. Études in vivo95 |
| a. Modèles animaux95 |
| b. Xénogreffes96 |
| c. Modèle sous-cutané HT2997 |
| 1. Évaluation de l'interaction Ts29.2-PEG _n -TCO/TZ-Cy397 |
| 2. Biodistribution de la TZ-198 |
| 3. Imageries SPECT-CT98 |
| 4. Sacrifices et prélèvements98 |
| d. modèle orthotopique A431-CEA-Luc99 |
| 1. Évaluation de l'interaction 35A7-PEG _n -TCO/TZ-Cy599 |
| 2. Biodistributions des Tz-1-499 |
| 3. Imageries SPECT-CT100 |
| 4. Sacrifices et prélèvements100 |
| 5. Détermination du score de carcinose péritonéale (PCI)101 |
| 6. Dosimétrie101 |

| 7. Radioimmunothérapie préciblée de la carcinose péritonéale102 |
|--|
| i. Répartition des groupes de thérapie102 |
| ii. Mesure de la toxicité sanguine103 |
| iii. Évaluation de la survie103 |
| e. Analyses statistiques104 |
| Partie 4 : Résultats |
| Étude des modifications d'anticorps107 |
| I. Influence <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de la PEGylation des AcMs-TCO sur deux modèles de cancer colorectaux (Publication 1)107 |
| 1. Résumé de l'article107 |
| 2. Résultats : <i>in vitro</i> 108 |
| a. Fraction immunoréactive108 |
| b. Interaction TCO/TZ108 |
| 3. Résultats : imagerie fluorescence in vivo109 |
| a. Modèle sous-cutané HT29109 |
| b. Modèle orthotopique disséminé A431-CEA-Luc109 |
| 4. Discussion110 |
| 5. Conclusion111 |
| Publication 1112 |
| II. Influence du taux d'isomérisation TCO/CCO sur l'interaction AcMs-PEG _n -TCO/TZ (Publication 2)124 |
| 1. Résumé de l'article124 |
| 2. Résultats124 |
| a. Immunofluorescence124 |
| b. Incubations et dépôts sur gel d'acrylamide125 |
| 3. Discussion125 |
| 4. Conclusion126 |
| Publication 2127 |
| III fands in vitus de la differsion des AsMa TCO demante de la 2D |
| III. Étude <i>in vitro</i> de la diffusion des AcMs-TCO _n dans un modèle 3D144 |
| 1. Introduction144 |

| 3. Discussion | 147 |
|---|------------|
| 4. Conclusion | 147 |
| Étude des sondes tétrazines | 148 |
| I. Évaluation in vivo de différentes sondes TZ dans le préciblage | de tumeurs |
| péritonéales (Publication 3) | 148 |
| 1. Résumé de l'article | 148 |
| 2. Résultats | 149 |
| a. Preuve de concept avec la TZ-1 | 149 |
| b. Biodistributions des TZ-1,3,4 | 150 |
| c. Comparaison des TZ-1-4 | 150 |
| 3. Discussion | 150 |
| 4. Conclusion | 152 |
| Publication 3 | 153 |
| Partie 5 : Discussion et perspectives | 176 |
| I. Impact des modifications des AcMs | 176 |
| II. Internalisation des AcMs et particules Alpha | 177 |
| III. Relation structure-activité des TZ | 178 |
| IV. Choix du chélatant et des radionucléides | 180 |
| V. Chirurgie guidée par l'imagerie en fluorescence | 180 |
| VI. Agents de clairance et protocoles fractionnés | 181 |
| VI. Conclusion | 181 |
| Bibliographie | 182 |
| Partie 6 : Annexes | 202 |

Liste des abréviations

% IA/g : Pourcentage d'activité par gramme de tissu

5-FU: 5-Fluorouracile

ACE/CEA: Antigène carcino-embryonnaire

AcM: Anticorps monoclonal

ADC: Antibody drug conjugate

AMM : Autorisation de mise sur le marché

Bq: Becquerel

bsAcs: Anticorps bispécifiques

CC : Score de cytoréduction

CCO: cis-cyclooctène

CCR: Cancer colorectal

CCRm: Cancer colorectal métastatique

CDR: Complementarity determining regions

CH: Chaîne constante lourde

CHIP: Chimio-hyperthermie intrapéritonéale

Ci: Curie

CL : Chaîne constante légère

CO₂: Dioxyde de carbone

COREP: Score colorectal péritonéal

CP: Carcinose péritonéale

CRS: Cytoreductive surgery

CRT: Chimioradiothérapie

Cu: Cuivre

CuAAC: Copper-free azide alkyl cycloaddition

DBCO: Dibenzylcyclooctyne

DIBAC: 5-(11,12-Didéhydrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-yl)-5-oxopentanoate de méthyle

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DOTA: Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododecane-1,4,7,10-tétraacétique (ou tétraxetan)

DTPA: Acide diethylènetriamine pentaacétique

EGFR: Epidermal growth factor receptor

Fab : Fragment antigen binding

FAP: Polypes adénomateux familiaux

Fc: Fragment constant

FcRn: Récepteur Fc néonatal

FDA: Food and Drug Administration

FRET: Förster Resonance Energy Transfert

HOMO: Highest Occupied Molecular Orbital

HSG: Histidine-succinyl-glycine

I.p : Intrapéritonéale

I.v: Intraveineuse

IEDDA: Cycloaddition de Diels-Alder à demande électronique inverse

IgG: Immunoglobuline G

IRM : Imagerie par résonnance magnétique

LNH: Lymphome non-Hodgkinien

Luc: Luciférase

LUMO: Lowest Occupied Molecular Orbital

LV: Leucovorine

MAG3: N-hydroxysuccinimide-mercaptoacetyltriglycine

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of flight

MCR: Mutation cluster region

MIRD: Medical Internal Radiation Dose

MMR: Mismatch repair

MORF: Oligomère morpholino phophorodiamidate

MSA: Mouse serum albumin

NB: Norbornène

NP: Nanoparticules

PAMAM: Poly(amidoamine)

PBS: Phosphate Buffer Saline

PCI : Index de carcinose péritonéale

PEG: Polyéthylène glycol

PERCIST: PET response criteria in solid tumors

PIPAC : Chimiothérapie Intrapéritonéale Pressurisée par Aérosols

PNA: Acide peptido-nucléique

PRIT: Radioimmunothérapie préciblée

PSDSS: Peritoneal surface disease severity score

RCC: Renal cell carcinoma

RECIST: Response evaluation criteria in solid tumors

RIT : Radioimmunothérapie

ROS: Reactive oxygen species

RTE: Radiothérapie externe

SPAAC: Strain promoted Azide Alkyl cycloaddition

SPECT-CT: Single photon Emission Computed Tomography – Computed Tomography

SPR : Surface plasmonique resonance

SVF : Sérum de veau fœtal

TA: Température ambiante

TCO : *trans*-cyclooctène

TDM: Tomodensitométrie

TEP: Tomographie par émission de positons

TNM: Tumeur-ganglion-métastase

TSPAN8: Tétraspanine 8

TZ: Tétrazine

VEGF: Vascular epidermal growth factor

VH : Chaîne variable lourde

VL : Chaîne variable légère

 α : Alpha

β: Béta

γ: Gamma

Liste des figures

| Figure 1 : Représentation schématique de l'épithélium du côlon |
|--|
| Figure 2 : Carcinogénèse du cancer colorectal de forme sporadique5 |
| Figure 3 : Carcinogénèse du cancer colorectal de forme héréditaire6 |
| Figure 4 : Néoplasme colorectal à différents stades7 |
| Figure 5 : Détermination du score de carcinose péritonéale (PCI)17 |
| Figure 6 : Principe général du fonctionnement de la chimio-hyperthermie intrapéritonéale (CHIP) en |
| circuit« fermé »21 |
| Figure 7 : Principe général du fonctionnement de la chimiothérapie intrapéritonéale pressurisée par aérosol (PIPAC)23 |
| Figure 8 : Structure d'un anticorps25 |
| Figure 9 : Évolution des structures d'anticorps monoclonaux obtenues par ingénierie génétique27 |
| Figure 10 : Représentation schématique des ionisations induites sur l'ADN par les particules α, β ⁻ et des Electrons Auger40 |
| Figure 11 : Principe général de la radioimmunothérapie des cancers dans le cas d'AcMs non-internalisants.42 |
| Figure 12 : Structure de la tétraspanine 8 (TSPAN8)45 |
| Figure 13 : Structure de l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) |
| Figure 14 : Biodistributions du radioligand biotine-PEG ₄ -lys(Cy5.5)-HYNIC- ^{99m} Tc dans un modèle de souris porteuses de tumeurs colorectales LS180 disséminées dans le péritoine |
| Figure 15: Les trois stratégies de préciblage par interaction non-covalente (strept)avidine/biotine49 |
| Figure 16 : Biodistributions des biotines-DOTA- ⁹⁰ Y (A) et DOTA- ²¹³ Bi (B) chez des souris porteuses de tumeurs HEL préciblées avec l'AcM BC8-Streptavidine50 |
| Figure 17 : Structure du ligand HSG-haptène divalent51 |
| Figure 18 : Suivi de la distribution du di-DTPA- ¹³¹ l chez des patients atteints soit (A) de cancer médullaire de la thyroïde soit (B) de carcinome pulmonaire à petites cellules par imagerie scintigraphique réalisées sur plusieurs jours |
| Figure 19 : Acquisitions TEP du préciblage TF2/IMP288- ⁶⁸ Ga chez différents patients (A, B et C) atteints de cancer médullaires de la thyroïde54 |
| Figure 20 : Structures de l'ADN, de l'ARN et des dérivés d'oligonucléotides MORF et PNA55 |
| Figure 21 : Imageries gamma du préciblage MN14/MORFc-MAG ₃₋ 99mTc sur des souris porteuses de xénogreffes sous-cutanées LS174T56 |
| Figure 22 : Les trois stratégies de préciblage utilisant des Morpholinos (MORFs) actuellement en cours de développement |

| Figure 22 - Aquisitions SDECT CT du présibles setupionel /DNA DEC - Cus Des 99mTs sur des servis porteures |
|---|
| Figure 23 : Aquisitions SPECT-CT du préciblage cetuximab/PNA-PEG ₁₀ -Cys-Dpa- ^{99m} Tc sur des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées A43157 |
| |
| Figure 24 : Stratégie générale de préciblage par chimie bioorthogonale58 |
| Figure 25 : Réaction dérivée de Staudinger59 |
| Figure 26 : Analyses d'immunofluorescence du préciblage de la Cathepsine B active dans des cellules |
| de moelle osseuse BMMØs avec l'azoture-E6460 |
| Figure 27 - Vigualization des altres metéros membranciaes de callules CUO nou interestion his cuthos ands |
| Figure 27 : Visualisation des glycoprotéines membranaires de cellules CHO par interaction bioorthogonale de Staudinger |
| |
| Figure 28 : Réaction de « Staudinger sans traces »61 |
| Figure 29 : Réaction de cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre (I)61 |
| Figure 30 : Imagerie <i>in vivo</i> de glycanes fucosylés d'embryons de Zebrafish durant l'embryogénèse <i>via</i> le |
| préciblage par réaction CuAAC-BTTES62 |
| Figure 31 : Réaction de cycloaddition azoture-alcyne non catalysée par le cuivre (SPAAC63 |
| |
| Figure 32 : Efficacité de la PRIT α-CD20-DBCO/PAMAM(D-90Y) sur des souris porteuses de xénogreffes de lymphomes non-Hodgkinien |
| iyinpiiones non-nougkinien |
| Figure 33 : Cycloaddition de Diels-Alder à demande électronique inverse entre un <i>trans-</i> cyclooctène (TCO) et une tétrazine (TZ)65 |
| Figure 34 : Preuve de concept par imagerie SPECT-CT du préciblage de tumeurs de côlon LS174T par AcM |
| CC49-PEG ₁₂ -TCO suivi 24 h après par l'injection de TZ-PEG ₁₂ -DOTA- ¹¹¹ In66 |
| Figure 35 : Imageries TEP de la TZ-PEG ₇ -NOTA- ⁶⁴ Cu sur des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées |
| SW122267 |
| Figure 36 : Imageries TEP et TEP/CT du radioligand TZ-PEG ₇ -NOTA- ⁶⁴ Cu à 20 h p.i. chez des souris porteuses |
| de tumeurs sous-cutanées Capan-2 |
| |
| Figure 37 : Images de cellules SKOV-3 ciblées avec du trastuzumab-TZ pendant 45 min puis incubées avec les sondes TCO-Fluorescéines |
| |
| Figure 38 : Préciblage PSMA-TZ/TCO-PEG ₄₋ 18F sur des souris porteuses de tumeurs LNCaP70 |
| Figure 39 : PRIT de tumeurs pancréatiques sur des souris porteuses de xénogreffes BxPC371 |
| Figure 40 : (A) Biodistributions de la TZ-PEG ₇ -DOTA- ¹⁷⁷ Lu à différents intervalles d'injection par rapport au |
| huA33-TCO. (B) Courbes de croissance tumorale et de survie Kaplan-Meier correspondantes72 |
| Figure 41 : Alpha-PRIT de tumeurs colorectales implantées en sous-cutanées chez la souris par interaction |
| CC49-TCO/TZ-DOTA- ²¹² Pb |
| Figure 42 : Isomères du cyclooctènes74 |
| Figure 43 : Isomères axiaux et équatoriaux du <i>trans</i> -cycloocténol74 |

| | Figure 44 : Structures des 4 TZ les plus décrites dans les publications portant sur la PRIT par chimie |
|---|---|
| I | bioorthogonale75 |
| | Figure 45: Activation de l'antibody-drug conjugate (ADC) via la réaction IEDDA d'élimination pyridazine |
| (| (click-to-release)79 |
| | Figure 46 : Schéma présentant les deux axes d'études de la stratégie de radioimmunothérapie préciblée utilisant la chimie bioorthogonale81 |
| I | Figure 47 : Caractérisation des sphéroïdes HT29 sur une période de 14 jours88 |
| | Figure 48 : Amélioration de la profondeur d'acquisition par microscopie confocale des sphéroïdes HT29 par |
| | clarification ClearT ² 91 |
| F | Figure49 : Détermination de l'index de carcinose péritonéale (PCI)101 |
| ١ | Figure 50 : Exemple de fiche de mesure de tumeurs péritonéales utilisée pour le calcul de dosimétrie102 |
| | Figure 51 : Évaluation de la diffusion des anticorps Ts29.2-TCO _n dans les sphéroïdes HT29 par microscopie confocale145 |
| | Figure 52 : Quantification du signal fluorescent membranaire des conjugués Ts29.2-TCOn dans les sphéroïdes |

Liste des tableaux

| Tableau 1 : Classification TNM du cancer colorectal et survie à 5 ans des patients selon le stade tumoral4 |
|--|
| Tableau 2 : Principales chimiothérapies utilisées dans le traitement du cancer colorectal13 |
| Tableau 3 : Principales immunothérapies utilisées dans le traitement du cancer colorectal14 |
| Tableau 4 : Estimation du score de Peritoneal Surface Disease Severity (PSDSS) des patients atteints de carcinose péritonéale d'origine colorectale |
| Tableau 5 : Structures et pharmacocinétiques des différentes structures d'anticorps utilisées en imagerie et/ou thérapie29-30 |
| Tableau 6 : ADC commercialisés dans le traitement des cancers32 |
| Tableau 7 : Structures et caractéristiques des principales formes d'anticorps bispécifiques développées.35-37 |
| Tableau 8 : Exemples de radionucléides utilisables pour l'imagerie scintigraphique39 |
| Tableau 9 : Principales caractéristiques des différents rayonnements émis par les radionucléides |
| Tableau 10 : Exemples de radionucléides utilisés pour la radiothérapie41 |
| Tableau 11 : Comparaison des caractéristiques et des principales limitations des différents systèmes de préciblage |
| Tableau 12 : Comparaison des caractéristiques des principales réactions de chimie bioorthogonale78 |
| Tableau 13 : conditions de culture et caractéristiques des lignées de côlon82 |
| Tableau 14 : Nombre moyen de PEG _n -TCO greffés par AcM en fonction des différents équivalents mis en réaction83 |
| Tableau 15 : Structures et caractéristiques des différentes tétrazines fluorescentes utilisées84 |
| Tableau 16 : Structures et caractéristiques des différentes tétrazines synthétisées et radiomarquées au Lutécium-17786 |
| Tableau 17 : Algorithme de quantification du signal membranaire fluorescent utilisé sur les images en confocal réalisées sur les cellules 2D92 |
| Tableau 18 : Algorithme 2D de quantification du signal membranaire fluorescent pour les sphéroïdes imagés en microscopie confocale93 |
| Tableau 19 : Algorithme 3D de quantification du signal membranaire fluorescent pour les sphéroïdes imagés en microscopie confocale94 |
| Tableau 20 : Les différents groupes de test pour les études d'interaction Ts29.2-PEG _n -TCO / TZ-Cy5 sur le modèle HT29 selon la condition évaluée97 |
| Tableau 21 : Les différents groupes de test pour l'étude de biodistribution de la TZ-1 dans le modèle |
| Tableau 22 : Les différents groupes de test pour les études d'interaction 35A7-PEG _n -TCO / TZ-Cy5 enpréciblage sur le modèle A431-CEA-Luc99 |

| Tableau 23 : Répartition des groupes pour l'étude de biodistribution n°1 portant sur la TZ-1 de carcinose péritonéale d'origine colorectale | |
|---|---|
| Tableau 24 : Répartition des groupes pour l'étude n°2 comparant les biodistributions des TZ-modèle de carcinose péritonéale d'origine colorectale | |
| Tableau 25 : Répartition des groupes pour l'étude de thérapie préciblée de la carcinose périte colorectale par chimie bioorthogonale | • |

Introduction générale

L'usage de thérapies ciblées, notamment à base d'anticorps monoclonaux (AcMs) constitue un complément ou une alternative aux traitements anticancéreux dits conventionnels. Parmi les thérapies ciblées existantes, se trouve la radioimmunothérapie (RIT), une approche qui consiste à cibler des antigènes (Ag) tumoraux spécifiques grâce à des AcMs couplés à des radionucléides. Les rayonnements émis par le radionucléide entraînent ainsi une irradiation des cellules tumorales, ce qui va induire in fine la mort cellulaire. En clinique, la RIT a d'ores et déjà démontré son efficacité dans le traitement du lymphome non-Hodgkinien, par un ciblage du CD20 à l'aide d'un AcM radiomarqué à l'Yttrium-90 (ibritumomab tiuxetan, Zevalin®, Bayer) mais se révèle cependant inefficace dans le traitement des tumeurs solides. En effet, la lente circulation des AcMs dans le système sanguin, combinée à leur faible pénétration tumorale induit des risques à la fois de radiorésistance et d'hématotoxicité, deux paramètres qui limitent fortement son efficacité.

Afin de pallier les inconvénients de la RIT, différentes stratégies de préciblage ont été développées, il s'agit alors de radioimmunothérapie préciblée (PRIT). La notion de préciblage implique une stratégie qui s'effectue en deux temps en dissociant l'injection des AcMs de celle des sondes radiomarquées. Les deux entités, préalablement modifiées de façon à pouvoir se reconnaître spécifiquement dans l'organisme, vont ainsi se lier l'une à l'autre directement *in vivo*. Un délai de 24 à 72 h entre l'injection des deux composés favorise ainsi l'élimination des AcMs non fixés à la tumeur, qui peut être augmentée par l'utilisation d'agents de clairance. De plus, l'élimination généralement rapide des sondes radiomarquées permet de réduire les risques d'hématotoxicité assurant de fait l'innocuité de ce système.

La technique de PRIT la plus ancienne repose sur l'interaction de l'avidine —ou de son analogue de synthèse la streptavidine—avec la biotine. Malgré une réaction rapide à très haute affinité l'immunogénicité de l'avidine demeure un frein majeur pour étendre ce système à la clinique. Puis, les anticorps bispécifiques (bsAcs), ont été construits avec une partie dirigée contre les Ag tumoraux et une partie spécifique reconnue par un haptène radiomarqué. Ce système, le plus avancé en termes d'études cliniques demeure tout de même long et coûteux à mettre en place du fait de la lourde ingénierie des AcMs. Des essais ont par la suite été menés avec des Morpholinos, des AcMs couplés à des fragments d'ADN ciblés avec des fragments ADNc radiomarqués. Ce système, soumis aux risques de dégradations par les endonucléases nécessite encore de nombreuses optimisations. Enfin, le système le plus récent, la chimie bioorthogonale repose sur l'interaction spécifique entre deux molécules chimiques pour former une liaison covalente. Les deux entités chimiques utilisées

sont inertes envers les macromolécules biologiques assurant ainsi l'innocuité de cette stratégie in vivo.

Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus répandu dans le monde et les chances de survie à 5 ans dans le cas de tumeurs locorégionales avoisinent les 90 %. Cependant, à un stade avancé de la maladie les cellules cancéreuses colorectales métastasent au niveau du foie, des poumons ou bien encore de la cavité péritonéale, et on parle alors de carcinose péritonéale (CP) d'origine colorectale pour laquelle les chances de survie à 5 ans ne dépassent pas 10 %. Bien que la chirurgie, associée ou non à la chimiothérapie, soit actuellement le traitement de référence de la CP, d'importants facteurs de morbidité associés à une forte mortalité postopératoire impliquent de devoir développer de nouvelles thérapies, plus efficaces et moins toxiques pour les patients.

Ainsi, au cours de cette thèse nous nous sommes focalisés sur l'étude de la PRIT par chimie bioorthogonale appliquée au traitement de la CP d'origine colorectale. Au cours des dix dernières années, de nombreuses réactions de chimie bioorthogonale ont été décrites, variant principalement en termes de stabilité et de vitesse d'interaction. Ainsi, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse (IEDDA) qui met en jeu un AcM couplé à un *trans*-cyclooctene (TCO) d'un côté et une sonde tétrazine (TZ) radiomarquée de l'autre. La faisabilité préclinique de l'interaction AcM-TCO/TZ a été démontrée ces dernières années, aussi bien en imagerie qu'en thérapie dans des modèles de xénogreffes sous-cutanées de cancer du côlon. La preuve de concept de cette approche sur des tumeurs disséminées n'a en revanche pas encore été décrite à ce jour.

La première partie de ce manuscrit sera consacrée à une étude bibliographique avec une partie clinique portant sur le cancer colorectal et la carcinose péritonéale d'origine colorectale, puis en l'exposé des travaux relatifs à la radioimmunothérapie et aux différentes approches de radioimmunothérapie préciblée et notamment la chimie bioorthogonale. Dans un second temps seront exposés les objectifs de thèses ainsi que les méthodes mise en place dans les expériences pour y répondre. Les résultats seront par la suite présentés sous forme d'articles publiés ou soumis avec une introduction spécifique à chacun. Enfin, la discussion des résultats obtenus ainsi que les perspectives du projet viendront clôturer cette thèse.

Partie 1 : Données bibliographiques

Chapitre 1: Le cancer colorectal (CCR)

I. Épidémiologie

Le cancer est un problème de santé publique majeur et représente la deuxième cause de mortalité au sein des pays industrialisés. Dans le monde, le cancer colorectal (CCR) est l'un des cancers les plus répandus avec une incidence d'1,4 millions de nouveaux cas par an et un nombre de décès annuel de 694 000 personnes[1]. En France, le CCR occupe la seconde place chez la femme, après le cancer du sein (1^{er}) et devant celui du poumon (3ème). Chez l'homme il se tient à la troisième place, derrière ceux de la prostate (1^{er}) et du poumon (2ème). L'incidence du CCR en France est de 40 000 nouveaux cas par an (53 % chez les hommes et 47 % chez les femmes). En termes de mortalité, il s'agit du cancer le plus meurtrier après celui des poumons avec 40 à 50 % de décès dus à la maladie ou aux complications post-traitements[2].

Environ 40 % des tumeurs colorectales sont localisées au niveau du rectum et 60 % dans le côlon, préférentiellement dans la partie sigmoïdale (**Figure 1**).

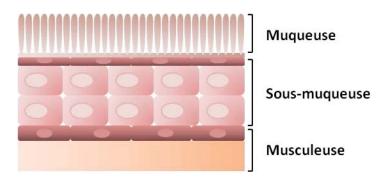


Figure 1 : Représentation schématique de l'épithélium du côlon.

Le CCR se déclare généralement après 50 ans et un diagnostic précoce permet d'augmenter très nettement les chances de survie des patients. Les progrès en termes de diagnostic *in vitro* et par imagerie permettent de fait, la détection de plus en plus précoce des CCR. Ainsi, dans le cas de tumeurs localisées dans le côlon ou le rectum le taux de survie à 10 ans avoisine les 90 % après résection. Dans le cas de tumeurs distantes, la survie à 5 ans passe en dessous des 50 % et pour des tumeurs métastasées de grade IV les chances de survie à 5 ans chutent sous la barre des 10 % **(Tableau 1)**[3], ce qui est le cas dans 25 % des patients diagnostiqués. Tous stades confondus, le taux

de survie à 5 ans du CCR se situe aux alentours des 60 %. De plus, environ 50 % des patients atteints d'un CCR développeront des métastases au cours de l'évolution de leur maladie d'où le fort taux de mortalité observé pour ce type de cancer.

| Tumeur Primitive (T) | | |
|----------------------------------|---|--|
| Тх | Tumeur primaire non-évaluée | |
| TO | Aucune preuve de tumeur primaire | |
| Tis | Carcinome <i>in situ</i> : invasion intra-muqueuse | |
| T1 | Tumeur envahissant la sous-muqueuse | |
| T2 | Tumeur envahissant la musculeuse | |
| Т3 | Tumeur envahissant la séreuse ou située dans l'espace péri-colique ou péri-rectal non-péritonéal | |
| T4 | Envahissement des organes de voisinage ou perforation du péritoine | |
| T4a | Tumeur perforant le péritoine | |
| T4b | Tumeur envahissant directement d'autres organes | |
| Ganglions lymphatiques régionaux | x (N) | |
| Nx | Ganglion lymphatique non-évalué | |
| NO | Absence d'atteinte ganglionnaire | |
| N1 | Métastases dans 1 à 3 ganglions | |
| N1a | Métastases dans 1 ganglion | |
| N1b | Métastases dans 2-3 ganglions | |
| N1c | Dépôts tumoraux (satellites) dans la sous-séreuse ou dans l'espace péri-colique ou péri-rectal non-péritonéal sans atteinte ganglionnaire | |
| N2 | Métastases dans 4 ganglions ou + | |
| N2a | Métastases dans 4-6 ganglions | |
| N2b | Métastases dans 7 ganglions ou + | |
| Métastases distantes (M) | | |
| M0 | Pas de métastase distante | |
| M1 | Métastase distante | |
| M1a | Métastases confinées à un seul organe (foie, poumons, ovaire, | |
| | ganglion lymphatique non-régional) sans atteinte péritonéale | |
| M1b | Métastases dans plusieurs organes | |
| M1c | Métastases dans la cavité péritonéale avec ou sans atteinte d'autres | |
| | organes | |

| Stade tumoral | Score TNM | Survie à 5 ans (%) |
|---------------|------------------------|--------------------|
| 1 | T1-2, N0, M0 | > 90 |
| IIA | T3, N0, M0 | 80-85 |
| IIB | T4a, N0, M0 | 70-80 |
| IIC | T4b, N0, M0 | 70-80 |
| IIIA | T1-2, N1, N2a, M0 | 65-80 |
| IIIB | T3-4a, N1, N2a-b, M0 | 50-65 |
| IIIC | T3-4a-b, N1, N2a-b, M0 | < 50 |
| IVA | T1-4b, N0-2b, M1a | 5-8 |
| IVB | T1-4b, N0-2b, M1b | 5 |
| IVC | T1-4b, N0-2b, M1c | < 5 |

Tableau 1: Classification TNM du cancer colorectal et survie à 5 ans des patients selon le stade tumoral. Selon l'Union internationale contre le cancer (UICC), 8^{ème} édition[4].

De nombreux facteurs de risques sont associés à l'apparition d'un CCR[2]. Ainsi, l'âge est un facteur de risque important. De plus, les hommes sont plus touchés que les femmes. Les maladies inflammatoires intestinales, la prédisposition génétique, l'obésité, une exposition prolongée à des contaminants chimiques (tabac, polluants) ou bien encore une consommation excessive d'alcool augmentent de 20 à 50 % le risque de carcinome colorectal[5]. A l'inverse, une alimentation riche en calcium (*i.e.* 300 mg par jour) ou en fibres (*i.e.* 10 g par jour)[6] ainsi que 30 minutes d'activité physique par jour[7] permettent de diminuer d'environ 10 % les risques de développer un CCR.

II. Tumorigénèse adénome-carcinome

L'adéno-carcinogénèse colorectale se développe de façon hétérogène selon des mécanismes qui peuvent être retrouvés à la fois dans des formes familiales et sporadiques (**Figure 2**)[8]. Les altérations génétiques et épigénétiques des formes familiales sont également retrouvées dans 80 % des formes sporadiques. Les premiers évènements moléculaires participant à la cancérogénèse colique ont été décrits en 1989 par Fearon et Vogelstein[9]. De nombreuses altérations génétiques impliquées dans la formation du CCR ont depuis été largement décrites[10].

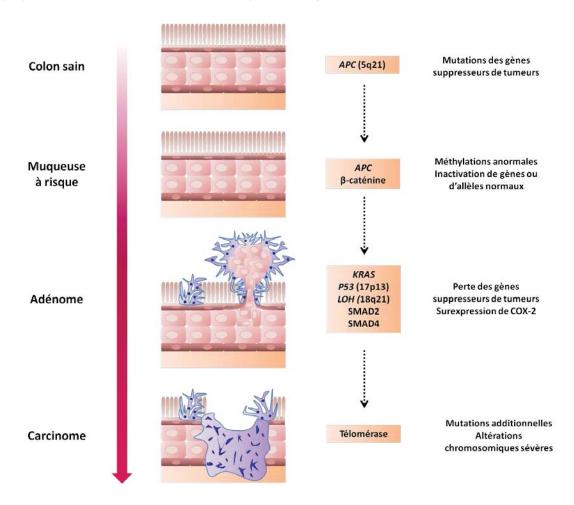


Figure 2 : Carcinogénèse du cancer colorectal de forme sporadique. Modifié d'après Bhalla et al.[10]

Parmi les formes familiales, le cancer du côlon héréditaire sans polypes, appelé également syndrome de Lynch, est transmis selon le mode autosomal dominant avec une forte pénétrance. Le syndrome de Lynch représente 80 à 90 % des cas de CCR héréditaires et 2 à 3 % de l'ensemble des CCR. Il se produit suite à des mutations des gènes codant pour les protéines de réparation des mésappariements de l'ADN (système *mismatch repair*, MMR) (**Figure 3**)[11]. Ces mutations dans les gènes tels que *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* et *MLH1* pourraient rendre compte des instabilités observées dans les régions de séquences répétées que sont les microsatellites instables (MSI)[12].

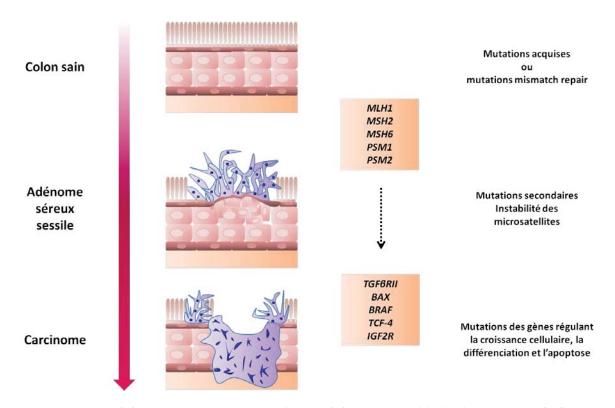


Figure 3 : Carcinogénèse du cancer colorectal de forme héréditaire. Modifié d'après Bhalla et al. [10]

Le gène APC (Adenomatous Polyposis Coli) est lui aussi fortement impliqué dans les processus néoplasiques avec plus de 700 mutations identifiées jouant un rôle dans la formation de polypes adénomateux familiaux (FAP) de CCR. APC est un gène suppresseur de tumeurs localisé sur le bras long (q) du chromosome 5, entre les positions 21 et 22. La protéine APC régule la division cellulaire et intervient dans la voie de signalisation des β -caténines. Si la protéine APC est tronquée, le complexe dans lequel elle intervient (Axine-APC-GSK3) n'est plus fonctionnel et la β -caténine qui ne peut plus interagir avec le complexe va alors être transloquée au niveau du noyau et activer la transcription des gènes cycline D1 et MYC induisant in fine une augmentation de la prolifération cellulaire[9]·[13].

Le gène APC est également impliqué dans 80 % des CCR de forme sporadique par la présence de mutations regroupées dans des régions précises (*i.e. Mutation Cluster Region*, MCR) et éventuellement des délétions hors MCR. D'autres gènes peuvent intervenir dans la formation sporadique d'adénocarcinomes colorectaux avec des mutations dans les oncogènes (*KRAS*, *Pl3K* et *BRAF*) ou d'autres gènes suppresseurs de tumeurs tels que p53, muté dans 70 à 80 % des CCR[8]. Les mutations de type *BRAF* associées à des microsatellites stables (MSS) sont un facteur de mauvais pronostic pour le patient[10]. Des mutations dans le facteur de transcription SMAD4, impliqué dans la voie du TGF-β, sont également associées à de mauvais pronostics. Des pertes partielles de chromosomes (5p, 17p, 18q, ...) participent à l'absence partielle des gènes *APC* et *Smad4*. Par ailleurs, des études montrent que le pattern de méthylation (*i.e. CpG island methylator phenotype*, CIMP) des MSI dans le CCR est associé au mauvais pronostic des patients, les patients avec des mutations de type *MSI+/CIMP+* ayant des médianes de survie plus faibles que ceux ayant des mutations *MSI+/CIMP-*[14].

III. Diagnostic du CCR

En cas d'apparition de signes cliniques (constipation, distension abdominale, perte de poids, malaises, fièvre, anémie, ...) le patient est soumis soit à un toucher rectal soit à une exploration par imagerie des parois du côlon et du rectum afin de vérifier la présence de tumeurs sur la muqueuse. Le « gold standard » du diagnostic du CCR par imagerie est la colonoscopie, une endoscopie digestive basse, qui permet l'exploration des parois du rectum à l'aide d'une caméra possédant une sensibilité de 90 % et une spécificité de 26 %[15]. Cette technique est associée à des biopsies en cas de détection de masses néoplasiques et permet ainsi de dresser une confirmation histologique fiable du stade tumoral. Les tumeurs qui sont localisées dans les 15 cm de la marge anale sont considérées comme rectales et les masses proximales sont attribuées au côlon. Le diagnostic du CCR prend également en compte la taille et l'histopathologie des tumeurs (Figure 4).



Figure 4 : Néoplasme colorectal à différents stades. (a) Adénome sessile de petite taille. (b) Adénome sessile de stade avancé. (c) Large carcinome sigmoïde ulcéreux. Reproduit d'après Kuipers *et al.*[2]

La colonoscopie (ou coloscopie) est à ce jour la seule technique de diagnostic du CCR qui soit également un outil de thérapie en permettant le retrait des lésions cancéreuses. Une imagerie scanner peut également être couplée à la coloscopie optique standard mais ne permet pas de pouvoir effectuer de faire de biopsie[16]. L'imagerie nucléaire peut également être préconisée en cas de dissémination tumorale, pour la détection de métastases[10]. Le ¹⁸F-FDG, qui est classiquement utilisé en imagerie TEP peut ainsi être combiné avec un CT ou IRM afin d'améliorer la détection mais la sensibilité de ces méthodes demeure néanmoins faible dans le cas de CCR métastatique[17].

Une autre méthode de diagnostic, concerne la détection non-invasive de biomarqueurs moléculaires. En effet, la présence de tumeurs primitives peut être suggérée grâce aux tests de recherche de sang occulte dans les selles (iFOBT et FIT)[18]. La présence de sang dans les selles est ainsi un indicateur de la présence de polypes ou de lésions (pré)cancéreuses. Le test Cologuard (Exact Science Corporation, Madison, USA)[19], commercialisé depuis 2015 permet de détecter des polypes ou des tumeurs par recherche d'anomalies de l'ADN dans les selles et aussi de mettre en évidence et quantifier les mutations *KRAS* ou *APC* ainsi que la présence de biomarqueurs de méthylation de l'ADN (NDRG4 et BMP3).

Malgré les importants progrès obtenus ces dernières années dans la détection précoce des CCR, la meilleure option demeure néanmoins la coloscopie préventive des lésions précancéreuses[15].

IV. Traitements du CCR

Le traitement du CCR repose sur une approche multimodale qui prend en compte plusieurs critères tels que les caractéristiques intrinsèques de la tumeur, sa localisation (tumeur locorégionale, métastases), la présence ou l'absence de biomarqueurs spécifiques ou bien encore le pronostic des patients (morbidité, risques de mortalité). De plus, le cancer du côlon et celui du rectum étant deux cancers distincts, le traitement appliqué peut être différent, et adapté selon leur évolution[2].

Après diagnostic, les patients sont classés en quatre groupes de risques allant de 0 à 3[20]. Le groupe 0 correspond à des patients présentant soit une tumeur locorégionale soit des métastases opérables, notamment au niveau du foie, et qui montrent une forte probabilité de rémission. Le groupe 1 contient les patients avec des métastases hépatiques ou pulmonaires potentiellement curables. Les groupes 2 et 3 correspondent tout deux aux patients atteints de tumeurs disséminées dans la cavité péritonéale, les patients considérés comme incurables étant placés dans le groupe3.

Les patients présentant un CCR peuvent être traités par chirurgie et/ou par chimiothérapie ou bien encore par l'utilisation de thérapies ciblées (anticorps et protéines recombinantes).

a. Chirurgie

Jusqu'à la fin des années 1980 le traitement de référence du CCR consistait principalement en une colectomie, c'est-à-dire en l'ablation chirurgicale par voie ouverte du segment de côlon envahi par les tumeurs. Le pronostic des patients était fortement corrélé à la qualité de la chirurgie, elle-même source d'un fort risque de résurgences locales ou distantes[21]. De nos jours, la chirurgie par voie laparoscopique est privilégiée avec une contre-indication pour les patients obèses, ayant déjà subi des chirurgies abdominales ou bien ceux ayant une pathologie avancée[22].

b. Radiothérapies

Aucune thérapie néo-adjuvante n'est utilisée dans le traitement du cancer colique. En revanche, pour le traitement du cancer du rectum, la radiothérapie externe (RTE), la chimiothérapie ou encore la chimioradiothérapie (CRT) peuvent être recommandées dans les stades intermédiaires à avancés[2].

En 2011, les résultats d'une étude clinique multicentrique randomisée, menée sur une période de 12 ans, comparant l'efficacité de la RTE préopératoire à celle de la chirurgie seule ont été publiés[23]. Ainsi, cette étude a démontré que la RTE appliquée en préopératoire diminue significativement le taux de rechutes locales de plus de 50 % comparé à la chirurgie seule chez les patients présentant des tumeurs locorégionales. En revanche, dans le cas de tumeurs distantes, l'effet de la radiothérapie n'est pas significatif. Suivant la même tendance, la médiane de survie est augmentée de façon significative avec la RTE préopératoire dans le cas de tumeurs locorégionales mais reste sans bénéfice dans le cas de tumeurs plus distantes. Enfin, la CRT a été considérée comme traitement standard puis utilisée en néo-adjuvant pour le traitement du cancer du rectum[24]. Par la suite, l'utilisation de la CRT néo-adjuvante a permis d'augmenter l'effet de la chirurgie en termes de survie à 5-ans et de survie globale dans le cas de tumeurs locorégionales[25]. Si la CRT et la RTE sont à l'origine d'un taux plus faible de rechutes locales[23], seulement 10 à 20 % des patients montrent une réponse complète à la CRT du fait de phénomènes de radiorésistances aux irradiations[26]. Des stratégies de radio-sensibilisation sont de fait progressivement développées afin d'augmenter l'efficacité de la RTE et de la CRT. La preuve de concept de l'efficacité de la radio-sensibilisation a récemment été démontrée en préclinique dans un modèle murin de tumeurs colorectales (cellules CT-26)[27]. Le ginsenoside Rg3 a ainsi été utilisé pour potentialiser les effets de la RTE et a démontré une diminution de la croissance tumorale associée à une augmentation de la survie des animaux grâce à l'inhibition du facteur de transcription NF-κΒ.

Récemment, une nouvelle approche de radiothérapie a été approuvée par la *Food and Drug Administration* (FDA), la radiothérapie endorectale appelée également brachythérapie par rayons X ou radiothérapie papillon[28][29]. Cette radiothérapie de contact consiste à envoyer des rayons X de faible énergie (50 keV) à haut débit (15 Gy/min) au niveau du rectum (profondeur maximale de 15 cm). Ce traitement est appliqué en ambulatoire, en 3 ou 4 séances de 10-15 jours d'intervalle, et permet d'améliorer de façon significative le taux de réponse clinique tout en permettant de préserver l'intégrité de la fonction et des organes touchés[30][31]. Son indication est privilégiée dans le cas de tumeurs T1N0 mais elle peut également être appliquée sur des tumeurs rectales T2-T3 en association avec la CRT préopératoire[32][33].

Les patients présentant des métastases colorectales au niveau hépatique qui sont réfractaires aux thérapies conventionnelles peuvent être traités par radioembolisation, ce qui permet de ralentir la progression tumorale[34]. La radioembolisation est une technique de radiothérapie interne sélective qui permet de cibler les métastases hépatiques par ciblage direct via des microsphères de résine radiomarquées avec de l'Yttrium-90. Cette approche permet de délivrer une forte dose de radiations béta au niveau de la tumeur pendant environ 14 jours tout en évitant d'exposer le foie à des niveaux de toxicité trop élevés[35].

c. Chimiothérapies

Pour les CCR de stade I/II, seulement 5 % des patients reçoivent une chimiothérapie adjuvante mais cela fait en revanche partie du protocole de traitement standard pour les CCR avancés (stade III/IV)[2]. Les protocoles de chimiothérapies reposent sur l'action d'agents cytotoxiques tels que les fluoropyrimidines (capecitabine, 5-fluorouracil (5-FU), raltitrexed) qui permettent d'inhiber la synthèse d'ADN par blocage de l'enzyme thymidylate synthase et qui s'incorporent dans l'ARN (Tableau 2)[36]. Les fluoropyrimidines peuvent être administrées par voie systémique (5-FU) [37][38] ou orale sous forme d'un pro-médicament (Capecitabine, Xéloda®; Roche)[39][40]. Elles peuvent être utilisées seules ou en association à d'autres monothérapies telles que l'oxaliplatine (Eloxatin®, Sanofi-Aventis) ou bien encore l'irinotécan (Camptosar®, Pfizer) (Tableau 2). L'oxaliplatine, un organoplatine proche du cisplatine, permet d'altérer à la fois la réplication et la transcription de l'ADN en formant des mésappariements des bases complémentaires, entraînant de fait la mort cellulaire[41][42]. L'irinotécan est un inhibiteur de la topoisomérase I, une enzyme qui intervient au cours de la réplication de l'ADN. Il intervient soit en

première ligne soit seconde ligne de thérapie et est activé en métabolite SN38 par des carboxylases, pour induire de la cytotoxicité[43][44]. L'acide folinique, ou leucovorine (LV, Elvorine®, Pfizer) est utilisé comme antidote du métothrexate et des fluoropyrimidines. Il est administré sous forme de folinate de calcium en tant qu'adjuvant des chimiothérapies au sein des différents protocoles et permet de réduire les effets toxiques des fluoropyrimidines.

Les patients résistants aux monothérapies recoivent des polythérapies combinant l'action de plusieurs chimio-médicaments. Il s'agit des protocoles FOLFOX (5-FU/ LV/ oxaliplatine), CAPOX (capecitabine/ LV/ oxaliplatine, appelé également XELOX) et FOLFIRI (5-FU/ LV/ irinotecan) (**Tableau 2**). Les protocoles FOLFIRI et FOLFOX induisent un taux de réponse globale significativement plus important que les chimio-monothérapies (respectivement de 30 à 60 %) et permettent également d'augmenter la médiane de survie des patients traités[45]. Une étude de phase III a été réalisée sur des patients présentant des métastases pulmonaires ou hépatiques inopérables en première ligne. Ces patients ont ainsi reçu un triple protocole de chimiothérapie associant 5-FU, oxaliplatine, irinotécan et leucovorine (FOLFOXIRI) qui a obtenu un taux de réponse d'environ 60 % et un taux de survie globale de 22,6 mois vs 16,7 mois pour FOLFIRI seul[46].

d. Thérapies ciblées

Dans le cas du cancer colorectal métastatique (CCRm), la prise en charge thérapeutique repose sur l'action combinée de chimiothérapies et d'agents biologiques qui vont permettre de cibler spécifiquement des mécanismes moléculaires tels que l'angiogénèse ou la prolifération cellulaire. L'immunothérapie, toujours associée aux protocoles de poly-chimiothérapies FOLFOX, FOLFIRI ou CAPOX est utilisée chez les patients résistants aux chimiothérapies appliquées en 1ère ligne. Ces associations thérapeutiques augmentent ainsi la médiane de survie des patients, qui devient supérieure à 20 mois[47]. Les immunothérapies utilisées pour le traitement du CCR ciblent les récepteurs à l'EGF (EGFR) ou le vascular epidermal growth factor (VEGF). VEGF est exprimé dans de nombreuses tumeurs et est impliqué dans la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Ce dernier est bloqué par un anticorps, le Bevacizumab (Avastin®, Genentech)[48][49][50] ou piégé par la protéine recombinante Aflibercept (Zaltrap®, Sanofi-Aventis)[51] correspondant au récepteur VEGFR couplé à une séquence Fc de type lgG1 permettant de bloquer respectivement soit VEGF-A soit VEGF-A et VEGF-B (Tableau 3).

A l'instar des anti-VEGF, les anti-EGFR (Cetuximab, Erbitux®, Imclone Systems; Panitumumab, Vectibix®, Amgen) (**Tableau 3**) ne peuvent être utilisés qu'en l'absence de mutations *KRAS* et *NRAS* car ces mutations activent la GTPase de façon constitutive et donc les voies des

MAPKinases ainsi que de la Pi3K[52][53]. L'expression (ou surexpression) d'EGFR est retrouvée dans environ 80 % des CCR. Elle est associée à un fort risque de développer des métastases entrainant de fait une diminution de la survie des patients[2].

Une étude clinique de phase II a par ailleurs été menée sur l'association néo-adjuvante de bevacizumab, capecitabine et radiothérapie chez des patients atteints d'un cancer rectal locorégional avancé (II-III)[26]. Les résultats ont ainsi montré qu'il était possible de combiner les effets de l'immunothérapie à ceux de la chimioradiothérapie afin d'obtenir une meilleure efficacité thérapeutique, avec des niveaux de toxicité comparables à ceux précédemment décris.

Enfin, dans le cas de foyers multi-métastatiques inopérables, les patients présentant des symptômes sévères et un pronostic très sombre (i.e. patients classés en groupe 3), la prise en charge consiste à administrer des traitements palliatifs ayant pour but de réduire l'avancée du CCRm mais surtout de diminuer les symptômes associés.

| Nom du composé | Structure du composé | Mode d'action | Taux de réponse | Médiane de survie | Effets secondaires principaux | Références |
|---|---|--|---------------------|------------------------|---|------------------|
| Irinotécan (Camptosar®, Pfizer) | L C C C C C C C C C C C C C C C C C C C | Inhibition de l'enzyme topoisomérase l Activation SN38 | 35 % (FOLFIRI) | 17,4 mois (FOLFIRI) | Fatigue, nausées Diarrhées Alopécie Myelosuppression | [43, 50, 51] |
| Oxaliplatine (Eloxatin®, Sanofi-Aventis) | £ × × × × × × | Inhibition de la réplication et de la transcription de l'ADN | 29-60 % (FOLFOX) | 12-17 mois (FOLFOX) | Fatigue, nausées Diarrhées Hypersensibilité Myelosuppression Neuropathie périphérique | [41, 42, 46] |
| 5-Fluoro Uracile (Fluoro-uracile IBN®, Teva) | | Inhibition de l'enzyme thymidylate synthétase Incorporation dans l'ARN | 20-30 % | 11,7 mois | Fatigue, nausées Diarrhées Myelosuppression | [35, 39, 44, 50] |
| Capecitabine (Xeloda®, Roche) | CH ₃ O CH ₃ | Inhibition de l'enzyme thymidylate synthétase | 37 % (CAPOX) | 7,3 mois (CAPOX) | Fatigue, nausées Diarrhées Myelosuppression Syndrome main-pied | [54] |
| Raltitrexed (Tomudex [®] , AstraZeneca) | HA CH S | Inhibition de l'enzyme thymidylate synthase | 45-60 % | 14 mois | Diarrhées aigues Neutropénies | [55, 56] |

Tableau 2 : Principales chimiothérapies utilisées dans le traitement du cancer colorectal.

| Nom du composé | Nature | Cible | Mode d'action et spécificité | Combinaison thérapeutique | Références |
|---|--|--------------------------|--|------------------------------|--------------|
| Bevacizumab (Avastin®, Roche) | lgG1 monoclonal humanisé | VEGF-A | Inhibition de l'angiogénèse | FOLFOX CAPOX | [48][50][49] |
| Aflibercept (Zaltrap [®] , Sanofi-Aventis) | Protéine recombinante fusionnée à un IgG1 | VEGF A VEGF-B PIGF | Inhibition de l'angiogénèse et du facteur de croissance placentaire | FOLFIRI | [51] |
| Cetuximab (Erbitux®, Merck) | lgG1 monoclonal chimérique | EGFR | Ralentissement de la prolifération cellulaire KRAS ^{wt} et <i>NRAS</i> ^{wt} requis | FOLFOX | [57] |
| Panitumumab (Vectibix®, Amgen) | lgG1 monoclonal humain | EGFR | Ralentissement de la prolifération cellulaire KRAS ^{wt} et NRAS ^{wt} requis | FOLFOX | [53] |

Tableau 3 : Principales immunothérapies utilisées dans le traitement du cancer colorectal.

Chapitre 2 : La carcinose péritonéale

I. Épidémiologie et tumorogénèse

Le stade correspondant à la dissémination tumorale à la surface du péritoine et des organes abdominaux est appelé carcinose péritonéale (CP) et ses origines sont multiples. En effet, si les tumeurs primitives du péritoine sont rares (moins de 5 % des cas annuels)[58] les cancers gastriques, intestinaux, de l'appendice, des ovaires ou encore du côlon-rectum peuvent évoluer en CP secondaire par extension locorégionale ou métastatique dans leur stade avancé[59].

A un stade avancé le CCR forme des métastases, soit par dissémination hématogène, soit *via* le système lymphatique ou bien encore par colonisation directe des organes adjacents. De nombreux mécanismes tels que la prolifération cellulaire, l'invasion ou la transition épithélio-mésenchymateuse sont impliqués[60]. Parmi les différents sites de colonisation des métastases colorectales le foie est le plus touché (*i.e.* environ 40 % des cas) mais l'on peut également observer un envahissement au niveau des poumons (*i.e.* environ 25 à 35 % des cas) ainsi que dans la cavité péritonéale chez 15 à 25 % des patients atteints d'un CRC de grade IV[59].

La CP d'origine colorectale se produit soit directement par invasion des parois adjacentes de l'intestin, soit en cas de rupture séreuse ou de perforation de la tumeur primitive (T4 sur l'échelle TNM)[61]. Ce dernier phénomène, qui intervient principalement de façon iatrogène, au moment de la résection chirurgicale, entraîne une migration des cellules dans le système lymphatique, dans le sang ou bien encore *via* les parois du lumen jusqu'à la cavité péritonéale.

L'âge des patients (> 59 ans), la présence de tumeurs T4 -signifiant un envahissement des organes avoisinants ou une perforation de la tumeur- ou bien encore une augmentation du taux de CA 19-9 sont décrits comme facteurs de risques dans le développement de la CP d'origine colorectale.

La prévalence de nouveaux cas par an reste stable, avec 120 864 cas diagnostiqués ces 5 dernières années[62], et les progrès médicaux ainsi que des campagnes de dépistages plus précoces ont permis de diminuer significativement le taux de mortalité du CCR. Cependant, le diagnostic d'une CP d'origine colorectale demeure un facteur de faible pronostic avec une médiane de survie des patients non-traités ne dépassant pas les 6 mois[63].

II. Dépistage

a. Imagerie et marqueurs sanguins

Le diagnostic de la CP est plus complexe que celui du CCR. Un diagnostic erroné sur l'état d'avancement de la pathologie peut alors conduire à une prise en charge inadaptée du patient, impactant négativement sa survie globale. L'antigène carcino-embryonnaire (ACE), une protéine membranaire glycosylée (cf. page 47), est l'un des principaux marqueurs tumoraux de la CP et est impliqué dans la progression et la dissémination des CCR. Un taux sérique élevé d'ACE permet ainsi de suspecter la présence de métastases, examen diagnostic qui est par la suite complété par de l'imagerie.

La méthode d'imagerie la plus utilisée pour les CP d'origine colorectale est la tomodensitométrie (TDM) dont la sensibilité varie de 60 à 90 %[64]. Cet examen peut être complété par d'autres méthodes d'imageries exploratoires (coloscopie, laparoscopie) ou fonctionnelles, plus sensibles, telles que l'imagerie par résonnance magnétique (IRM), le scan CT ou la tomographie par émission de positons au fluorodeoxyglucose (FDG-TEP)[45]. Une étude histopathologique de la tumeur primaire intervient en complément de l'imagerie et constitue un pré-requis indispensable à tout prise en charge thérapeutique.

Un diagnostic précoce est d'autant plus important que la survie des patients à 5 ans dépend fortement de la charge tumorale détectée[65].

b. Évaluation de l'envahissement péritonéal per opératoire

Parallèlement à l'exérèse chirurgicale les patients atteints d'une CP sont, dans la majorité des cas, soumis à une laparotomie exploratoire de la totalité de la cavité abdominale en vue de mesurer l'étendue de la maladie. Au cours de cette exploration peu invasive, les chirurgiens déterminent l'indice de carcinose péritonéale (PCI), mis au point par Sugarbaker et son équipe en 1996, qui permet d'estimer la charge tumorale dans la cavité péritonéale[66]. Le PCI peut également être déterminé de façon non-invasive par scanner CT ou IRM mais avec plus de risques d'erreurs.

La méthode de Sugarbaker consiste en premier lieu à subdiviser les zones abdominales et pelviennes en 13 régions (Figure 5). A chacune des zones est alloué un score allant de 0 à 3 suivant le nombre et la taille des tumeurs repérées, le PCI total allant donc de 1 à 39 (0= absence de tumeur; 1= tumeur < 0,5 cm; 2= 0,5 < tumeur < 5 cm et 3= tumeur > 5 cm ou à confluence). Plus le PCI est faible moins la cavité péritonéale est envahie par les métastases et plus le pronostic est favorable.

Ainsi, pour un PCI inférieur à 6 la survie globale à 5 ans est d'environ 44 %, entre 7 et 12 elle est de 22 % et pour un score supérieur à 19 celle-ci chute à 7 %[65]. Il existe donc une corrélation linéaire entre le PCI et la survie globale à 5 ans, permettant d'effectuer une sélection des patients pour les diriger ensuite vers une prise en charge adaptée à l'évolution de leur maladie[67]. Enfin, une détermination du PCI effectuée pré et post-traitement permet d'évaluer la réponse thérapeutique des chimiothérapies administrées.

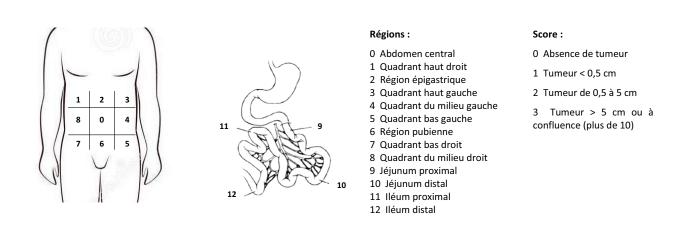


Figure 5 : Détermination du score de carcinose péritonéale (PCI). Modifié d'après Sugarbaker et al. [68]

Un autre indicateur de pronostic introduit en 2009 par Pelz *et al.* associe l'estimation du PCI à un scan CT de la région abdominale ainsi qu'aux symptômes cliniques et histopathologiques pour allouer aux patients un score de 2 à 22 points permettant de les classer dans des catégories allant de I à IV selon la gravité de leur maladie (**Tableau 4**)[69].

| Symptômes cliniques | PCI | Histologie des tumeurs primitives |
|---------------------|-------------------------|---|
| Aucun 0 Point | < 10 1 Point | Bien différenciée Modérément différenciée/ N0 1 Point |
| Modérés 1 Point | [10-20] 3 Points | Modérément différenciée/ N1 ou N2 3 Points |
| Sévères 6 points | > 20 7 Points | Toutes mal différenciées 9 Points |

| Score | Stade |
|-------|-------|
| 2-3 | I |
| 4-7 | II |
| 8-10 | III |
| > 10 | IV |

Tableau 4: Estimation du score de Peritoneal Surface Disease Severity (PSDSS) des patients atteints de carcinose péritonéale d'origine colorectale. Le symptôme modéré est défini par une perte de poids < 10 % du poids total, des douleurs abdominales modérées et des ascites asymptomatiques. Un symptôme sévère est déclaré pour les patients qui ont une perte de poids ≥ 10 %, des douleurs persistantes, une occlusion intestinale ou des ascites symptomatiques. PCI : indice de carcinose péritonéale (de 0 à 39). N : ganglion, classification TNM. D'après Pelz *et al*.[69]

Plus récemment, en 2013, un nouveau score de pronostic a été proposé par Cashin *et al.* afin d'identifier des patients présentant des chances de survie faibles (< 1 an) et donc susceptibles d'être exclus des protocoles de thérapie classiques de la CP[70]. Ainsi, un score colorectal péritonéal (COREP) ≥ 6 montre une spécificité comprise entre 92 et 100 % et une sensibilité de 75 à 80 % pour l'identification de ces patients. Le COREP attribue un score allant de 0 à 18 après étude histopathologique des tumeurs et examens biologiques (dosage de divers marqueurs sériques (ACE, CA125, CA 19-9 et CA 15-3), comptage des globules blancs, mesure de l'hémoglobine).

Après exérèse chirurgicale, deux autres outils prédictifs peuvent être utilisés pour évaluer les chances de survie du patient, à savoir le score de cytoréduction complète (CC) et le score R. Le CC peut être mesuré de deux façons différentes et permet d'estimer la quantité de tumeurs résiduelles après chirurgie. La méthode originale de Sugarbaker mesurait le CC sur une échelle allant de 0 à 3 avec un CC-0 indiquant qu'il n'y a plus de nodule tumoral visible à l'œil du chirurgien, un CC-1 correspondant à des tumeurs résiduelles de taille inférieure à 2,5 mm, CC-2 pour des tumeurs résiduelles de 2,5 mm à 2,5 cm et CC-3 pour toutes les tumeurs de taille supérieure à 2,5 cm[71]. Une simplification de cette méthode de classification a été apportée il y a quelques années en

classant les patients soit en catégorie CC-0 soit CC1 avec un CC-0 indiquant que tous les nodules tumoraux visibles (≥ 2,5 mm) ont été retirés par le chirurgien tandis qu'un CC-1 témoigne d'une ablation incomplète des tumeurs (tumeurs résiduelles ≤ 2,5 mm)[72]. Le score R est plus répandu, avec R0 signifiant une cytoréduction complète avec des marges négatives, R1 indiquant des marges positives mais sans tumeur résiduelle apparente et R2 la présence d'importantes masses tumorales. Le niveau R2 peut être subdivisé en trois catégories (a, b et c) selon la taille des tumeurs visibles restantes (< 5 mm, entre 5 mm et 2 cm ou > 2 cm).

III. Traitements de la carcinose péritonéale d'origine colorectale

a. Exérèse chirurgicale

Pendant des années les patients présentant une CP d'origine colorectale étaient considérés comme incurables et seuls des traitements palliatifs de chimiothérapie injectées par voie systémique étaient utilisés[73]. Les avancées médicales de ces dernières années, développées non plus dans un but palliatif mais à des fins curatives, ont permis d'améliorer la médiane de survie des patients atteints d'une CP colorectale de 12 à 32 mois[74].

Initialement, l'ablation chirurgicale des tumeurs péritonéales était effectuée en routine dans le cas de CP dérivant de l'appendice, de mésothéliomes ou de cancers ovariens. Aujourd'hui, la chirurgie a été étendue aux CP d'origines gastriques et colôniques[75].

Ces dernières années, le développement de sondes moléculaires destinées à l'imagerie en fluorescence a connu un essor important et est apparu comme une stratégie potentielle dans les techniques de chirurgies guidées par imagerie. En effet, la résolution de l'œil humain est limitée et peut être source d'erreur au moment de la cytoréduction (CRS, cytoreductive surgery). Une aide à la détection en temps réel des tumeurs microscopiques représente ainsi un atout certain dans la prise en charge d'une pathologie comme la CP[64].

b. Chimiothérapies

La première chimiothérapie proposée aux patients ayant une CP d'origine colorectale reposait sur l'injection néo-adjuvante en systémique de 5-FU, soit seul soit en association avec d'autres agents cytotoxiques (protocoles FOLFOX et FOLFIRI) ainsi que sur l'utilisation combinée des thérapies ciblées bevacizumab ou cetuximab (cf. chapitre 1)[76]. Par la suite les patients présentant une CP de grade IVb, inéligibles aux protocoles classiques, ont été sélectionnés pour recevoir une exérèse chirurgicale combinée à l'injection intrapéritonéale de chimiothérapies.

c. Chimio-hyperthermie intrapéritonéale (CHIP)

La forte récurrence des tumeurs cancéreuses après une CRS a cependant conduit au développement de thérapies intrapéritonéales. La chimio-hyperthermie intrapéritonéale (CHIP) a ainsi été proposée en complément de la CRS[74]. Deux critères sont néanmoins essentiels pour sélectionner des patients qui seront aptes à recevoir ces protocoles agressifs et invasifs : le premier repose sur la capacité du malade à supporter la chirurgie tandis que le second concerne de façon prédictive la possibilité de réussir une CRS la plus complète possible des tumeurs visibles.

L'efficacité de la combinaison de la CRS et de la CHIP a été évaluée pour la première fois en 2008 au cours d'une étude clinique randomisée. Les auteurs ont rapporté une augmentation significative de la médiane de survie globale des patients de 12 à 40 mois et une augmentation de la survie à 5 ans de 27 à 45 %[74, 76, 77]. Il a également été observé une survie à 5 ans de 43 % des patients où toutes les tumeurs macroscopiques avaient été retirées comparé à 0 % lorsque des lésions résiduelles supérieures à 2,5 mm subsistaient. Ces recherches mettent ainsi en évidence l'importance d'une CRS complète des nodules tumoraux préalablement à tout traitement de chimiothérapie. Bien que la CRS combinée à la CHIP soit efficace, une rechute de la maladie est cependant observée chez 88 % des patients dans les 2 ans suivant la thérapie[78].

La CHIP peut être effectuée selon deux méthodes, soit en circuit dit « ouvert » soit en circuit « fermé ». La CHIP en circuit fermé s'effectue en *per*-opératoire, juste après l'ablation des tumeurs, et consiste en l'injection d'irinotécan ou d'oxaliplatine (dose de 360 à 460 mg/m²) dans un volume compris entre 3 et 5 L, préalablement chauffé entre 42 et 43 °C pour une administration locorégionale d'une durée de 60 à 120 min effectuée directement dans la cavité péritonéale de façon à ce que les tumeurs subsistantes soient immergées (Figure 6)[71]. L'approche en circuit ouvert, technique dite du Colisée, qui est beaucoup moins répandue, implique que l'abdomen ne soit pas refermé durant la procédure de CHIP et que le chirurgien manipule les organes internes afin d'effectuer la CRS en parallèle et permettre que la chimiothérapie diffuse de façon plus homogène. La technique du Colisée ne représente aucun danger pour le patient ni le personnel soignant[79]. Une étude rétrospective récente menée en 2017 sur 30 patients a démontré que même si la technique en circuit fermé permet un meilleur maintien de la température intra-abdominale que celle du Colisée il n'y avait cependant aucune différence significative quant à l'efficacité thérapeutique[80] de chacune des stratégies.

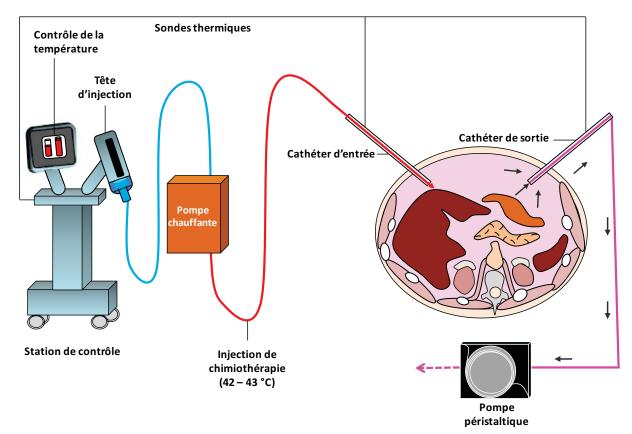


Figure 6 : Principe général du fonctionnement de la chimio-hyperthermie intrapéritonéale (CHIP) en circuit « fermé ».

Une variante des chimiothérapies utilisées dans le cadre des CHIP consiste en l'injection intrapéritonéale de mitomycine C, à raison de 30 à 50 mg/m², associée ou non à du cisplatine chauffé entre 41 et 42,5 °C pendant une à deux heures. Ce protocole alternatif, très répandu aux États-Unis, est plus efficace que la CHIP à base d'irinotecan/oxaliplatine en termes de survie pour les patients ayant une CP de PSDSS I/II (*i.e.* 54 mois *vs* 28 mois) mais est également responsable d'une forte toxicité hématologique chez 20 % des patients[81][82].

L'hyperthermie seule est cytotoxique. Combinée à la chimiothérapie elle permet de potentialiser son effet en induisant une augmentation de la perméabilité cellulaire[83]. De plus, l'injection locorégionale permet d'administrer des doses de chimiothérapie 20 à 50 fois plus concentrées qu'avec une injection systémique classique- tout en réduisant les risques de toxicité hématologique.

La CHIP a été largement utilisée pendant des années dans le traitement des cancers ovariens et des cancers de l'appendice. Si aucune étude clinique n'a été menée sur ces derniers du fait de leur faible incidence, des études cliniques randomisées effectuées sur le traitement par CHIP des cancers ovariens récidivant ont montré à la fois une amélioration de la survie à 5 ans et de la survie globale

des patients traités comparés à ceux n'ayant reçu qu'une injection systémique de chimiothérapie[84–87].

Dans le cas d'une CP d'origine colorectale cette approche demeure actuellement associée à une morbidité allant jusqu'à 62 % et à une mortalité de l'ordre de 10 %[88]. L'efficacité thérapeutique de la CHIP se trouve ainsi limitée, à la fois par la faible diffusion du traitement dans l'ensemble du péritoine —qui induit une irrigation incomplète des organes abdominaux ainsi qu'une pénétration insuffisante du traitement à l'intérieur des lésions- mais aussi par la prise en charge des patients, souvent tardive, du fait du difficile diagnostic de la maladie.

Ainsi, malgré l'avancée majeure que représente la CHIP en matière de prise en charge de la CP, la complexité de sa mise en œuvre ainsi que les effets secondaires potentiellement associés rendent son utilisation non-consensuelle dans le milieu médical. La CHIP n'est aujourd'hui proposée que dans certains centres experts (*i.e.* Lyon, Nantes, Montpellier etc.) associée aux protocoles de recherche cliniques. Néanmoins, à l'échelle mondiale, de plus en plus de centres hospitaliers mettent en place cette thérapie. L'amélioration des processus de sélection et l'optimisation des délais d'intervention est nécessaire pour augmenter les chances de survie des patients.

La prise en charge de la CP d'origine colorectale dépend de l'état général du patient, de l'avancée de sa maladie et de son pronostic de survie, ce qui nécessite d'adapter le protocole de thérapie au cas par cas. Cependant, au-delà de l'augmentation de la survie c'est l'amélioration de la qualité de vie du patient qui prime aujourd'hui dans la prise en charge des cancers et cela nécessite donc le développement de thérapies alternatives, moins toxiques, plus efficaces et moins invasives.

d. Thérapies expérimentales

La chimiothérapie intrapéritonéale pressurisée par aérosols (PIPAC), une technique récente et peu invasive, est apparue en 2013 comme une alternative potentielle à la CHIP. L'ajout d'un nébuliseur permet de convertir la chimiothérapie liquide en aérosol. La PIPAC est ainsi appliquée par voie laparoscopique, une chirurgie faiblement invasive qui permet un rétablissement plus rapide des patients (Figure 7)[89]. Cette technique expérimentale n'est actuellement proposée que dans quelques centres experts de cancérologie, tels que le centre hospitalier Lyon-Sud, et uniquement à des patients inéligibles à la CHIP. La procédure consiste dans un premier temps à pressuriser la cavité péritonéale à 12 mmHg à l'aide de deux trocarts insérés dans l'abdomen. Par la suite, une solution de chimiothérapie, d'un volume équivalent à 10 % d'une dose systémique classique, est administrée à forte pression par l'un des trocarts, sous forme d'aérosol, pendant une durée de 30 min tandis que les résidus d'aérosols restants sont quant-à-eux éliminés par le second trocart[89].

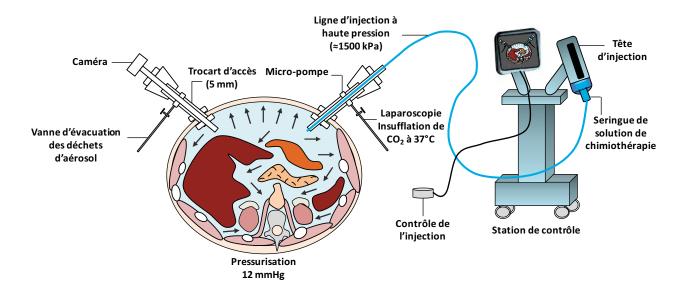


Figure 7 : Principe général du fonctionnement de la chimiothérapie intrapéritonéale pressurisée par aérosol (PIPAC). Modifié d'après Solass *et al.*[89]

La PIPAC a été développée initialement dans le but de pallier les deux inconvénients majeurs de la CHIP que sont la faible pénétration dans les nodules tumoraux et la distribution incomplète des chimiothérapies à l'intérieur de la cavité péritonéale. L'étude de faisabilité de la PIPAC -réalisée par Solass et al. en 2012 avec du bleu de méthylène dans un modèle préclinique porcin- a montré une amélioration significative de la distribution et de la pénétration du produit dans la cavité péritonéale comparé à la CHIP[89]. La même équipe a par la suite fait la première démonstration de l'efficacité de la PIPAC chez l'Homme en présentant deux avantages non négligeables, à savoir d'une part la possibilité d'administrer localement de fortes doses et d'autre part d'induire une faible exposition systémique[90]. En revanche, la PIPAC ne bénéficie pas de l'avantage indéniable qu'est l'hyperthermie. C'est pourquoi, en 2015, une équipe coréenne a proposé d'allier l'efficacité de l'hyperthermie à la diffusion facilitée sous forme d'aérosol et a ainsi développé une procédure de chimiothérapie intrapéritonéale hyperthermique pressurisée par aérosol (H-PAC)[91]. Une première étude effectuée en préclinique a permis de démontrer la faisabilité et l'innocuité de cette approche dans un modèle porcin. De multiples optimisations restent cependant à faire avant que la H-PAC soit transférée en clinique[91].

Enfin, une dernière stratégie expérimentale dans le traitement de la CP d'origine colorectale repose sur la thérapie photodynamique. Dans cette approche, un photosensibilisateur est injecté et s'accumule rapidement au niveau tumoral par diffusion passive. Le composé est ensuite excité par une source d'énergie de forte intensité entrainant la formation de ROS (*reactive oxygen species*), notamment d'ions peroxyde O₂- ainsi que d'autres radicaux libres[92]. Bien que l'efficacité de cette

technique ait été démontrée en préclinique depuis quelques décennies sur de petites tumeurs avec un taux de réponse complète de 85 %, celle-ci demeure en revanche inefficace sur les tumeurs solides de plus de 3 mm[93][94].

e. Indicateurs de pronostics

L'indicateur de prédilection pour évaluer la réponse aux thérapies dans les tumeurs solides est le critère RECIST (*response evaluation criteria in solid tumors*) développé en 2000[95]. Les points de critères comportent ainsi la réponse (partielle et complète), la stabilité des tumeurs ainsi que la progression de la maladie, et sont évalués sous formes de paliers d'observations. En 2009, une mise à jour de cet indicateur a été effectuée (*i.e.* RECIST 1.1) afin d'augmenter le nombre d'observations de chacune des caractéristiques, notamment au niveau du nombre de lésions évaluées ou de l'évaluation des ganglions lymphatiques pathologiques[96]. Récemment, un nouvel outil d'évaluation, l'imagerie PET au FDG-18F, a été couplé à RECIST 1.1 pour donner PERCIST 1.0, permettant ainsi d'ajouter une dimension quantitative à la mesure de la réponse au traitement[97][98].

Chapitre 3 : Radioimmunothérapie des cancers

La radiommunothérapie (RIT) consiste à traiter des lésions cancéreuses à l'aide d'anticorps conjugués à des radionucléides. Les radiations émises par ce dernier induisent des lésions au niveau de l'ADN et des constituants de la cellule conduisant *in fine* à la mort cellulaire.

I. Anticorps intacts et formes dérivées

a. Immunoglobulines G: caractéristiques et production

Les anticorps intacts, ou immunoglobulines (Ig), sont des structures protéiques d'environ 150-160 KDa composées de deux chaînes lourdes (CH, ≈ 50 KDa) et deux chaînes légères (CL, ≈ 25 KDa). Les deux CH sont reliées entre elles par des ponts dissulfures et individuellement à une CL par un autre pont dissulfure. Les deux CL et les deux CH d'un anticorps donné sont identiques, conférant deux sites de liaison capables de se lier à deux antigènes (Ag). D'un côté de l'Ig se trouvent ainsi les domaines Fab (antigen-binding fragment), qui permettent de reconnaitre spécifiquement, via des régions hypervariables appelées Complementarity determining regions (CDR), des séquences polypeptidiques particulières (épitopes) sur les Ag. L'autre côté est constitué d'un fragment cristallisable (Fc) contenant les domaines constants qui possèdent la faculté d'interagir soit avec les récepteurs situés à la surface des cellules immunitaires soit avec le récepteur Fc néonatal (FcRn) impliqué dans la distribution et l'élimination de l'anticorps dans l'organisme. Enfin, les parties Fab et Fc sont reliées entre elles via un ensemble de ponts disulfures. (Figure 8)[99].

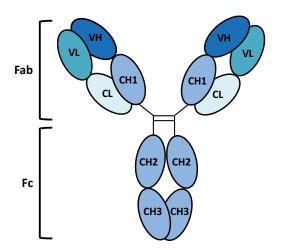


Figure 8 : Structure d'un anticorps. Fab : fragment antigen binding. Fc : fraction constante. VH : chaîne variable lourde. VL : chaîne variable légère. CH : chaîne lourde constante. CL : chaîne légère constante.

Il existe cinq grandes classes ou « isotypes » d'Ig, qui sont répartis selon la structure des domaines constants des chaines lourdes, et possèdent des propriétés différentes (IgG, IgA, IgM, IgE ou IgD). Les Ig circulants dans le sang, appartenant à la classe des immunoglobulines G, représentent ainsi deux tiers de l'ensemble des anticorps présents dans l'organisme humain et sont donc des vecteurs de choix pour l'immunothérapie.

Les IgG peuvent être produits par différents clones de plasmocystes et reconnaitre plusieurs épitopes d'un même Ag, ce sont alors des anticorps polyclonaux. Les anticorps utilisés en thérapie sont des anticorps monoclonaux (AcMs) qui reconnaissent un seul épitope spécifique de l'Ag et qui sont produits par un seul clone de plasmocyste ou par un lymphoblaste. Les AcMs thérapeutiques peuvent être classés de différentes manières, en fonction de leurs cibles, de leurs fonctions (thérapie ciblée, inhibiteur checkpoint, cibles du microenvironnement tumoral, ...) et peuvent être également associés à des principes actifs[100]. Ainsi, des immunotoxines (e.g. diphteria), des radioisotopes (cf. II. Médecine nucléaire) ou bien des pro-médicaments peuvent être combinés à des AcMs afin d'induire ou d'augmenter la réponse thérapeutique. Les AcMs intacts humanisés ont ainsi montré depuis deux décennies leur efficacité chez l'Homme par l'induction de l'apoptose cellulaire ou des mécanismes de cytotoxicité dépendant de l'anticorps (ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity).

Köhler et Milstein ont découvert une méthode fiable et rapide de production d'AcMs, grâce à l'utilisation d'hybridomes, des cellules résultant de la fusion d'un lymphocyte B et d'un myélome[101]. Les hybridomes peuvent cependant se révéler génétiquement instables et donner de faibles rendements. De plus, les séquences d'AcMs étant à l'origine produites dans des systèmes murins cela induit une réponse immunitaire chez l'Homme via la production d'anticorps humains anti-lgG murine (réponse HAMA), réduisant de fait l'efficacité thérapeutique. Grâce au génie génétique, les AcMs ont par la suite pu être humanisés allant des formes chimériques (Fab murins couplés à des Fc humains) jusqu'à des formes humanisées dans lesquelles seuls les CDR sont murines voire totalement humaines (Figure 9)[102].

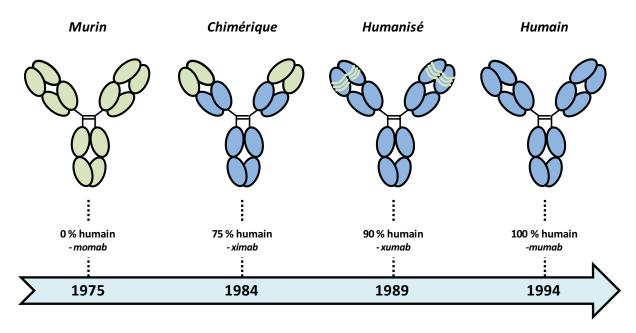


Figure 9 : Evolution des structures d'anticorps monoclonaux obtenues par ingénierie génétique.

b. Dérivés d'IgG

Les récentes et importantes avancées cliniques en matière d'utilisation d'AcMs thérapeutiques dans le domaine de l'oncologie conduisent au développement de nouveaux dérivés d'AcMs ou de protéines mimétiques d'anticorps [103]. Ces fragments d'AcMs sont aussi humanisés si nécessaire afin d'éviter les risques d'immunogénicité. De la même façon que les AcMs intacts, les dérivés d'IgG peuvent être conjugués à des molécules cytotoxiques ou bien à des radionucléides (cf. II. Imagerie nucléaire), les rendant ainsi vecteurs d'agents d'imagerie et/ou de thérapie[104].

Les modifications apportées aux IgG affectent à la fois leur taille, leur charge, leur capacité d'interaction avec la cible mais aussi leur biodistribution et donc directement la pharmacocinétique de la protéine (Tableau 5)[105]. Ainsi, les AcMs intacts, ainsi que les dérivés d'AcMs de grande taille (Poids moléculaire (PM) > 60-70 KDa) sont généralement éliminés par voie hépatique tandis que les plus petits fragments < 60-70 kDa sont principalement éliminés par voie rénale leur conférant une demi-vie plus courte pour les petites protéines diminuant leur temps d'exposition à la tumeur. Cependant, les petits formats sont intéressants en vue d'améliorer la pénétration et la diffusion dans les tumeurs solides, généralement faiblement vascularisées. La vascularisation anarchique et la structure des tumeurs permettent cependant la diffusion de petites molécules sans que celles-ci ne soient étiquetées. Cet effet, dit EPR (Enhanced Permeability Retention) peut ainsi augmenter la concentration intra-tumorale des petites molécules anticancéreuses de 20 à 30 %[106]. La rapide excrétion des petites protéines implique néanmoins de devoir réitérer plusieurs fois leur administration afin d'obtenir un effet significatif sur le ralentissement de la croissance tumorale, ce

qui peut à terme induire une importante toxicité. Ainsi, les recherches en termes de protéines thérapeutiques doivent tenir compte d'un bon compromis entre petite taille et longue demi-vie plasmatique afin d'obtenir la meilleure réponse tumorale associée à une toxicité minimale[107][108].

| Format d'anticorps | Structure | Poids moléculaire (KDa) | Demi-vie plasmatique T 1/2 | Voie d'élimination | Exemples Nom (cible), application | Stade | Références |
|-----------------------|-----------|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------|--|--------------------------|------------|
| lgG entier | | 150-160 | 1-3 semaines | Hépatique | Ipilimumab (CTLA4), Pembrolizumab (PD1), Atezolizumab (PDL1), Bevacizumab (VEGF), applications multiples | U | [109–112] |
| F(ab') ₂ | | 110 | 8-10 h | Hépatique | Panitumumab (EGFR), cancer colorectal | Ер | [113] |
| Minibody | | 75 | 5-10 h | Hépatique | 10H8 (Her2/neu), ovaires et seins | Ер | [114, 115] |
| Fab | | 50-55 | 15-20 h | Rénale | Arcitumomab (ACE), imagerie du CCR CDP791 (VEGF), anti-angiogénèse MDX-H210 (Her2/neu), seins | C Phase I Phase II | [116–118] |
| Diabody | | 50 | 3-5 h | Rénale | T84.66 (ACE), imagerie du CCR C6.5K-A (Her2/neu), ovaires et seins | Ер | [119–121] |
| scFv | 6 | 28 | 2-4 h | Rénale | CC49 (TAG-72), gastro-intestinal (PRIT) SGN-17 (P97), mélanome (Her2/neu), seins | Phase I Ep Ep | [122–124] |

| Format d'anticorps | Structure | Poids moléculaire (KDa) | Demi-vie plasmatique T 12/ | Voie d'élimination | Exemples Nom (cible), application | Stade | Références |
|-----------------------|-----------|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------|---|---------|------------|
| VhH | 0 | 12-15 | 30-60 min | Rénale | Nanobody (ACE), imagerie des cancers | Ep | [125] |
| Affibody | • | 7 | 30-60 min | Rénale | Affibody anti-Her2/neu, imagerie du cancer du sein | Phase I | [126] |

Tableau 5 : Structures et pharmacocinétiques des différentes structures d'anticorps utilisées en imagerie et/ou thérapie. Quelques exemples d'applications sont donnés pour chaque structure. Fab : *antigen-binding fragment*. ScFv : *single chain variable fragment*. VhH : domaine variable de la chaine lourde. F(ab')₂ : structure dont le Fc a été retiré par digestion peptidique. C : commercialisé. Ep : études précliniques. CCR : cancer colorectal. Adapté d'après Warnders *et al.* [105] et Holliger *et al.* [127]

c. Anticorps monoclonaux conjugués

Les AcMs peuvent être conjugués de façon covalente à des petites molécules cytotoxiques de l'ordre de 300 à 1000 Da via l'insertion d'espaceurs synthétiques[128]. Ces antibody-drug conjugate (ADC) sont particulièrement intéressants car ils permettent de pouvoir augmenter l'index thérapeutique de l'effecteur cytotoxique administré en le délivrant directement au niveau tumoral. Les ADCs sont choisis pour leurs propriétés à être internalisés et pénètrent dans les cellules tumorales via la voie endosome-lysosome. L'agent cytotoxique se retrouve alors libéré soit par clivage de l'espaceur chimique soit après que l'AcM ait été dégradé par le lysosome. Enfin, l'effecteur cytotoxique diffuse dans le cytoplasme et/ou le noyau, lui permettant in fine d'aller jusqu'à sa cible, majoritairement la tubuline ou l'ADN[129]. Les premières générations d'ADC conjugaient les AcMs à des molécules déjà utilisées en clinique telles que le 5-FU ou la mitomycine C[130]. Cette approche a connu des problèmes d'immunogénicité dues aux AcMs murins, mais aussi des difficultés dans la stabilité chimique de l'espaceur utilisé. Les générations suivantes ont tenté de pallier ces inconvénients en utilisant des molécules plus spécifiques, des antimitotiques ou alkylants de l'ADN de nouvelle génération (i.e. N-acétyl, auristatine, ...) ou de nouveaux AcMs. A ce jour, quatre ADC approuvés par l'Agence du Médicament Européenne (AME) sont sur le marché et soixante-cinq autres sont en cours d'évaluation clinique (Tableau 6)[129]. Les ADC sont sujets à de nombreux développements avec des recherches sur de nouveaux linkers et sites de fixation du principe actif[131]. Parmi les essais cliniques en cours, on peut noter l'essai de phase 2 TRINITY testant le rovalpitizumab tesirine sur des patients avec un cancer du poumon a petites cellules avec des taux de réponse en survie globale de 6,7 mois (Essai Clinique : NCT02674568).

| ADC | Cible antigénique | Effecteur cytotoxique | AcM | Application | Année d'AMM | Références |
|---|----------------------|------------------------------------|--------|---|---|------------|
| Gemtuzumab ozogamicine (Mylotarg®, Pfizer) | CD33 | N-acétyl-γ1- calicheamici ne | hulgG4 | Leucémie myéloïde sévère | 2000 Retiré en 2011 Approuvé de nouveau en 2017 | [132] |
| Inotuzumab ozogamicine (Besponsa®, Pfizer) | CD22 | N-acétyl-γ1- calicheamici ne | hulgG4 | Leucémie lymphoblastique sévère | 2017 | [133] |
| Trastuzumab emtansine (Kadcyla®, Roche) | Her2/neu | Mertansine | hulgG1 | Cancer du sein | 2013 | [134] |
| Brentuximab vedotine (Adcetris®, Takeda) | CD30 | Auristatine E | chlgG1 | Lymphome Hodgkinien Lymphome anaplasique à large cellules | 2011 | [135] |

Tableau 6 : ADC commercialisés dans le traitement des cancers. ADC : *antibody-drug conjugate*. AcM : anticorps monoclonal. AMM : autorisation de mise sur le marché. hulgG : Immunoglobuline G humanisée. chlgG : Immunoglobuline G chimérique.

De récentes avancées en termes de modifications d'AcMs ou de fragments d'AcMs mettent en jeu des stratégies de conjugaison basées entre autre sur l'encapsulation de molécules cytotoxiques dans des liposomes ou sur des toxines protéiques. Ainsi, les liposomes modifient la cinétique du complexe et permettent ainsi d'augmenter la perméabilité cellulaire, facilitant donc l'accessibilité de l'agent anticancéreux aux cibles intracellulaires[136][137][138]. Les immunotoxines, structures hybrides d'une IgG ou d'une petite protéine vectorisée soit avec la totalité, soit avec une partie d'une toxine représentent également une stratégie potentielle de vectorisation dans le traitement des cancers. A l'instar des molécules cytotoxiques, les toxines concernent des poisons produits de façon biologique au sein d'un organisme vivant, à savoir des substances issues de plantes vénéneuses, de venins d'animaux ou bien encore des toxines bactériennes telles que le tétanos[139]. Les toxines portées par l'AcMs permettent ainsi d'affecter à la fois les cellules ciblées mais également les cellules tumorales adjacentes du fait de leur diffusion passive au travers des membranes endothéliales (effet EPR).

Enfin, les ADEPT (antibody-directed enzyme prodrug therapy) sont une classe particulière d'ADC à la base d'une stratégie qui consiste à cibler dans un premier temps les antigènes tumoraux par des AcMs couplés à une enzyme non-active. Dans un second temps, après clairance des complexes AcMs-enzymes circulants, un pro-médicament cytotoxique inactif et comportant une entité clivable est administré. Le pro-médicament vient ainsi réagir avec l'enzyme qui clive alors la partie protectrice de celui-ci entrainant son activation et permettant in fine d'enclencher l'effet cytotoxique directement au contact des cellules tumorales[140]. Outre le fait que grâce à la vectorisation par l'AcM ce système soit hautement spécifique, l'autre avantage majeur est que le pro-médicament étant généralement une petite molécule, celui-ci peut diffuser aisément au sein de la tumeur. Ainsi, les ADEPT peuvent cibler des cellules indépendamment du niveau d'Ag exprimés via un effet bystander. De plus, les pro-médicaments ont généralement une demi-vie plasmatique courte, permettant ainsi d'éviter l'échappement dans le sang, ce qui assure une certaine innocuité envers les tissus sains.

d. Anticorps bispécifiques

Pour augmenter la spécificité des traitements, les anticorps bispécifiques (bsAcs) ont été construits par l'appariement de deux fragments Fab spécifiques de deux épitopes différents. Ces nombreuses structures de bsAcs ont ainsi été développées au cours du temps, selon différentes méthodes de fabrication (*i.e.* ingénierie biologique, chimique ou génétique). Le **tableau 7** regroupe une liste, bien que non-exhaustive, des principales structures de bsAcs ainsi que leurs caractéristiques et leurs applications cliniques. Il existe trois approches pour préparer des bsAcs, à savoir : par ingénierie biologique, chimique ou génétique.

Les bsAcs fabriqués par ingénierie biologique sont obtenus par fusion somatique de deux hybridomes différents, qui sont choisis selon les propriétés des AcMs et la cible vers laquelle ils sont dirigés. Cela donne lieu à une structure hybride appelée Quadroma qui est ainsi dirigée contre deux types d'Ag différents. Ces bsAcs sont néanmoins difficiles à produire en grande quantité et la présence de fragments d'origine murine, utilisés afin d'augmenter les rendements de production, peuvent entraîner des risques d'immunogénicité chez les patients. Cependant, des études cliniques menées dans le traitement d'ascites malins ou de cancer du sein ont démontré une bonne efficacité du traitement (Tableau 7).

Concernant l'approche par ingénierie chimique, les bsAcs sont obtenus par formation de liaisons covalentes entre deux AcMs différents. Le lot de bsAcs produit est cependant très

hétérogène du fait de la difficulté de séparer les hétérodimères des homodimères et contient des anticorps peu stables possédant une activité biologique diminuée.

L'ingénierie génétique permet d'obtenir des bsAcs recombinants, soit par mutations dans les domaines C_{H3} (*knob-hole*), par des constructions utilisant des fragments d'AcMs (*scFvs, diabodies*), par l'assemblage spontané de différents hétérodimères (*leucine zipper*) ou bien encore selon l'interaction naturelle entre le complexe AMPc et la protéine kinase A (*dock and lock*).

Les bsAcs thérapeutiques sont regroupés dans 4 grandes classes, à savoir les ré-orienteurs de cellules T, les ré-orienteurs de cellules *natural killer*, les cibles des immuno-modulateurs tumoraux et les immuno-modulateurs[141]. Ainsi, l'une des parties du bsAcs est utilisée pour cibler l'Ag tumoral d'intérêt tandis que l'autre partie sert à lier des complexes protéiques particuliers qui vont enclencher la réponse immunitaire. De nombreux bsAcs sont actuellement en cours d'étude clinique et à ce jour, seuls deux d'entre eux sont commercialisés, à savoir le blinatumomab (Blincyto®, Amgen) et le catumaxomab (Removab®, Neovii Biotech / Trion Pharma). Le blinatumomab est un CD19 × CD3 approuvé depuis 2015 par l'AME pour le traitement de la leucémie lymphoblastique sévère qui est de plus évalué dans d'autres pathologies hématologiques[142]. Le catumaxomab est un quadroma tri-spécifique EpCAM × CD3, approuvé par l'AME en 2009 et utilisé dans le traitement d'ascites malins[143].

| bsAcs | Structure | Type d'ingénierie | Avantages / Inconvénients (+/-) | Applications | Etudes cliniques ou précliniques | Cibles | Références |
|----------------------|---|----------------------|---|---|--|--|------------|
| Quadroma | WH HW CHI | Biologique | (-) Difficile à produire en grandes quantités (-) En partie d'origine murine: risques d'immunogénicité | Ascites malins Cancers du sein | Catumaxomab (Aprouvé en 2009) Ertumaxomab, Phase I | EpCAM × CD3 Her2/neu × CD3 | [143, 144] |
| Cross- linked Fab | S S S S S S S S S S S S S S S S S S S | Chimique | (+) Production à grande échelle (-) Hétérogénicité: difficulté de séparer les hétérodimères des homodimères (-) Faible stabilité et perte de réactivité des bsAcs | Cancer médullaire de la thyroïde Cancer colorectal | MDX-447, Phase I Vanucizumab, Phase II | FcγR1 × EGFR Angiopoiétine2 × VEGF | [147] |
| Knob-hole | THE CHE CHE CHE CHE CHE CHE CHE CHE CHE C | Génétique | (+) Similaire aux Acs naturels, modifications minimales de la séquence de l'IgG | Tumeurs solides | RG-7802, Phase I (Référence : RO- 6958688) | CD3 × ACE | Non publié |

| bsAcs | Structure | Type d'ingénierie | Avantages / Inconvénients (+/-) | Application | Etudes cliniques ou précliniques | Cibles | Références |
|----------------------|-----------|----------------------|--|--------------------------------------|---------------------------------------|------------|------------|
| Tandem scFv/Bite® | 15 HX | Génétique | (+) Flexibilité: possibilité de fixer deux épitopes (+) Petite taille (50-60 kDa) (-) Difficile à produire, courte demi-vie | Leucémie lymphoblastique aiguë | Blinatumomab (Approuvé en 2015) | CD3 × CD19 | [142] |
| Diabody | 10 10 | Génétique | (+) Petite taille (50-60 kDa)(-) Risques de dissociation des chaînes VH et VL liées de façon non-covalente(-) Très courte demi-vie | Cancer ovarien Cancer du sein | C6.5K-A, préclinique | Her2/neu | [121] |
| Leucine zipper | | Génétique | (+) Augmente l'activité biologique | Cancer colorectal | DARPins, préclinique | EGFR | [149] |

| bsAcs | Structure | Type d'ingénierie | Avantages / Inconvénients (+/-) | Application | Etudes cliniques ou précliniques | Cibles | Références |
|-------|-----------|----------------------|--|---|-------------------------------------|---------------------------|------------|
| | | Génétique | (+) Haute affinité pour les Ag, activité biologique élevée (-) Risques de dissociation des chaînes VH et VL liées de façon non-covalente | Leucémies et lymphome non- Hodgkinien | Stade préclinique | CD3 × CD19 | [150] |
| | | Génétique | (+) Interaction cAMP/AKT,formation d'une liaisoncovalente par ponts disulfures(+) Complexe trivalent stable | Cancer colorectal, pancréas, prostate, poumons et thyroïde | TF12, préclinique TF2, Phase I | Trop2 × HSG CAM5 × HSG | [151] |

Tableau 7 : Structures et caractéristiques des principales formes d'anticorps bispécifiques développées. Adapté d'après Hollander et al.[154] et Godar et al.[155]

II. Médecine nucléaire : imagerie et thérapie

La médecine nucléaire est une spécialité médicale développée depuis de nombreuses décennies pour le diagnostic et la thérapie à l'aide de substances radioactives. Ces approches permettent notamment d'obtenir une imagerie fonctionnelle et métabolique, et peuvent être complétées par l'imagerie morphologique traditionnelle (scanner ou IRM). L'imagerie nucléaire est un outil de choix pour la détection et le suivi de lésions cancéreuses mais peut également être utilisée en *per*-opératoire afin de guider le geste chirurgical. L'administration de sources radioactives non-scellées peut également être réalisée à des fins thérapeutiques, et peut être utilisée seule ou en complément (néo et post adjuvant) des traitements anticancéreux conventionnels que sont la chirurgie et la chimiothérapie. Son utilité est avérée à la fois pour les pathologies cardiaques, neurologiques, endocrinologiques et en oncologie.

a. Radionucléides

Les radiopharmaceutiques utilisés en médecine nucléaire permettent soit le diagnostic par imagerie scintigraphique (i.e. TEP, TEMP) soit le traitement des pathologies cancéreuses (i.e. radiothérapie interne vectorisée). Les radiopharmaceutiques comportent (ou peuvent être) des radionucléides (isotopes radioactifs) qui peuvent être administrés soit par voie orale (e.g. curiethérapie à l'iode-131) soit par voie intraveineuse. Le radionucléide peut être lié à un vecteur tel qu'un AcM, un peptide, une hormone ou une petite molécule, qui va permettre de cibler une caractéristique ou un antigène tumoral. Le choix du vecteur s'effectue selon des critères d'affinité et de spécificité envers les cellules tumorales, pour permettre à la sonde radiomarquée de s'accumuler en grande quantité dans les tumeurs.

Les radionucléides sont des atomes dont les noyaux sont enrichis en particules (*i.e.* protons et/ou neutrons), ce qui rend la structure instable (ou métastable). Il est possible de les trouver à l'état naturel mais également de les produire artificiellement par fission nucléaire. Les radionucléides tentent de regagner leur état stable de départ par l'intermédiaire de désintégrations de particules associées à l'émission de rayonnements électromagnétiques plus ou moins ionisants[156].

Les propriétés de désintégrations sont propres à chaque radionucléide impliquant plusieurs paramètres de calcul pour déterminer à la fois l'activité et la décroissance radioactive d'un radiopharmaceutique. Ainsi, l'activité (A) est exprimée en Becquerel (Bq) et est déterminée par le nombre de désintégrations par unité de temps et peut être rapportée au nombre de moles du radiopharmaceutique donnant ainsi l'activité molaire (Am) de l'échantillon radioactif. Le temps

nécessaire à la désintégration de la moitié des atomes radioactifs correspond à la demi-vie du radioisotope, appelé aussi période radioactive ($T_{1/2}$).

Les divers radionucléides émettent des rayonnements de natures et d'énergies différentes qui dépendent de leurs propriétés de désintégrations. Ainsi, pour l'imagerie seront utilisés des radionucléides émetteurs de rayonnements γ ou β^+ , de faible énergie, qui permettent de traverser le corps humain sans induire de dommages ni de toxicité à long termes (**Tableau 8**). Les rayons γ sont des ondes magnétiques de faible énergie mais très pénétrantes. Ils sont produits par l'émission d'un photon lors de la désintégration nucléaire du radioisotope et sont utilisés pour l'imagerie TEMP. Les rayons β^+ résultent de l'émission de positons annihilés par des électrons induisant l'émission de deux rayonnements de directions opposées. D'énergie plus élevée et moins pénétrants que les rayonnements γ , les rayons β^+ sont principalement utilisés pour l'imagerie TEP (**Tableau 8**).

| Radionucléide | Demi-vie (T _{1/2}) | Energie maximale (keV) Abondance (%) | Emissions | Imagerie |
|----------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----------|----------|
| Cuivre-64 | 12.70 houres | 653,1 (17,9 %) | β^+ | TEP |
| (⁶⁴ Cu) | 12,70 heures | 578,7 (39 %) | β- | ICP |
| Fluor-18 | 109,77 | 633,5 (96,9 %) | β+ | TEP |
| (¹⁸ F) | minutes | (35,5 (36,5 %) | р | ICP |
| Gallium-68 | 1,13 heure | 1899,1 (87,9 %) | β+ | TEP |
| (⁶⁸ Ga) | 1,13 Heure | 1099,1 (07,9 70) | Р | ILF |
| Indium-111 | 2,81 jours | 171,3 (90,6 %) | V | TEMP |
| (¹¹¹ ln) | 2,01 jours | 245,4 (94,1 %) | γ | TEIVIF |
| lode-123 | 13,22 heures | 159,0 (83,3 %) | V | TEMP |
| (¹²³ l) | 13,22 Heales | 133,0 (63,3 70) | γ | ILIVIF |
| Technétium-99m | 6,02 heures | 140,5 (88,5 %) | V | TEMP |
| (^{99m} Tc) | 0,02 fieures | 140,3 (00,3 /0) | γ | ILIVIF |

Tableau 8 : Exemples de radionucléides utilisables pour l'imagerie scintigraphique. Adapté d'après Welch *et al.*[157]

A l'inverse, les radionucléides utilisés pour la thérapie sont des émetteurs de particules α , de rayonnements β^- ou des électrons Auger, qui diffèrent selon leurs énergies ainsi que par la distance parcourue à travers la matière. Ces paramètres sont définis par l'énergie de transfert linéique (TEL) qui correspond à l'énergie moyenne délivrée par unité de longueur de la distance parcourue (**Tableau 9**)[158].

| Emission | Nature | | Distance | Énergie de transfert |
|-----------------------------|--------------------------------|------------------------------------|------------|----------------------|
| EIIIISSIOII | Nature | E _{min} -E _{max} | parcourue | linéique (TEL) |
| Particules α | Noyaux d'Hélium | 5-9 MeV | 40-100 μm | 80 keV/μm |
| Rayonnements β ⁻ | Électrons énergétiques | 50-2300 keV | 0,05-12 mm | 0,2 keV/μm |
| Électrons Auger | Électrons non- énergétiques | eV-keV | 2-500 nm | 4-26 keV/μm |

Tableau 9: Principales caractéristiques des différents rayonnements émis par les radionucléides thérapeutiques. Reproduit d'après Kassis et Adelstein.[159]

L'énergie élevée induite par les radionucléides thérapeutiques entraîne ainsi des dommages irréversibles à l'ADN (*i.e.* cassures simples et/ou doubles brins) conduisant *in fine* à la mort cellulaire (**Figure 10**).

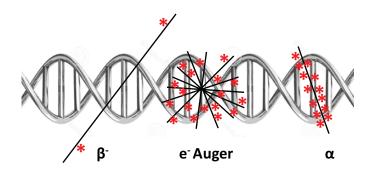


Figure 10 : Représentation schématique des ionisations induites sur l'ADN par les particules α , β et des électrons Auger. Reproduit d'après Kassis[158].

L'efficacité thérapeutique est dépendante de la dose de radionucléides injectée et donc de l'activité molaire du produit administré. Les particules α sont chargées positivement et possèdent une énergie très élevée, de l'ordre de 80 à 100 keV/ μ m et ont un très faible pouvoir pénétrant (\approx 50-100 μ m dans les tissus biologiques) ce qui limite leur toxicité au niveau des tissus sains adjacents. A l'inverse, les émetteurs β ont un pouvoir pénétrant dix à mille fois plus important ($i.e. \approx 0,05-12$ mm) mais possèdent une énergie plus faible, soit environ 0,2 keV/ μ m. L'irradiation avec des radionucléides émetteurs de particules β entraine notamment la formation de ROS au niveau cellulaire[160]. Enfin, les électrons Auger ont une faible pénétration dans les tissus ($i.e. \approx 2-500$ nm) mais induisent des clusters de forte ionisation lorsqu'ils sont à proximité de l'ADN (**Tableau 10**).

| Radionucléide | Demi-vie (T _{1/2}) | Energie maximale (keV) Abondance (%) | Emissions |
|--------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|------------|
| Actinium-225 (²²⁵ Ac) | 10,00 jours | 5830,0 (50,7 %) | α |
| Astate-211 (²¹¹ At) | 7,21 heures | 5870,0 (42,0 %) | α |
| Bismuth-213 | 45,59 minutes | 5869,0 (2,0 %) | α |
| (²¹³ Bi) | | 1427,0 (66,0 %) | |
| lode-131 | 8,02 jours | 606,3 (89,4 %) | β- |
| (¹³¹ l) | | 364,5 (81,2 %) | γ |
| Lutécium-177 | 6,65 heures | 498,3 (79,3 %) | β- |
| (¹⁷⁷ Lu) | | 208,4 (10,4 %) | γ |
| Rhénium-188 | 17,00 heures | 2120,4 (71,1 %) | β- |
| (¹⁸⁸ Re) | | 155, 0 (15,2 %) | γ |
| Yttrium-90 (⁹⁰ Y) | 2,67 jours | 2279,8 (99,9 %) | β- |
| Gallium-67 | 3,30 jours | 93,3 (35,7 %) | γ Auger |
| (⁶⁷ Ga) | | 184,6 (19,7 %) | |
| (30) | | 300,2 (16,0 %) | Augel |
| Indium-111 | 67,30 heures | 171,3 (90,6 %) | γ |
| (¹¹¹ ln) | | 245,4 (94,1 %) | Auger |

Tableau 10 : Exemples de radionucléides utilisés pour la radiothérapie. Modifié d'après Welch et al.[157]

Enfin, certains radionucléides, tels que l'¹³¹I, le ¹⁸⁸Re ou bien encore le ¹⁷⁷Lu émettent différents types de rayonnements à la fois (*i.e.* β et γ), ce qui leur confère la particularité de pouvoir être utilisés aussi bien pour l'imagerie que pour la thérapie, une propriété dite théranostique.

b. Imagerie nucléaire

L'imagerie nucléaire consiste en une exploration non-invasive des fonctions biologiques via l'injection d'un radiopharmaceutique et permet d'obtenir des images quantifiables. Les images scintigraphiques obtenues permettent ainsi à la fois de diagnostiquer certains cancers et d'évaluer leurs progressions ainsi que la réponse thérapeutique. L'imagerie nucléaire est souvent couplée à un scanner (ou tomodensitomètre) afin d'avoir une détection anatomique en plus de la scintigraphie.

Les deux types d'imageries scintigraphies sont : l'imagerie TEMP (Tomographie par Émission Mono-Photonique ou SPECT en anglais *Single Photon Emission Computed Tomography*) et l'imagerie TEP (Tomographie par Émission de Positons, ou PET en anglais, *Positons Emission Tomography*). La TEMP peut s'effectuer en planaire ou bien en trois dimensions et repose sur l'émission de rayonnements γ[161]. Les photons émis par les rayonnements sont sélectionnés par un collimateur et transmis sous forme de signal électrique. Un algorithme permet la reconstruction des images.

L'imagerie TEP nécessite l'utilisation d'émetteurs de positons β^+ et repose sur la détection simultanée de deux photons γ de 511 keV émis de deux directions diamétralement opposées. Le collimateur détecte ainsi les coïncidences produites par l'annihilation de la particule β^+ avec un électron. Les coïncidences permettent de reconstituer via les détecteurs la localisation précise du radiopharmaceutique et possède ainsi une meilleure sensibilité que la TEMP[162]. Le radiopharmaceutique de référence pour la TEP est le Fluor-18, couplé à des molécules de glucose (i.e. [18F]-fluorodéoxyglucose) qui se fixent aux transporteurs GLUT des cellules cancéreuses, des tissus gros consommateurs de sucre, et permet ainsi la détection de tumeurs.

c. Radioimmunothérapie

La radioimmunothérapie (RIT) utilise la conjugaison des radionucléides à des AcMs, ou à des fragments d'AcMs afin d'irradier directement les tumeurs avec des rayonnements ionisants (**Figure 11**)[156]. La conjugaison de radionucléides peut également se faire sur des structures telles que les peptides ou sur des dérivés d'AcMs.

La RIT induit la mort des cellules cancéreuses *via* la formation de radicaux libres qui vont endommager à la fois l'ADN et les macromolécules composants la cellules (protéines, lipides) permettant *in fine* soit un ralentissement de la prolifération cellulaire soit une régression, totale ou partielle, des tumeurs[163].

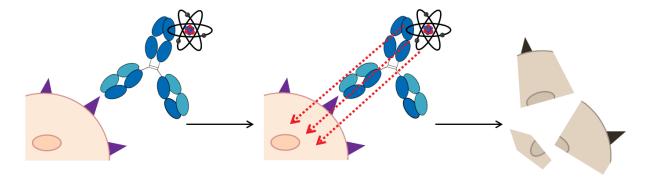


Figure 11 : Principe général de la radioimmunothérapie des cancers dans le cas d'AcMs non-internalisants.

Contrairement à la radiothérapie externe, l'avantage de la RIT est qu'elle permet de cibler aussi bien les tumeurs locorégionales que celles qui sont plus distantes voire métastatiques. A ce jour deux AcMs radiomarqués ont été approuvés par la FDA pour la mise sur le marché, à savoir l'90Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin®, Biogen, USA) en 2002 et l' ¹³¹I-tositumomab (IgG2a, Bexxar®, Corixa Corp., USA) en 2003, tout deux des anti-CD20 utilisés pour le traitement du lymphome non-Hodgkinien (LNH) récidivant. Ainsi, des taux de réponses globales de 60 à 90 % ont été démontrés pour l'90Y-ibritumomab[164][165][166] contre 60 à 80 % pour l'131 l-tositumomab[167][168] et des taux de réponses complètes comprises entre 15 et 40 % ont été obtenues pour les deux AcMs. Malgré une efficacité avérée, la commercialisation du tositumomab-131 a été arrêtée en 2014 suite à sa trop faible utilisation en comparaison des thérapies ciblées dont l'efficacité a largement augmenté[160].

Concernant le traitement des tumeurs solides de nombreuses études cliniques de phase I/II ont démontré des réponses cliniques favorables, notamment chez des patients atteints de cancer du sein avancé, et quelques études ont évolué jusqu'en phase III concernant le traitement du cancer ovarien (AcM 90 Y-HMFG-1/cible les motifs antigéniques spécifiques présents dans les sérums des patients) [163]. D'autres études cliniques conduites avec des particules α (*i.e.* 213 Bi et 211 At) dans les traitements du mélanome (213 Bi-9.2.27/ cible le glial-antigen-2) ou du cancer du cerveau (211 At-ch81C6/cible la Tenascine) ont permis des rémissions partielles dans 10 à 14 % des cas avec des toxicités tolérables[160].

Bien que la RIT ait démontré son efficacité dans le cas des cancers hématologiques, avec l'obtention de taux de réponses plus élevés que ceux observés avec les AcMs non radiomarqués, son utilisation demeure cependant très limitée dans le cas du traitement des tumeurs solides du fait de plusieurs inconvénients majeurs. En effet, d'une part les AcMs radiomarqués diffusent lentement au sein des tumeurs solides, ce qui peut engendrer des phénomènes de radiorésistance, et d'autre part, ils ont une clairance lente (plusieurs jours) ce qui est source de toxicités hématologiques (i.e. leucopénies, thrombopénies ou érythropénies). A cela, s'ajoutent des contraintes pratiques liées au coût du traitement, aux mesures de radioprotection vis-à-vis du personnel soignant ainsi que la gestion des déchets radioactifs, ce qui restreint le nombre d'études cliniques[169].

Face à la toxicité induite par les radiations au niveau des organes non-cibles, des études de dosimétrie sont effectuées pour chaque AcM radiomarqué injecté chez l'Homme afin d'évaluer précisément les risques. La dosimétrie, est évaluée grâce à des algorithmes de calcul, définis par le comité MIRD (*Medical internal Radiation Dose*), qui permettent de déterminer les doses de radioactivité reçues par chaque organe en fonction de l'activité qui a été injectée au départ[170]. La dosimétrie, exprimée en Gray (Gy) correspond à la quantité d'énergie cédée à la matière par unité de

masse, et permet ainsi de mesurer la quantité de rayonnements ionisants absorbés par l'organisme. Un Gray correspond à un rayonnement ionisant cédant 1 joule à 1 kilo de matière (1 Gy = 1 J/kg de matière irradiée). Afin d'obtenir un effet thérapeutique, la quantité d'énergie absorbée par la(les) tumeur(s) doit être suffisamment importante mais la dose reçue par les organes non-cibles doit quant-à-elle être la plus faible possible pour éviter d'induire des toxicités. Il est ainsi difficile d'évaluer très précisément la dosimétrie des radionucléides administrés en radiothérapie interne du fait de nombreux facteurs propres à chaque administration (*i.e.* biodistribution du radionucléide, clairance du vecteur, cible, volume des tumeurs et des organes). Des simulations Monte-Carlo GATE permettent cependant d'obtenir une représentation relativement fiable des risques encourus ainsi que des doses délivrées.[171]

III. Cibles d'intérêt pour la RIT du cancer colorectal

Certains antigènes, tels que la tétraspanine 8 ou l'antigène carcino-embryonnaire, présents ou surexprimés dans le CCR, représentent des cibles d'intérêt dans les stratégies d'immunothérapie et donc de radioimmunothérapie.

a. Tétraspanine 8

Les tétraspanines (TSPAN) constituent une famille de 34 protéines membranaires chez les mammifères et qui sont également présentes chez la drosophile et le ver *C. Elegans*. Elles sont en très grande majorité localisées au niveau membranaire et sont présentes à la surface de différents types cellulaires à des niveaux variables[172]. D'autres sont aussi des constituants des exosomes. Les tétraspanines interviennent dans les différents processus biologiques comme acteurs intégrant les signaux extracellulaires vers la cellule ou permettant les interactions entre les cellules. Certaines sont impliquées dans différents types de cancers pour leur capacité à agir sur la migration et l'invasion cellulaire. Certaines TSPAN sont des suppresseurs de métastases, tels que les CD9 ou CD82, tandis que le CD151 et la tétraspanine 8 (TSPAN8) sont pro-métastatiques[173][174]. La TSPAN8, anciennement nommée Co-029, a été identifiée comme facteur pro-tumoral dans les cellules de cancer du côlon[175] mais est également impliquée dans la diffusion métastatique du cancer du foie, de l'œsophage, du mélanome et du côlon (Figure 12)[176]. Son rôle pro-métastatique serait dû à des interactions avec les intégrines, des molécules d'adhésion cellulaire, et elle aurait également un rôle pro-angiogénique[177].

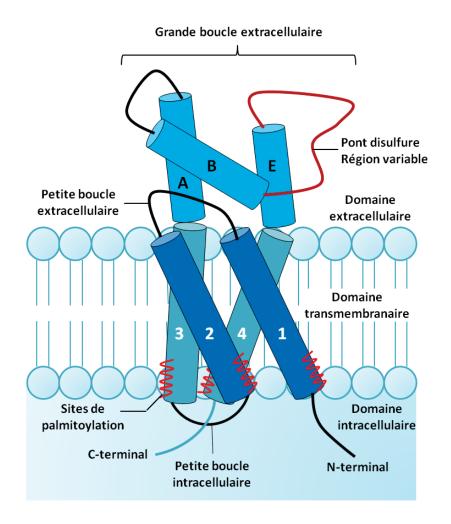


Figure 12 : Structure de la tétraspanine 8 (TSPAN8). A, B et E : domaines extracellulaires. 1-4 : domaines transmembranaires. Modifié d'après Hemler *et al.*[174]

Les propriétés de la TSPAN8 ainsi que l'accessibilité de cette protéine à des AcMs ont suscité le développement d'approches d'immunothérapie. Ainsi, le Ts29.2, un AcM dirigé contre la protéine humaine, injecté à des souris porteuses de xénogreffes de côlon HT29 induit un ralentissement modéré mais significatif de la croissance tumorale[178]. Ce même anticorps, radiomarqué avec du Lutécium-177 conduit, sur des modèles précliniques, à un allongement de la survie des souris porteuses de tumeurs HT29 associé à une réduction du volume tumoral[179]. Un autre AcM, dirigé contre le domaine EC2, permet de diminuer les capacités invasives *in vitro* et *in vivo* sur des lignées de cancers ovariens[180]. Ces observations confèrent ainsi à la TSPAN8 un statut de cible thérapeutique pour les tumeurs qui l'expriment.

b. Antigène carcino-embryonnaire

L'antigène carcino-embryonnaire (ACE) est une protéine membranaire glycosylée qui appartient à la superfamille des immunoglobulines (**Figure 13**). C'est une protéine ubiquitaire

exprimée au niveau des épithéliums du tube digestif, du côlon, de la prostate ou bien encore des glandes sudoripares. Au niveau du côlon, l'ACE est exprimé par les cellules matures au niveau supérieur des cryptes[181].

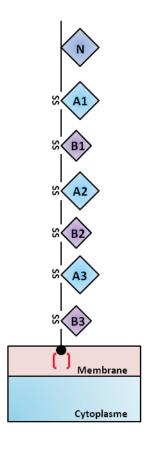


Figure 13 : Structure de l'antigène carcinoembryonnaire (ACE). N : Domaines Ig variables. A-B : Domaines Ig constants. SS : ponts disulfures. Modifié d'après Létourneau *et al.*[181]

L'ACE est ancré à la membrane par un domaine hydrophobe contenant du phosphatidyl inositol et est évacué à 90 % dans les selles, ce qui correspond à une quantité journalière de 50 à 70 mg. Son expression est faible chez le sujet sain, avec un taux sérique inférieur à 2 µg/L, mais dans les cellules cancéreuses colorectales l'ACE se retrouve surexprimé jusqu'à 60 fois, principalement au niveau de la surface membranaire. Cette importante augmentation se retrouve au niveau sérique chez 30 à 40 % des patients atteints de CCR, ce qui permet d'en faire un marqueur fiable dans le diagnostic et le suivi du CCR[181]. Cette surexpression et sa localisation ont suscité le développement d'approche de radioimmunothérapie avec des AcM radiomarqués à l'Iode-131 et différentes études cliniques de phase I/II ciblant l'ACE montrent également des efficacités modestes[163]. De nouveaux AcMs, plus spécifiques de la protéine non sécrétée et couplée à des principes actifs sont en cours de développement[182]. Le 35A7, AcM anti-ACE utilisé pendant cette thèse, a déjà montré ses capacités en préclinique dans le modèle de CP après radiomarquage avec un émetteur d'électrons Auger ou de particules alpha[183][184].

Chapitre 4: La Radioimmunothérapie préciblée

La radioimmunothérapie préciblée (PRIT) consiste à dissocier l'injection des AcMs de celle des sondes radiomarquées, en deux étapes disctinctes. Le délai entre les deux injections peut être de plusieurs jours et permet ainsi la clairance des AcMs non fixés sur les Ag tumoraux. De plus, la biodistribution rapide des sondes radioactives permet de réduire l'hématotoxicité engendrée par les AcMs directement radiomarqués. De multiples stratégies de PRIT ont ainsi été développées au cours de ces dernières décennies, allant de l'interaction avidine-biotine aux anticorps bispécifiques, en passant par les oligonucléotides ou bien encore par la chimie bioorthogonale. Chacun de ces quatres principaux systèmes sera détaillé par la suite, dans cette partie.

I. Système avidine-biotine

a. Ciblage direct

L'une des premières stratégies de préciblage développées est basée sur la très forte interaction entre la biotine et l'avidine, ou son analogue bactérien la streptavidine[185]. La biotine (connue également sous les noms de vitamine H, vitamine B7 ou coenzyme R) est une petite coenzyme de 244 kDa indispensable pour l'activité de la carboxylase et des mécanismes de transduction de l'énergie. L'avidine -que l'on retrouve à l'état naturel dans le blanc de l'œuf- et son analogue bactérien la streptavidine (produit par Streptomyces avidinii) sont des protéines tétramériques d'environ 60 kDa, chargées positivement. Les 4 monomères composant la structure de la (strept)avidine sont ainsi tous capables de fixer une molécule de biotine, une multivalence qui représente un atout dans le préciblage, permettant d'amplifier le signal au niveau de la tumeur. La liaison non-covalente qui se forme entre les deux entités ($k_d = 10^{13}-10^{15} \text{ M}^{-1}$) en fait l'une des plus fortes existantes en biologie rendant l'interaction (strept)avidine/biotine très rapide et hautement spécifique. De plus, la liaison formée entre les deux entités est hautement stable et résiste aisément aux dégradations induites par des protéases, aux fortes concentrations d'agents dénaturants mais aussi aux modifications physiologiques importantes de pH et de température[186]. La streptavidine entraîne moins de fixation non-spécifique que l'avidine. Cependant, contrairement à l'avidine, la streptavidine n'est pas glycosylée, ce qui peut induire des différences de métabolisation in vivo et notamment entraîner sa rétention au niveau hépatique[187].

La (strept)avidine non-vectorisée possède la particularité de pouvoir se lier aux lectines. Les lectines sont des protéines permettant de fixer les sucres sur les glycoprotéines et les glycolipides et sont présentes, en plus ou moins grande quantité selon le type de tissus tumoral, à la surface des

cellules cancéreuses. Ainsi, la fixation aux lectines *via* les résidus manose et *N*-acétylglucosamine, permet à la (strept)avidine de pouvoir s'accumuler dans des tissus tumoraux spécifiques, ce qui en fait un vecteur potentiel en thérapie[188]. La faisabilité de ce concept a été évaluée en 2015 par Dong *et al.* dans une étude préclinique menée sur des souris porteuses de tumeurs colorectales intrapéritonéales humaines (cellules LS180)[189]. Les animaux ont reçu dans un premier temps en i.p. 200 µg d'avidine suivi 4 h après par une injection i.v. de 185 kBq de biotine-PEG₄-lys(Cy5.5)-HYNIC-^{99m}Tc, une sonde multimodale permettant de réaliser à la fois des imageries optiques et scintigraphiques (**Figure 14**). Le pourcentage d'activité injectée par gramme de tumeurs (% d'Al/g) est d'environ 13 % à 2 h post-injection (p.i.) de la sonde biotine-PEG₄-lys(Cy5.5)-HYNIC-^{99m}Tc, démontrant ainsi une fixation spécifique de l'avidine sur les tumeurs coliques. Cependant, une importante fixation rénale, au-delà de 120 %, est néanmoins observée après l'injection de cette sonde, questionnant ainsi sur la toxicité associée à cette méthodologie.

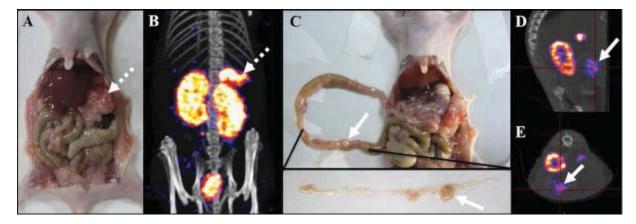


Figure 14 : Biodistributions du radioligand biotine-PEG₄-lys(Cy5.5)-HYNIC-^{99m}Tc dans un modèle de souris porteuses de tumeurs colorectales LS180 disséminées dans le péritoine. (A-C) Localisations *ex-vivo* des tumeurs péritonéales. (B-D-E) Imageries SPECT-CT. Les flèches blanches montrent la localisation des tumeurs. Reproduit d'après Dong *et al*.[189]

b. Ciblage indirect

Depuis la toute première évaluation du système (strept)avidine/biotine, différentes approches de préciblage utilisant un AcM comme vecteur ont été testées afin de trouver la configuration optimale (Figure 15)[186]. Ainsi, la première stratégie consistait à utiliser d'un côté un AcM porteur d'une biotine et une streptavidine radiomarquée de l'autre (Figure 15.a) mais elle a finalement été abandonnée en raison de deux inconvénients majeurs : le risque d'interaction non négligeable de la (strept)avidine avec la biotine endogène et la très lente circulation systémique du tétramère alors que le préciblage requiert une distribution rapide du radioligand.

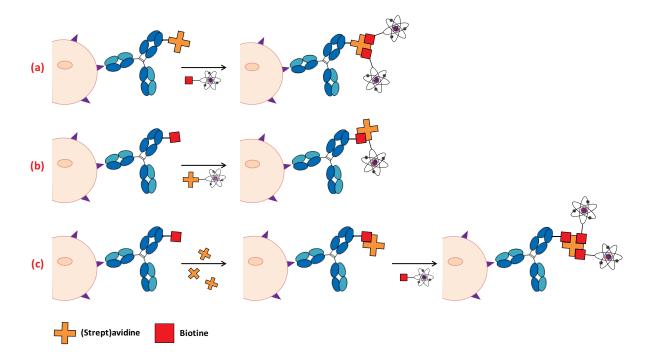


Figure 15: Les trois stratégies de préciblage par interaction non-covalente (strept)avidine/biotine. (a) Stratégie en deux étapes : 1- injection d'un AcM-(strept)avidine, 2- injection de biotine radiomarquée. (b) Stratégie inverse en deux étapes : 1- injection d'un AcM-biotine, 2- injection de (strept)avidine radiomarquée. (c) Stratégie en 3 étapes : 1-Injection d'un AcM-biotine, 2- Injection de (strept)avidine, 3- Injection de biotine radiomarquée. Cette approche peut être complétée par une ou deux étapes de clairance entre les étapes 1-2 et 2-3.

La seconde stratégie développée visait à faire l'inverse, à savoir utiliser d'un côté un AcM couplé à une streptavidine et de l'autre une biotine radiomarquée (Figure 15.b). Ainsi, dans leur étude pionnière, Hnatowitch *et al.* démontrèrent qu'une injection intraveineuse (i.v.) d'AcM-(strept)avidine suivie par l'injection de sondes biotines radiomarquées était plus efficace que la procédure inverse[185]. Cependant, les AcM-(strept)avidine peuvent se lier à la biotine endogène, et la saturation des sites de la (strept)avidine peut réduire l'efficacité du préciblage. Une étude préclinique a été réalisée en 2011 chez la souris, dans un modèle de xénogreffe de leucémie humaine (cellules HEL), afin d'évaluer la faisabilité de cette approche[190]. Les animaux ont préalablement été soumis, pendant 5 jours, à un régime pauvre en biotine afin de réduire les risques de fixation non spécifique de l'AcM-avidine. L'étude de biodistribution a ainsi montré une liaison rapide des biotine-DOTA-²¹³Bi et biotine-DOTA-⁹⁰Y environ 45 min après injection avec un % d'Al/g mesuré entre 5 et 10 % dans les tumeurs (pourcentage variant selon le type de radionucléide utilisé: 10 % pour un marquage à l'Yttrium-90, 5 % avec du Bismuth-213) (Figure 16) et qui se maintient pendant 72 h. Un fort % d'Al (3-5 %) a néanmoins été retrouvé principalement dans le sang et les reins mais aussi dans d'autres organes d'élimination tels que le foie et les poumons.

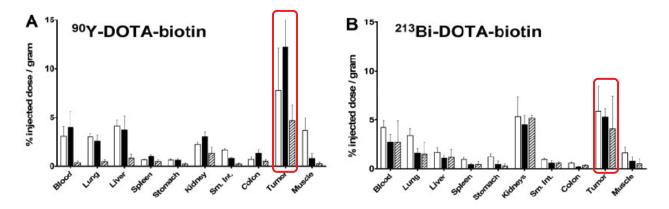


Figure 16: Biodistributions des biotines-DOTA-⁹⁰Y (A) et DOTA-²¹³Bi (B) chez des souris porteuses de tumeurs HEL préciblées avec l'AcM BC8-Streptavidine. Les encadrés rouges montrent les % d'Al/g obtenues dans les tumeurs. Blanc: 10 min; noir: 45 min et rayé: 90 min après injection des conjugués. Reproduit d'après Pagel et al.[190]

Des études de biodistribution (¹¹¹In) et de thérapie (⁹⁰Y) ont été effectuées avec des fragments scFv anti-CD20 fusionnés à des séquences streptavidine et caractérisés par des affinités différentes envers la biotine sur des souris porteuses de xénogreffes de lymphomes non-Hodgkinien (cellules RAMOS)[191]. Un % d'Al de 5 à 6 % a été mesuré dans les tumeurs pour les scFv-(strept)avidine modifiés *vs* 2 % pour les scFv-(strept)avidine non modifiés. L'étude de thérapie a corroboré ces données avec une réduction des volumes tumoraux d'un facteur 5 pour le meilleur Scv-(strept)avidine.

Enfin, la dernière stratégie proposée s'effectue en trois, quatre ou cinq étapes (Figure 15.c). En premier lieu un AcM biotinylé est injecté, suivi quelques heures après par une injection de (strept)avidine. Dans ce cas, la (strept)avidine va servir à la fois d'agent de clairance pour éliminer la biotine endogène et à la fois à se fixer sur l'AcM-biotine. Après un délai permettant la clairance de la (strept)avidine circulante, une biotine radiomarquée est à son tour injectée dans le but d'aller se fixer au complexe AcM-biotine-(Strept)avidine. Dans la variante à 4 étapes, l'injection d'avidine est suivie 24 h plus tard par une injection de streptavidine. La streptavidine ayant une demi-vie plus longue que l'avidine, celle-ci va donc se lier à l'AcM-biotine fixée sur le site tumoral tandis que l'avidine aura servi d'agent de clairance des AcM-biotine en excès circulants dans le sang[192]. Concernant l'approche en 5 étapes, l'injection de streptavidine est suivie quelques heures après par celle de biotine couplée à de l'albumine et comporte plusieurs étapes de clairance.

Malgré les succès obtenus dans les différentes études cliniques, la forte augmentation des taux d'anticorps humains anti-(strept)avidine observée chez les patients traités démontre une réaction immunitaire conséquente et associée à une importante morbidité. L'immunogénicité

engendrée par la (stretpt)avidine est ainsi un facteur limitant pour la généralisation de l'approche (strept)avidine/biotine en clinique.

II. Anticorps bispécifiques

La seconde approche de préciblage, développée quelques mois après celle du couple (Strept)avidine/biotine, repose sur l'utilisation d'anticorps bispécifiques (bsAcs) modifiés pour fixer d'un côté les Ag tumoraux et de l'autre un haptène radiomarqué[193].

Dans les premières évaluations de la PRIT utilisant des bsAcs, la sonde radiomarquée était reliée à un haptène. Des problèmes d'affinité du fragment Fab anti-haptène se sont alors posés selon le radioélément utilisé, ce qui a eu pour conséquence de fortement limiter les possibilités de cette approche[194]. Pour gagner en modularité, les haptènes ont par la suite été reliés à une séquence histamine-succinyl-glycine (HSG) (Figure 17)[195].

Figure 17 : Structure du ligand HSG-haptène divalent. M* : métal radioactif. D'après Janevik-Ivanovska *et al.*[195]

Une variante a consisté à utiliser d'un côté les bsAcs et de l'autre des sondes radiomarquées bivalentes permettant ainsi de lier deux bsAcs adjacents sur la tumeur. Des études d'imageries et de biodistributions ont été menées chez des souris porteuses de tumeurs NU-12, implantées en souscutanées et exprimant l'Ag renal cell carcinoma (RCC), préciblées avec un bsAcs anti RCC × anti- acide diethylènetriamine pentaacétique (DTPA)[196].

Les auteurs ont ainsi montré un % Al/g de tumeur supérieur à 50 % 1 h post injection (p.i.) de la sonde radiomarquée bivalente (i.e. diDTPA-111In) tandis qu'avec la sonde monovalente DTPA-111In un % Al/g inférieur à 10 % 1 h p.i. a été obtenu. Comparé au DTPA-111 In la sonde bivalente a montré une accumulation rapide dans la tumeur (78 % d'Al/g à 4 h p.i.) atteignant son maximum autour de 90 % à 72 h p.i. avec des ratios tumeur/sang favorables (3500)[196]. Une seconde étude a été menée chez des souris porteuses de xénogreffes colorectales LS174T préciblées avec un bsAcs anti-ACE × anti-DTPA et traitées avec du diDTPA radiomarqué à l'iode-131[197]. Une incrémentation de dose, de 75 à 112 MBq, a été effectuée afin d'évaluer le potentiel thérapeutique du diDTPA-131. Les auteurs ont ainsi démontré qu'en RIT conventionnelle -injection d'un bsAcs directement radiomarqué à l'131Iune forte toxicité corrélée à une importante mortalité était observée, tandis qu'en préciblage avec les sondes diDTPA-131, les animaux ont pu tolérer une dose maximale de 96 MBq sans toxicité hématologique fatale, avec un tiers d'entre eux en rémission totale. Enfin, une étude clinique de phase I utilisant des bsAcs anti-ACE hMN14 × m734 et du diDTPA-131 menée sur des patients atteints de différents types de cancer (côlon, rectum, poumons, plèvre ou carcinome médullaire de la thyroïde)[198] montre une réponse plus favorable avec un délai de 5 jours entre l'injection de l'AcM et celle du radioligand. (Figure 18). Cette approche donne ainsi des résultats très encourageants pour les patients porteurs d'un cancer médullaire de la thyroïde.

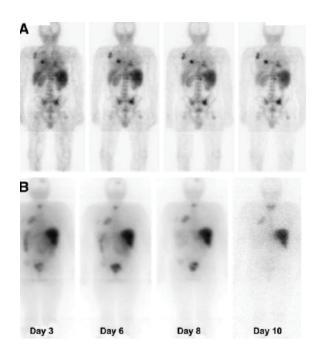


Figure 18 : Suivi de la distribution du di-DTPA-¹³¹l chez des patients atteints soit (A) de cancer médullaire de la thyroïde soit (B) de carcinome pulmonaire à petites cellules par imagerie scintigraphique réalisées sur plusieurs jours. Reproduit d'après Kraeber-Bodéré *et al*.[198].

Bien que cette étude démontre chez l'Homme l'efficacité des sondes radiomarquées bivalentes pour le préciblage par bsAcs, elle met également en évidence la nécessité d'optimisation de ce système de préciblage, notamment au niveau de l'ingénierie des bsAcs.

Une dernière approche, probablement la plus prometteuse, a été évaluée avec la mise au point du système dock and lock, aboutissant à la formation d'un bsAcs trivalent[199]. Cette entité est formée via une liaison non-covalente entre le domaine de dimérisation et de docking (DDD) du complexe AMPc et celui du domaine d'ancrage de la protéine kinase A (AD) par la formation de ponts disulfures entre les résidus cystéines. La liaison de la séquence DDD induit une dimérisation spontanée qui donne un fragment Fab divalent. La séquence AD est par la suite liée à un fragment Fab anti-haptène donnant un bsAcs trivalent. Ainsi, deux fragments Fab sont dirigés contre les Ag tumoraux tandis qu'un troisième est capable de fixer un HSG-haptène. La modularité apportée par les groupements HSG liés aux haptènes permet l'ajout d'une grande variété de chélateurs et de groupements prosthétiques différents pour former aussi bien des sondes radiomarquées monovalentes que bivalentes[200]. Une preuve de concept préclinique a ainsi été effectuée sur des souris porteuses de tumeurs MDA-MB-468[201]. Les cellules tumorales ont dans un premier temps été ciblées avec un bsAcs anti-Trop-2 × anti-HSG (TF12) puis 16 h après avec un HSG-haptène divalent, IMP228-111 In. Malgré l'obtention d'une faible internalisation du TF12, 10 à 15 % d'Al/g a été mesurée dans les tumeurs avec des ratios tumeur-sur-sang allant jusqu'à 1000 pour 1. Diverses études d'imagerie ciblant l'Ag TROP-2 (i.e. glycoprotéine surexprimées dans différents cancers) effectuées avec le TF12 et l'IMP228-111 nou de l'IMP228-DOTA-68 Ga dans le proche infrarouge ont montré de bons résultats en termes de biodistribution sur les modèles précliniques de prostate[151]. Enfin, une étude de survie menée sur des souris greffées avec des cellules de prostate PC3 (cible l'Ag Trop-2/épithélial glycoprotéine 1) a démontré l'efficacité thérapeutique du TF12 associé au ligand IMP228-¹⁷⁷Lu induisant une augmentation significative de la médiane de survie (90 vs 67 jours) [202]. En revanche, aucune amélioration thérapeutique n'a été observée en comparaison avec la RIT conventionnelle (survies et toxicités hématologiques similaires).

Une première évaluation clinique (phase I) a été effectuée en 2013 sur le préciblage avec le TF2, un bsAcs humanisé trivalent anti-ACE CAM5 × anti-HSG et le radioligand IMP288-¹⁷⁷Lu pour des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique inéligibles aux thérapies conventionnelles[203]. L'intervalle de 5 jours entre l'injection du bsAcs et celle du radiopeptide effectuée dans la première cohorte de test a montré une rapide clairance du TF2 chez l'Homme impliquant de réduire l'intervalle d'injection à 24 h pour la seconde cohorte testée. Une importante toxicité hématologique a néanmoins été retrouvée à des doses élevées. En revanche, pour des doses comprises entre 2,5 et 7,4 GBq la PRIT TF2/IMP288-¹⁷⁷Lu s'est avérée peu toxique. L'injection d'HSG pouvant

potentiellement induire des réactions allergiques, une injection préalable d'antihistaminiques et de corticostéroïdes a été effectuée chez les patients traités. La PRIT TF2/IMP288-¹⁷⁷Lu a montré une fixation rapide et spécifique au niveau tumoral (maximum à 6 h p.i. du ligand radiomarqué) mais son efficacité thérapeutique reste encore à démontrer. De plus, des anticorps anti-TF2 ont été retrouvés chez plus de la moitié des patients traités démontrant une potentielle immunogénicité du traitement.

En vue d'optimiser les délais d'injection ainsi que les doses de TF2 et de ligand IMP288 à injecter, une étude clinique de phase I a été menée sur des patients atteints de cancer des poumons métastatiques exprimant l'ACE[204]. Ainsi, un court délai entre les injections de TF2 et de radioligand (24 h) associé à de fortes doses molaires de TF2 sont apparus comme les paramètres les plus favorables pour la PRIT. De plus, une faible toxicité a été observée et les auteurs ont mis en évidence la possibilité d'effectuer plusieurs traitements successifs en vue d'améliorer l'efficacité thérapeutique. Enfin, la faisabilité du préciblage TF2/IMP288-⁶⁸Ga a été récemment démontrée en clinique pour l'imagerie scintigraphique de patients souffrant de carcinomes médullaires de la thyroïde (Figure 19)[205],[206].

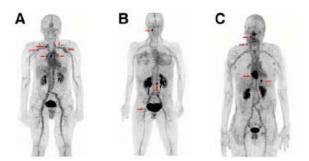


Figure 19 : Acquisitions TEP du préciblage TF2/IMP288-⁶⁸Ga chez différents patients (A, B et C) atteints de cancer médullaires de la thyroïde. Reproduit d'après Bodet-Milin *et al.*[205]

III. Oligonucléotides

Une autre stratégie de préciblage repose sur la complémentarité des bases nucléotidiques. Les bases de l'ADN et de l'ARN étant soumises à l'action de dégradation des nucléases, des analogues synthétiques résistants aux nucléases, tels que les oligomères morpholino phosphorodiamidate (MORFs) ou les acides peptido-nucléiques (PNAs), ont été développés pour le préciblage[207]. Ainsi, les oligomères de synthèse MORFs sont composés d'un squelette morpholino phosphorodiamidate qui remplace le motif (désoxy)ribose-phosphodiester présent dans l'ADN et l'ARN (Figure 20). Cette substitution les rend non-seulement inertes vis-à-vis des endo et exo-nucléases mais leur confère également une excellente stabilité chimique et solubilité aqueuse[207].

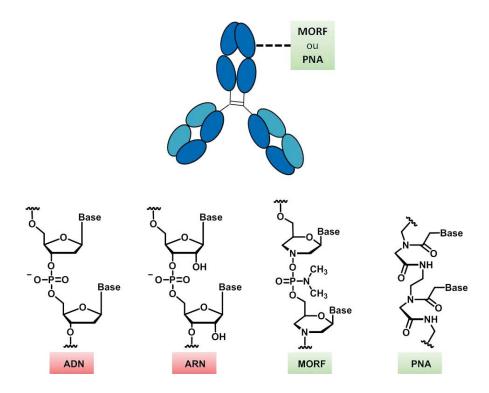


Figure 20 : Structures de l'ADN, de l'ARN et des dérivés d'oligonucléotides MORF et PNA. Modifié d'après Altai et al.[208]

Une première étude de préciblage utilisant des MORFs a été menée en 2002 sur des souris porteuses de tumeurs LS174T[209]. Ainsi, un 18-mer MORF a été conjugué chimiquement sur un AcM anti-ACE (MN14) tandis que le 18-mer MORFc a été conjugué avec du *N*-hydroxysuccinimide-mercaptoacétyltriglycine (MAG₃) afin d'être radiomarqué au ^{99m}Tc. La biodistribution du radioligand, évaluée par l'injection de 7,4 MBq de MORFc-MAG₃-^{99m}Tc 48 h après l'injection de 50 µg de MN14-MORF, a montré une rapide élimination rénale du radioligand MORFc-MAG₃-^{99m}Tc ainsi qu'un % d'Al/g dans les tumeurs de l'ordre de 2 %. Ces données ont été corroborées par un suivi en imagerie gamma notamment au niveau tumoral (**Figure 21**).

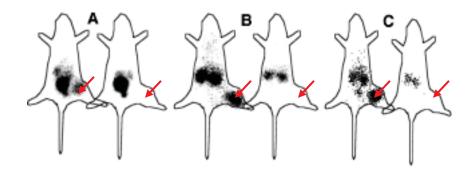


Figure 21: Imageries gamma du préciblage MN14/MORFc-MAG₃-99mTc sur des souris porteuses de xénogreffes sous-cutanées LS174T. (A) 3 h p.i. du radioligand. (B) 3 h p.i. après retrait de l'urine et (C) 24 h p.i. du radioligand. Les flèches rouges indiquent l'endroit où se trouve la tumeur. Les souris portant des tumeurs exprimant la protéine MN14 sont situées à gauche, celles portant des tumeurs n'exprimant pas MN14 sont à droite. Reproduit d'après Liu et al.[209]

Par la suite, les auteurs ont mis au point avec succès, dans le même modèle, des MORFs-MAG₃ bivalents (**Figure 22**) et radiomarqués au ^{99m}Tc avec un % Al dans les tumeurs supérieur à celui mesuré auparavant avec des MORFs monovalents (3,64 *vs* 1,65 %)[210]. En 2011, la même équipe rapporte une étude de préciblage avec des MORFs couplés à des AcMs anti-CC49 et des radioligands MORFc-DOTA-⁹⁰Y[211]. La biodistribution montre un % d'Al dans les tumeurs supérieur à celui obtenu dans l'étude précédente (13,1 *vs* 3,64 %) et des ratios tumeur/sang supérieurs à 25 pour 1. L'utilisation de structures MORF bivalentes et dendrimériques est actuellement en cours d'étude pour tenter d'amplifier le signal dans les tumeurs[212] (**Figure 22**). Pourtant, à notre connaissance, aucune autre publication décrivant ces structures n'est parue ultérieurement dans la littérature.

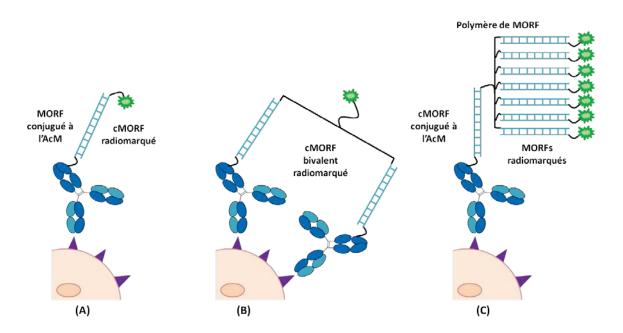


Figure 22: Les trois stratégies de préciblage utilisant des Morpholinos (MORFs) actuellement en cours de développement. (A) Approche de PRIT classique en deux temps par interaction MORF/MORFc. (B) Utilisation de MORFc bivalents radiomarqués. (C) Amplification du signal *via* des sondes MORFs dendrimériques. Modifié d'après Liu et Hnatowich.[212]

Concernant les PNAs, les bases azotées sont conjuguées à un pseudo-peptide constitué de motifs *N*-(2-aminoéthyl)glycine répétés et reliés par des liaisons amides résultant en une molécule flexible, non-chirale et non chargée (**Figure 20**). Leurs propriétés intrinsèques en font de bons candidats pour l'imagerie moléculaire ou le ciblage de séquences d'ARNm. Ainsi, la preuve de concept de l'hybridation *in vivo* des PNAs a été effectuée en 1997 par l'équipe de Hnatowich[213]. Cette approche a finalement été démontrée avec succès en 2015 en termes d'imagerie sur des tumeurs A431 (carcinome épidermoïde humain) avec une étape d'élimination par des agents de clairance (**Figure 23**)[214]. Malgré des résultats encourageants, la PRIT à base d'oligonucléotides nécessite encore de nombreuses optimisations avant de pouvoir envisager un transfert clinique.

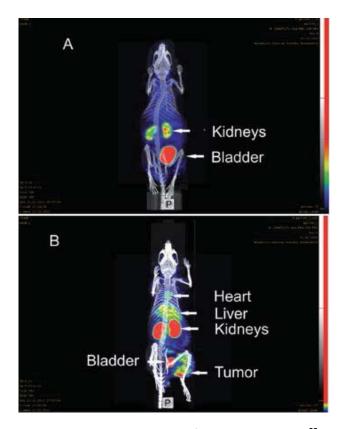


Figure 23 : Aquisitions SPECT-CT du préciblage cetuximab/PNA-PEG₁₀-Cys-Dpa-^{99m}Tc sur des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées A431. (A) 1 h p.i. du radiotraceur. (B) 1 h p.i. du radiotraceur, le PNA-PEG₁₀-Cys-Dpa-^{99m}Tc ayant été administré 24 h après l'injection d'un agent de clairance. Reproduit d'après Leonidova *et al.*[214]

IV. De la chimie « click » à la chimie bioorthogonale

En 2001, Kolb, Finn et Sharpless ont défini pour la première fois le terme de chimie « click » qui désigne une réaction dont les caractéristiques, retranscrites ici de façon littérale sont les suivantes: « The reaction must be modular, wide in scope, give very high yields, generate only inoffensive byproducts that can be removed by nonchromatographic methods, and be stereospecific

(but not necessarily enantioselective). The required process characteristics include simple reaction conditions (ideally, the process should be insensitive to oxygen and water), readily available starting materials and reagents, the use of no solvent or a solvent that is benign (such as water) or easily removed, and simple product isolation »[215]. D'après cette définition la réaction chimique développée doit être rapide, se réaliser sans solvant (excepté l'eau) et générer des sous-produits inoffensifs pouvant être éliminés aisément.

En 2009, Sleten et Bertozzi, après avoir exploré une multitude de réactions pouvant correspondre à ces critères, ont ajouté une nouvelle condition en instaurant le principe de « bioorthogonalité » qui impose en plus des autres règles de la *click* classique le fait que les molécules chimiques utilisées dans la réaction soient totalement inertes vis-à-vis des macromolécules biologiques[216]. Au cours des dernières années, une douzaine de réactions de chimie bioorthogonale ont été rapportées (**Figure 24**). Seront détaillées dans la suite de ce paragraphe dédié à la chimie *click* et à la chimie bioorthogonale uniquement les réactions les plus utilisées, à savoir la réaction de Staudinger, la cycloaddition [3+2] azoture-alcyne catalysée par le cuivre (I) (*Cu*_(I)-catalysed [3+2] azido-alkyne cycloaddition ou CuAAC), la cycloaddition azoture-alcyne non-catalysée par le cuivre (I) (*strain-promoted azide-alkyne cycloaddition* ou SPAAC) et enfin la cycloaddition de Diels-Alder à demande électronique inverse (inverse electron-demand Diels-Alder cycloaddition ou IEDDA).

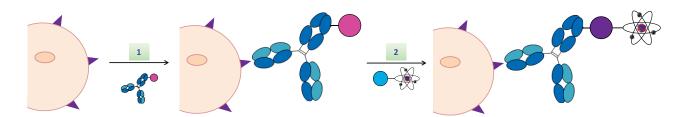
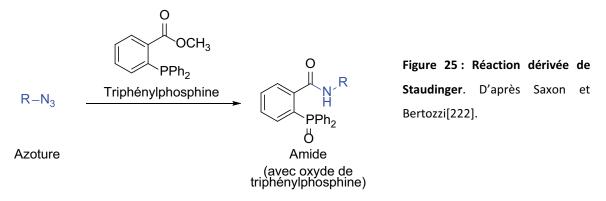


Figure 24 : Stratégie générale de préciblage par chimie bioorthogonale.

Les applications reliées à la chimie bioorthogonale sont nombreuses, aussi bien dans la chimie des polymères, le développement de nouveaux médicaments qu'en biochimie[217][218]. Cependant, l'application la plus prometteuse demeure en radioimmunothérapie, pour le développement de nouveaux radiopharmaceutiques. Effectuer de la chimie bioorthogonale sur des anticorps monoclonaux est ainsi possible, et représente un enjeu majeur dans l'exploration de thérapies ciblées tout en permettant de diminuer les risques de toxicité sanguine induits par les AcM directement radiomarqués en RIT.

a. Réaction de Staudinger

La réaction de Staudinger, décrite en 1919 par Herman Staudinger et Jules Meyer, s'effectue entre un azoture et une phosphine[219]. La réaction conduit à la formation d'un iminophosphorane couplé à un dégagement de diazote. L'iminophosphorane est un intermédiaire qui peut par la suite, s'hydrolyser pour donner une amine et un oxyde de phosphine. Ce fut la première réaction de chimie bioorthogonale étudiée dans les systèmes biologiques, permettant la formation d'une liaison irréversible[220]. Cette réaction remplit ainsi les critères de bioorthogonalité de par son interaction spécifique, son irréversibilité et sa biocompatibilité. La vitesse réactionnelle représente cependant un critère limitant la généralisation de cette approche avec une constante de l'ordre de 1,5 × 10⁻³ M⁻¹.s⁻¹ (mesurée dans un mélange acétonitrile/eau; 1/1, v/v), ce qui est très faible en vue d'applications biologiques[221]. Ainsi, différentes réactions dérivées ont été mises au point par l'équipe de Bertozzi en vue de pallier cet inconvénient. Dans la version dérivée de Saxon et Bertozzi, un piège électrophile de type ester méthylique est introduit dans la phosphine afin de former un amide, augmentant ainsi sensiblement la vitesse de la réaction (**Figure 25**)[222].



La majorité des réactions de préciblage utilisant les dérivés de Staudinger a par la suite été réalisée sur des couplages avec des protéines, de l'ADN ou des lipides via l'intermédiaire d'une biotine[220]. Une démonstration a dans un premier temps été effectuée in vitro pour la visualisation de la Cathepsine B intracellulaire. Cette observation a été rendue possible via le couplage d'un inhibiteur de la protéase cystéine Cathepsine B E64 modifié par un azoture avec une sonde P-biotine, une triphénylphosphine fonctionnalisée par de la biotine (**Figure 26**). La visualisation de Cathepsine B intracellulaire a ensuite été possible suite à l'addition d'une sonde streptavidine fluorescente[223].

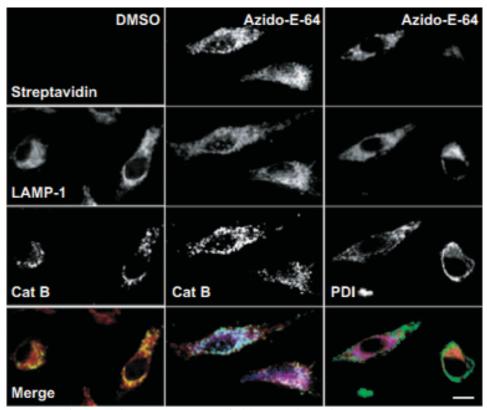


Figure 26 : Analyses d'immunofluorescence du préciblage de la Cathepsine B active dans des cellules de moelle osseuse BMMØs avec l'azoture-E64. Echelle : 10 μm. Reproduit d'après Hang et al.[223]

Les applications biologiques de ces phosphines fluorescentes concernent principalement des études *in vitro* au niveau de la détection de biomolécules[224]. Une étude a notamment permis la visualisation de glycoprotéines membranaires[225]. Les auteurs se sont ainsi basés sur la réaction entre une cétone et un azoture, l'azoture étant placé sur les récepteurs d'acide sialique ou des résidus *N*-acétylgalactosamine tandis que les phosphines sont quant-à-elles couplées à différents fluorophores (Cy5,5, fluorescéine ou rhodamine) (**Figure 27**).

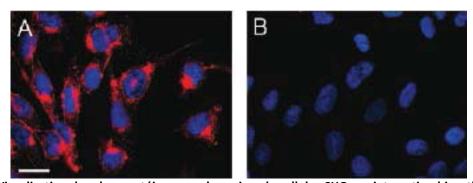


Figure 27 : Visualisation des glycoprotéines membranaires de cellules CHO par interaction bioorthogonale de Staudinger. (A) Cellules CHO préciblées avec le précurseur de l'acide sialique couplé à l'azoture suivi de la révélation avec une phosphine-Cy5,5. (B) Cellules CHO contrôles, non préciblées avec l'azoture. Bleu : coloration des noyaux au DAPI. Rouge : Cy5,5. Echelle : 20 μm. Reproduit d'après Chang et al.[225]

Dans l'optique d'optimiser cette réaction de Staudinger, une version dite « Staudinger sans traces » a été développée. La réaction s'effectue ainsi entre un phosphinothioester (ou

phosphinoester) et un azoture. Après hydrolyse de l'iminophosphorane, un groupement acyle est transféré de la phosphine au composé portant initialement l'azoture pour former une liaison peptidique entre deux molécules sans incorporation de l'oxyde de triphénylphosphine[226] (**Figure 28**).

$$R-N_{3} \xrightarrow{X = S : \text{phosphinothioester} \atop X = O : \text{phosphinoester}} XH + R \cap R' = \text{protéine, peptide, etc}$$
Azoture
$$Oxyde \ de \\ triphénylphosphine Produit final (amide)$$

Figure 28 : Réaction de « Staudinger sans traces ». D'après Saxon, Armstrong et Bertozzi[226]

Cette approche alternative a permis entre autres d'effectuer des couplages entre peptides, de marquer de l'ADN ou bien encore de déterminer les conformations structurales de protéines[220].

La cinétique trop lente des réactions de Staudinger et « Staudinger sans traces » ($i.e. \approx 1$ à 7×10^{-3} M⁻¹.s⁻¹)[220] ainsi que les risques d'oxydation des phosphines demeurent néanmoins un frein pour des applications *in vivo* telles que la PRIT et ont donc nécessité la mise au point de réactions alternatives, plus rapides.

b. Cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre (I) (CuAAC)

La cycloaddition [3+2] entre un azoture et un alcyne a été décrite en 1963 par le Pr. Huisgen (**Figure 29**)[227]. Les applications de cette cycloaddition dans les systèmes biologiques sont cependant très limitées du fait que la réaction s'effectue soit à haute température soit à pression élevée, deux pré-requis inadaptés aux études *in vivo*. Ces obstacles ont cependant pu être surmontés *via* le développement de la $Cu_{(l)}$ -catalysed azido-alkyne cycloaddition (CuAAC), ou cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre (I), publiée simultanément en 2002 par deux équipes différentes[228][229].

$$R-N_3$$
 + R' $Cu(I)$ $R-N_1$ R' Azoture Alcyne Triazole

Figure 29: Réaction de cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre (I). D'après Huisgen [227].

La CuAAC a une cinétique bien plus rapide que la réaction de Staudinger (*i.e.* $k_2 = 10^4$ M⁻¹.s⁻¹ vs 10^{-3} M⁻¹.s⁻¹) dans les conditions physiologiques de température (*i.e.* 37 °C) et à pression

atmosphérique. Cette réaction s'est ainsi avérée compatible pour une utilisation dans des systèmes biologiques, avec la possibilité de greffer les composants bioorthogonaux sur des protéines, mais ses applications *in vivo* sont restées relativement limitées en raison d'une importante toxicité induite par le cuivre (I). En effet, les cellules procaryotes et eucaryotes ne peuvent tolérer que des doses de cuivre inférieures à 500 µM conduisant ainsi à des réactions CuAAC de très faibles rendements[216]. Afin d'améliorer la biocompatibilité de la réaction CuAAC, des ligands du cuivre solubles dans l'eau ont été développés dans le but de chélater le cuivre (I) empêchant ainsi tout risque de relargage d'ions Cu (I) libres générateurs de ROS[230]. L'un de ces ligands, le tris(triazolylméthyl)amine (BTTES) a ainsi été évalué dans des embryons de Zebrafish pour l'imagerie de glycanes fucosylés et a démontré avec succès la possibilité d'effectuer la CuAAC à vitesse élevée, *in vivo* et sans toxicité apparente (**Figure 30**)[231].

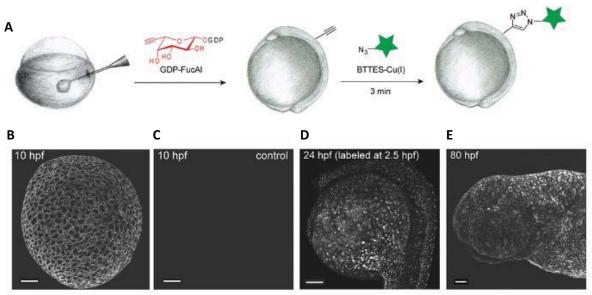


Figure 30 : Imagerie *in vivo* de glycanes fucosylés d'embryons de Zebrafish durant l'embryogénèse *via* le préciblage par réaction CuAAC-BTTES. (A) Plan expérimental, micro-injections différées de GDP-FucAl et de BTTES-Cu(I) pour le préciblage des glycanes fucosylés par CuAAC. (B-D-E) Images confocales d'embryons de Zebrafish préciblés par BTTES-CuAAC à différents stades de développement. (C) Image confocale d'un embryon contrôle non préciblé. Échelle : 100 μm. Reproduit d'après Soriano Del Amo *et al*.[231]

c. Réaction de cycloaddition [3+2] azoture-alcyne non catalysée par le cuivre (SPAAC)

La réaction de cycloaddition [3+2] azoture-alcyne non catalysée par le cuivre (SPAAC, strain-promoted [3+2] azide-alkyne cycloaddition) a été développée en 2004 par l'équipe de Bertozzi[232]. La SPAAC met en réaction des cyclooctynes contraints, beaucoup plus réactifs que des alcynes vrais, avec des azotures pour former des triazoles stables (Figure 31).

$$R-N_3$$
 + R' N N N Azoture Cyclooctyne Triazole

Figure 31 : Réaction de cycloaddition azoture-alcyne non catalysée par le cuivre (SPAAC). D'après Bertozzi.
[232]

La SPAAC est ainsi apparue comme une alternative potentielle à la CuAAC du fait qu'elle s'effectue dans les conditions physiologiques de température, de pH et sans aide de catalyseur au cuivre (I). La cinétique de réaction de la SPAAC est certes inférieure à celle de la CuAAC mais cette dernière a pu être améliorée suite à la mise au point de nouveaux analogues de cyclooctynes tels que les DIBO, DIFO ou BCN.

Actuellement, seules trois publications démontrent la faisabilité de la PRIT pour l'imagerie ou la thérapie via la réaction SPAAC. Ainsi, la première étude a été réalisée en 2013 par Lee et al. sur l'imagerie des souris porteuses de gliomes malins U87[233]. Ainsi, les cellules tumorales ont dans un premier temps été ciblées par des nanoparticules (NPs) de silice (de 100 à 150 nm), fonctionnalisées par l'ajout de chaînes PEG portant à leur extrémité du 5-(11,12-didéhydrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-yl)-5-oxopentanoate de méthyle (DIBAC). Après un délai de 24 h permettant l'accumulation des NPs dans la tumeur via l'effet EPR -la présence intra-tumorale des NPs ayant été contrôlée au préalable par imagerie optique fluorescente- 2,6 MBq d'azoture glycolique fluoropentaéthylène radiomarqué au Fluor-18 ont ensuite été injectés. Le % d'IA/g dans les tumeurs est ainsi de 1,1 %, avec un pic à 1,4 % lorsque la dose de NPs-DIBAC a été augmentée[233].

Par la suite, une seconde étude a été réalisée par van Den Bosh *et al.* utilisant d'un côté du rituximab fonctionnalisé avec des azotures et de l'autre des cyclooctynes radiomarqués et a conduit, à l'inverse de l'étude de Lee *et al.*, à l'échec de la SPAAC *in vivo*[234]. Les deux études ont cependant utilisé des conditions expérimentales totalement différentes, tant en termes d'activités injectées, que d'unités réactives greffées sur les vecteurs ou de délai entre les deux injections (24 h *vs* 5 min). De plus, les vecteurs choisis pour chacune de ces deux études ont des pharmacocinétiques totalement différentes (AcMs *vs* NPs), autant de raisons peuvent expliquer ces résultats contradictoires.

Très récemment, en 2018, une étude de thérapie a évalué l'efficacité de la SPAAC dans un modèle murin de lymphome non-Hodgkinien[235]. Ainsi, des souris xénogreffées avec des cellules Raji ont reçu une première injection de rituximab, un AcM anti-CD20, fonctionnalisé avec du dibenzylcyclooctyne (DBCO) suivie 24 h après par l'injection des sondes azotures dendrimériques conjuguées à du poly(amidoamine) (PAMAM) et radiomarquées à l'Yttrium-90.

La combinaison d'un AcM thérapeutique avec une sonde radiomarquée a ainsi démontré une amélioration significative des médianes de survie (survie au-delà de 150 jours post greffe vs 42 jours pour les non traitées) ainsi qu'une absence de croissance tumorale dans le groupe traité par rapport aux contrôles (Figure 32)[235]. Enfin, les auteurs de cette étude ont montré que la constante d'association augmentait de plus de 100 fois avec la structure dendrimérique comparé au monomère analogue (k_2 = 232 M⁻¹.s⁻¹ vs 2,1 M⁻¹.s⁻¹) démontrant ainsi l'intérêt de l'utilisation de la SPAAC dendrimérique dans les approches de préciblage.

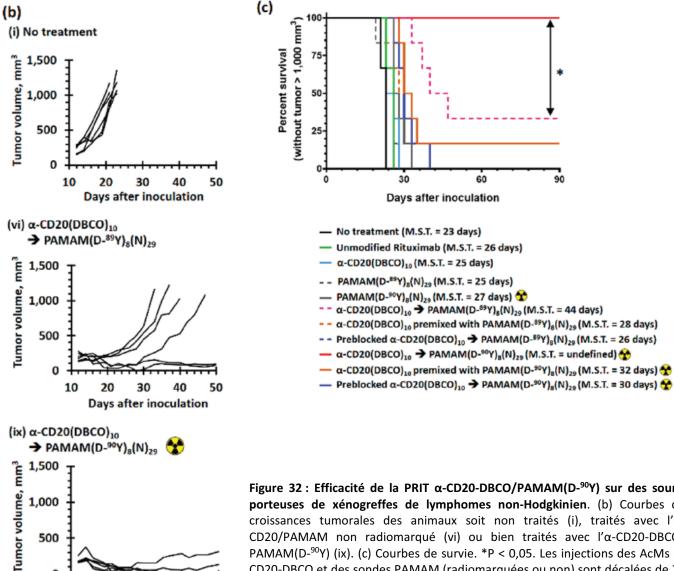


Figure 32 : Efficacité de la PRIT α-CD20-DBCO/PAMAM(D-90Y) sur des souris porteuses de xénogreffes de lymphomes non-Hodgkinien. (b) Courbes de croissances tumorales des animaux soit non traités (i), traités avec l' α -CD20/PAMAM non radiomarqué (vi) ou bien traités avec l'α-CD20-DBCO/ PAMAM(D- 90 Y) (ix). (c) Courbes de survie. *P < 0,05. Les injections des AcMs α -CD20-DBCO et des sondes PAMAM (radiomarquées ou non) sont décalées de 24 h. Reproduit d'après Au et al.[235]

50

40

1,000

500

10

20

30

Days after inoculation

d. Réaction de cycloaddition [4+2] de Diels-Alder à demande électronique inverse (IEDDA)

i. Généralités et applications pour l'imagerie du petit animal

La réaction de cycloaddition [4+2] de Diels-Alder à demande électronique inverse (IEDDA) se produit entre un diène appauvri en électron, tel que la 1,2,4,5-tétrazine (TZ), et un diénophile plus riche en électrons (alcène), principalement de type trans-cyclooctène (TCO) ou norbornène (NB) (Figure 33). Dans la majorité des publications, les TCOs ou les NBs sont greffés sur les résidus lysine des anticorps tandis que les TZ sont reliées à un agent chélatant permettant de complexer des isotopes radioactifs, principalement ceux du groupe des lanthanides. L'IEDDA s'effectue directement in vivo, de façon sélective, sans catalyseur et dans les conditions physiologiques (pH = 7,4; 37 °C). L'IEDDA se distingue des autres réactions de chimie bioorthogonales de par son excellente cinétique de réaction (i.e. k_2 de 10^3 à 10^6 M⁻¹.s⁻¹) se traduisant par une liaison TCO-TZ totale en moins de 5 min[236]. Un autre avantage de la réaction IEDDA entre les groupements TCO et TZ réside dans son adaptabilité car ce système est facilement transposable à de multiples vecteurs, aussi bien des AcMs (ou fragments d'AcMs) que des peptides, des sucres ou bien également de petites molécules[237]. C'est donc une réaction bioorthogonale robuste qui a fait l'objet de nombreuses études précliniques. Bien que très rapide et facilement transposable à divers vecteurs et sondes, l'IEDDA peut cependant être sujette à une possible isomérisation des TCO en dérivés cis-cyclooctènes (CCO), molécule certes plus stable mais chimiquement inerte vis-à-vis de la TZ.

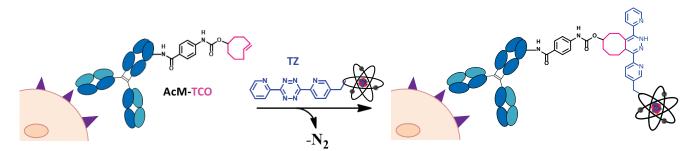


Figure 33 : Cycloaddition de Diels-Alder à demande électronique inverse entre un *trans*-cyclooctène (TCO) et une tétrazine (TZ).

La première application préclinique de la cycloaddition IEDDA a été décrite par Rossin *et al.* en 2010[238]. D'une part, un AcM CC49 anti-glycoprotéine 72 non-internalisant a été fonctionnalisé avec des TCO (environ 7,4 TCO par AcM) comportant un espaceur de type dodécaéthylène glycol (*i.e.* PEG₁₂) pour cibler des cellules de côlon LS174T implantées en sous-cutanées chez la souris (**Figure 34**). D'autre part, après un délai de 24 h, 20 à 50 MBq d'une sonde TZ conjuguée à un PEG₁₂-DOTA et radiomarquée à l'Indium-111 a été injectée à son tour (3,4 équivalents par rapport au nombre de

TCO). L'imagerie SPECT-CT des animaux, réalisée 3 h p.i. de la TZ-PEG₁₂-DOTA-¹¹¹In, a montré une rapide accumulation au niveau tumoral avec un faible % d'Al/g dans les organes non-cibles (sang, foie) associé à un ratio tumeur sur muscle de 13 pour 1.

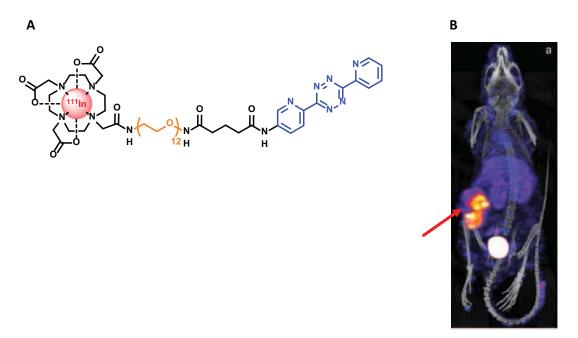


Figure 34 : Preuve de concept par imagerie SPECT-CT du préciblage de tumeurs de côlon LS174T par AcM CC49-PEG₁₂-TCO suivi 24 h après par l'injection de TZ-PEG₁₂-DOTA-¹¹¹In. (A) Structure de la TZ-PEG₁₂-DOTA-111In. (B) Imagerie SPECT-CT 3 h p.i. de la TZ-PEG₁₂-DOTA-¹¹¹In. La flèche rouge indique l'emplacement de la tumeur. Reproduit d'après Rossin *et al*.[238]

Afin d'éliminer le bruit de fond en imagerie généré par la présence d'AcM-TCO circulants, ces mêmes auteurs ont procédé à l'injection d'un agent de clairance, composé de TZ couplées à du galactose et de l'albumine sérique, 30 h avant l'injection de la TZ-PEG₁₂-DOTA-¹¹¹In. Cet agent de clairance interagit avec les AcM-TCO non fixés à la tumeur et permet de les éliminer en amont de l'injection de la sonde radiomarquée, augmentant ainsi le contraste d'imagerie[239].

En 2015 Zeglis *et al.* a effectué la preuve de concept de l'IEDDA *via* l'interaction TCO/TZ, en imagerie TEP sur un modèle de carcinome colorectal implanté en sous-cutané chez la souris[240]. Plusieurs structures de TZ ont été comparées en vue de trouver la sonde radiomarquée optimale pour ce type d'imagerie. Ainsi, le conjugué AcM huA33-TCO (≈ 5 TCO/ AcM) a été injecté en i.v., suivi 24 h après par l'injection i.v. de 10-12 MBq de TZ-NOTA-⁶⁴Cu, TZ-PEG₇-NOTA-⁶⁴Cu ou TZ-SarAr-⁶⁴Cu puis les animaux ont été imagés à différents temps p.i. (**Figure 35**).

A B

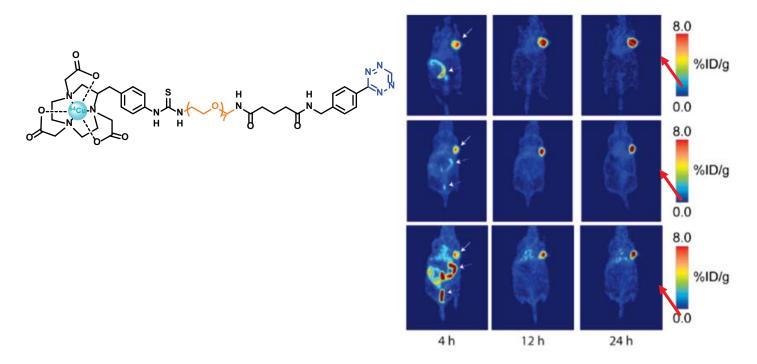


Figure 35: Imageries TEP de la TZ-PEG₇-NOTA-⁶⁴Cu sur des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées SW1222. (A) Structure de la TZ-PEG₇-NOTA-⁶⁴Cu. (B) Imageries TEP à différents temps p.i. de la TZ. Délai de 24 h entre l'injection des AcMs huA33-TCO et TZ-PEG₇-NOTA-⁶⁴Cu. Les flèches rouges indiquent l'emplacement des tumeurs. Reproduit d'après Zeglis *et al*.[240]

Ces études de biodistribution ainsi que les imageries TEP ont montré un % d'Al/g dans les tumeurs d'environ 5,6 % à 1 h p.i. associé à une rapide élimination urinaire et gastro-intestinale du radioligand. Cette dernière observation représente cependant un frein dans l'imagerie de tumeurs abdominales ou coliques, nécessitant de fait de devoir améliorer le profil pharmacocinétique de la TZ. Par la suite, la même équipe a démontré la possibilité d'utiliser l'interaction TCO/TZ pour effectuer des imageries TEP sur petit animal dans un modèle de cancer pancréatique en ciblant des antigènes sécrétés prompts à l'internalisation (*i.e.* CA19.9)[241]. Un AcM anti-CA19.9 (*i.e.* 5B1) conjugué avec des TCO a été injecté en i.v. chez des souris porteuses de tumeurs BxPC3 ou Capan-2 suivie 72 h après par celle du radioligand TZ-PEG₇-NOTA-⁶⁴Cu (≈ 15 MBq / souris) (**Figure 36**).

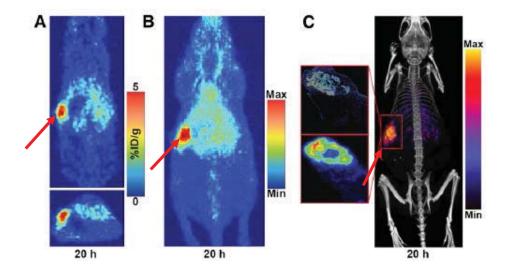


Figure 36: Imageries TEP et TEP/CT du radioligand TZ-PEG₇-NOTA-⁶⁴Cu à 20 h p.i. chez des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées Capan-2. Les TZ ont été injectées 72 h après l'administration i.v. de l'AcM 5B1-TCO. (A) Imagerie TEP en coupes axiales et longitudinales, % ID/g signifie % d'Al/g. (B) Imagerie TEP projetées aux intensités maximum et minimum. (C) TEP/CT de la même souris. (C, gauche, haut) Immunohistochimie de la tumeur. (C, gauche, bas) Autoradiographie de la tumeur. Les flèches rouges indiquent l'emplacement des tumeurs. Reproduit d'après Houghton *et al*.[241]

Les biodistributions ainsi que les imageries TEP/CT ont ainsi démontré la faisabilité de ce concept de préciblage sur des antigènes internalisant *via* l'obtention d'une fixation spécifique au niveau des tumeurs pancréatiques, avec un % d'Al/g atteignant un maximum de 8,2 % 20 h après injection de la TZ-PEG₇-NOTA-⁶⁴Cu associé à de faibles activités dans les organes non-cibles[241].

ii. Chimie-bioorthogonale inversée

Si la majorité des études publiées mettent en jeu d'un côté des AcMs-TCO et de l'autre des sondes TZ radiomarquées, la réciproque est tout à fait possible. La preuve de concept *in vitro* de cette stratégie inversée a été réalisée en 2013 avec des sondes TCO fluorescentes. Ainsi, du trastuzumab a été conjugué avec des TZ (≈ 8 TZ / AcM) tandis que les TCO ont été couplés avec de la fluorescéine ou de la cyanine3 (Cy3)[242]. Des cellules de carcinome ovarien (SKOV-3, Her2/neu positives) ont dans un premier temps été incubées 45 min avec le trastuzumab-TZ puis après lavage, traitées avec deux différentes concentrations de TCO-fluorescéines, *i.e.* 0,5 et 10 µM (Figure 37.i-iii). Même à faible concentration de la sonde TCO-fluorescéine, le signal fluorescent demeure détectable. Afin de vérifier la colocalisation de l'AcM et la liaison TZ/TCO sur les cellules, le trastuzumab a été doublement marqué à la TZ et à la fluorescéine. Après incubation des cellules SKOV-3 par l'AcM-TZ, ces dernières ont été traitées avec une sonde TCO-Cy3 (Figure 37.iv-vi). La superposition des signaux de la fluorescéine et de la Cy3 dans les images d'épifluorescence démontre à la fois la reconnaissance

spécifique des antigènes Her2/neu par la sonde AcM-TZ ainsi que la liaison spécifique TZ/TCO et donc *in fine* la faisabilité du préciblage inversé.

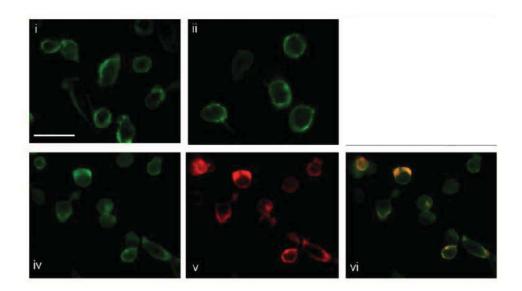


Figure 37 : Images de cellules SKOV-3 ciblées avec du trastuzumab-TZ pendant 45 min puis incubées avec les sondes TCO-Fluorescéines. Cellules SKOV-3 traitées du trastuzumab-TZ (0,005 μM) puis avec deux concentrations différentes de TCO-fluorescéine, *i.e.* 0,5 μM (i) ou 10 μM (ii) (signal vert). (iv-vi) Cellules SKOV-3 traitées avec du trastuzumab-TZ fluorescéine (iv) puis incubées avec le TCO-Cy3 (v) (signal rouge). Le signal orange montre la superposition du signal du trastuzumab-TZ-fluorescéine avec celui de l'adduit TZ-TCO-Cy3 formé. Echelle : 50 μm. reproduit d'après Maggi *et al.*[242]

Une seconde étude parue en 2017, utilisant différentes sondes TCO radiomarquées pour l'imagerie TEP vient conforter les résultats de l'équipe précédente[243]. Les différents diénophiles synthétisés ont ainsi été conjugués à un PEG₄ puis radiomarqués à du Fluor-18. Les études de biodistributions et les imageries micro-TEP effectuées avec ces structures ont été réalisées sur un modèle murin de cancer de la prostate (cellules LnCaP) avec injection dans un premier temps de l'Ag membranaire spécifique de la prostate (*prostate-specific membrane antigen* ou PSMA) conjugué à des TZ-CF₃, en intra-tumoral (i.t.), suivie 10 min après par l'injection i.v. de la sonde TCO-PEG₄-¹⁸F. Les résultats obtenus dans cette étude démontrent ainsi la possibilité de visualiser des tumeurs *via* l'interaction inversée PSMA-TZ/TCO-PEG₄-¹⁸F avec cependant un très faible pourcentage dans la tumeur (< 1 % à 2 h p.i.) associé à un bruit de fond important, d'où la nécessité d'optimiser cette approche (**Figure 38**).

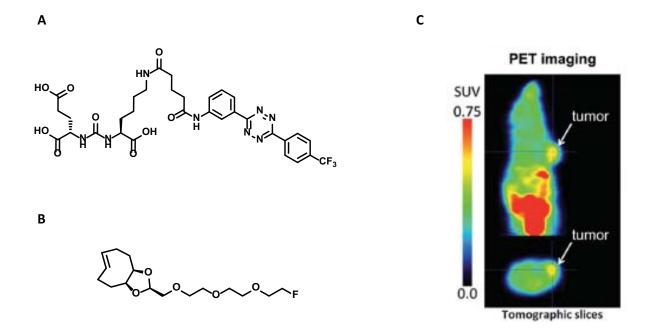


Figure 38 : Préciblage PSMA-TZ/TCO-PEG₄-¹⁸**F sur des souris porteuses de tumeurs LNCaP**. (A-B) Structures des composés bioorthogonaux PSMA-TZ (A) et TCO-PEG₄-¹⁸F (B). (C) Imageries TEP du TCO-PEG₄-¹⁸F 2 h après injection i.v. préciblées 10 min auparavant avec du PSMA-TZ. Reproduit d'après Billaud *et al.*[243]

iii. Radioimmunothérapie préciblée de tumeurs sous-cutanées

Face aux résultats encourageants obtenus en imagerie, des études de thérapie ont par la suite été réalisées chez la souris. La première étude de PRIT utilisant le système TCO/TZ a été publiée en 2017 par l'équipe de Zeglis, sur un modèle de cancer pancréatique (5B1/BxPC3) décrit précédemment dans la partie imagerie[244]. Dans cette étude, l'AcM 5B1 a été modifié par l'ajout d'environ 7,4 TCO/AcM puis injecté à raison de 200 µg par souris suivi 72 h après par l'injection de différentes doses de TZ-PEG₇-DOTA-¹⁷⁷Lu (10, 21 ou 32 MBq). Des biodistributions ont également été réalisées en parallèle avec la plus forte dose de radioligand (*i.e.* 32 MBq) et ont montré un % d'Al dans les tumeurs d'environ 20 % 120 h après injection de la sonde radiomarquée (**Figure 39**).

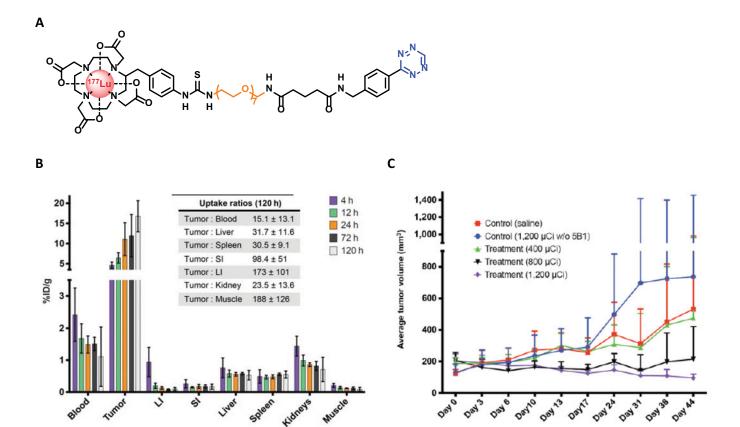
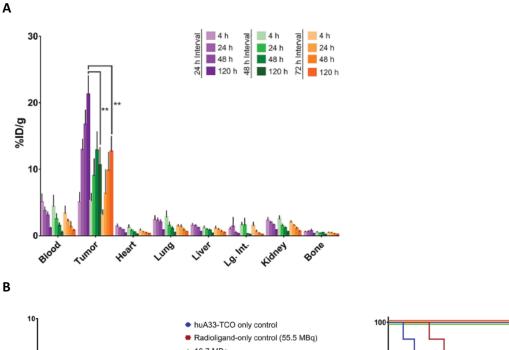


Figure 39 : PRIT de tumeurs pancréatiques sur des souris porteuses de xénogreffes BxPC3. (A) Structure de la TZ-PEG₇-DOTA-¹⁷⁷Lu. (B) Biodistributions de la TZ-PEG₇-DOTA-¹⁷⁷Lu injectée en i.v. à 32 MBq 72 h après injection i.v. du 5B1-TCO. (C) Courbes de croissances tumorales de l'étude de thérapie. Les souris ont reçues 200 μg de 5B1-TCO suivi 72 h par 10, 21 ou 32 MBq de TZ-PEG₇-DOTA-¹⁷⁷Lu. Reproduit d'après Houghton *et al.*[244]

Cette même équipe a par la suite publié une étude de biodistribution et thérapie sur un modèle de xénogreffe de cancer colorectal SW1222 implanté en sous-cutané utilisant un AcM huA33-TCO (≈ 7,4 TCO/AcM) et la TZ-DOTA-PEG₇-¹⁷⁷Lu décrite ci-dessus. Les auteurs ont démontré qu'un intervalle de 24 h entre l'administration de l'AcM-TCO et celle du radioligand donnait un % d'Al/g de tumeur (*i.e.* 21,2 % à 120 h p.i.) significativement plus élevé qu'avec les délais d'injection plus longs (*i.e.* 48 h et 72 h). (**Figure 40.A**). Dans l'approche thérapeutique, les souris ont reçu 18,7, 37 ou 55,5 MBq de TZ-PEG₇-DOTA-¹⁷⁷Lu 24 h après une première injection de 100 µg d'huA33-TCO. Ce protocole induit une diminution spectaculaire de la taille des tumeurs dans les trois groupes traités associée à une augmentation significative de la survie par rapport aux groupes contrôles (**Figure 40.B**).



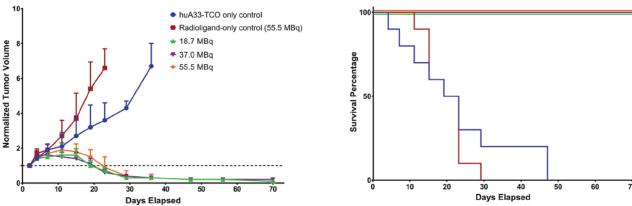


Figure 40 : (A) Biodistributions de la TZ-PEG₇-DOTA-¹⁷⁷Lu à différents intervalles d'injection par rapport au huA33-TCO. (B) Courbes de croissance tumorale et de survie Kaplan-Meier correspondantes. Reproduit d'après Membreno *et al.*[245]

L'utilisation de radionucléides émetteurs de particules alpha est en pleine expansion en médecine nucléaire et vient d'être récemment testée dans la PRIT utilisant la chimie bioorthogonale. En effet, une étude réalisée sur des souris porteuses d'un carcinome colorectal implanté en souscutané (cellules LS174T) a démontré l'efficacité de la PRIT CC49-TCO/TZ-PEG₁₀-DOTA-²¹²Pb[246]. Ainsi, des activités croissantes de radioligand (*i.e.* 2,78 MBq, 2 × 2,78 MBq et 4,63 MBq) induisent un ralentissement de la croissance tumorale associée à une amélioration significative de la survie des animaux de respectivement 26, 35 et 39 jours comparé au groupe contrôle ayant reçu un placébo (médiane de survie à 20 jours) (**Figure 41**). Par ailleurs, la RIT à 0,55 MBq est associée à une importante hématotoxicité induisant une mortalité similaire à celle du groupe contrôle. Cette étude prouve donc l'intérêt de la PRIT par rapport à la RIT en termes de réduction de la croissance tumorale, d'amélioration de la survie et de limitation de l'hématotoxicité.

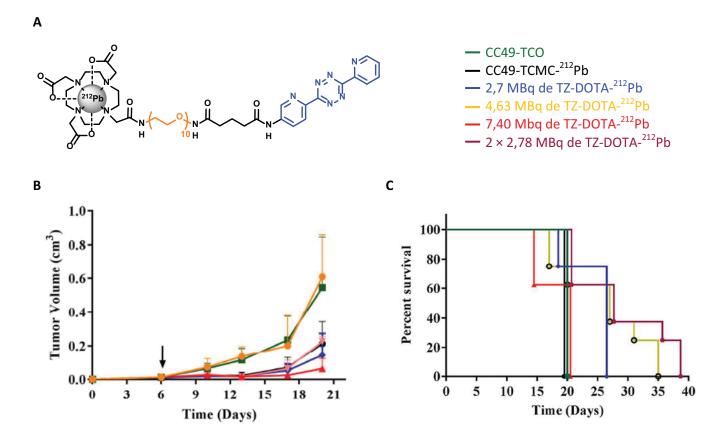


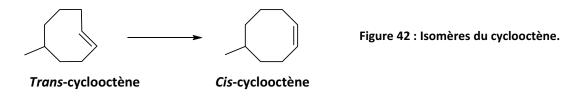
Figure 41 : Alpha-PRIT de tumeurs colorectales implantées en sous-cutanées chez la souris par interaction CC49-TCO/TZ-DOTA-²¹²Pb. (A) Structure de la TZ-DOTA-²¹²Pb. (B) Courbes de croissance tumorale. La flèche noire indique le jour du traitement. (C) Courbes de survie Kaplan-Meier. Légende identique entre (B) et (C). Reproduit d'après Shah *et al*.[246]

iv. Stabilité et réactivité des composants bioorthogonaux

Le greffage des unités TCO (ou TZ), sous forme d'ester activité NHS, sur les AcMs est réalisé sur les chaînes latérales amines des résidus lysines selon une réaction de type substitution nucléophile. Ce couplage aux résidus lysines situés aussi bien sur la partie variable que constante est non sélectif, ce qui peut conduire à modifier l'affinité de l'AcM pour son antigène, diminuant *in fine* l'efficacité de la PRIT. La spectrométrie de masse MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of flight*), permet de déterminer le nombre moyen de TCO greffés par AcM tandis que des analyses par cytométrie en flux quantitative, permettent notamment de vérifier l'affinité de ces AcMs modifiés pour leurs cibles. Ces contrôles doivent être réalisés préalablement à chaque expérience afin de vérifier la stœchiométrie de la réaction engagée, du moins pour la partie concernant l'anticorps. Une méthode alternative de couplage AcM/TCO a été décrite en 2008 permettant de conjuguer les TCO à des endroits spécifiques sur l'AcMs. Cette approche consiste ainsi à modifier les AcMs en substituant des acides aminés spécifiques par des résidus cystéines, aboutissant ainsi à des THIOmab™[247]. La preuve de concept de cette approche a été réalisée récemment chez la souris pour l'imagerie SPECT de cancer du sein avec d'un côté un THIOmab anti-

Her2/neu conjugué à un nombre variable de TCO-PEG₃-maléimide (*i.e.* 2, 4 ou 6 résidus) et de l'autre côté une TZ-DOTA-¹¹¹In[248]. Les résultats encourageants obtenus dans cette étude laissent envisager que le contrôle des sites de conjugaison pourrait être une stratégie potentielle dans l'optimisation de la PRIT.

Un autre paramètre important concerne la fonctionnalité des TCO. Une fois ceux-ci couplés sur les AcMs il devient impossible d'évaluer de façon absolue s'ils sont encore réactifs envers la TZ. Les dérivés du *trans*-cyclooctène TCO sont obtenus initialement par conversion photochimique de dérivé *cis*-cyclooctène (CCO) et sont stables dans le temps lorsqu'ils sont stockés à – 20 °C[249]. En revanche, une fois exposés à la lumière ou à une source de chaleur, le TCO s'isomérise alors en CCO, qui est quant-à-lui non réactif envers la TZ (**Figure 42**).



En 2013, Rossin *et al.* ont étudié, *in vitro* et *in vivo* au sein du modèle CC49/LS174T, à la fois l'influence de la longueur de l'espaceur PEG dans le conjugué AcM-TCO ainsi que l'influence de la conformation du TCO (*trans*cycloocténol avec l'hydroxyle en position équatoriale *vs* axiale) sur la réactivité TCO/TZ. Ils ont ainsi tout d'abord constaté une importante isomérisation des TCO liés par un espaceur PEG₁₂ aux AcMs dans les 72 h après injection, comparé aux conjugués non-PEGylés. Cette isomérisation serait corrélée à une réaction croisée avec des métaux de transition tels que le cuivre (II) présent dans des protéines du sérum[239]. Concernant les conjugués AcM-TCO non-PEGylés, leur stabilité résulterait de l'encombrement généré par l'AcM qui empêcherait de fait l'interaction des TCO avec le cuivre (II) sérique. Par ailleurs, les isomères axiaux du TCO seraient jusqu'à 10 fois plus réactifs que les isomères équatoriaux vis-à-vis des TZ (**Figure 43**).

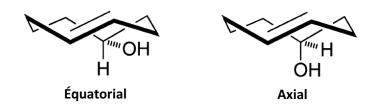


Figure 43 : Isomères axiaux et équatoriaux du trans-cycloocténol. D'après Rossin et al. [239]

Une étude contradictoire, parue en 2015, a démontré que l'inactivation des TCO n'était pas induite par l'isomérisation *trans-cis* ou par un encombrement stérique à la surface de l'AcM mais plutôt par des phénomènes d'interactions hydrophobes entre ces TCO et l'AcM les rendant de ce fait

inaccessibles aux sondes TZ[250]. La PEGylation des protéines est connue pour réduire leur immunogénicité et améliorer leur solubilité sans altérer leurs propriétés pharmacodynamiques [251][252]. Les auteurs de cette étude se sont donc basés sur cette observation et ont ainsi évalué l'effet de l'ajout de chaînes PEG de différentes longueurs (i.e. PEG4 et PEG24) sur l'interaction avec les TZ. Ils ont montré dans leur modèle, que l'insertion de chaînes PEG, même courtes (i.e. PEG4), permettait d'éloigner les TCO hydrophobes de la structure de l'AcM et était par conséquent favorable à l'interaction TCO/TZ[250]. Ces études ont cependant été effectuées uniquement in vitro, en fluorescence, et sur des modèles différents de ceux de l'équipe précédente (cellules, AcMs, TZ). Face à ces dissensions, l'influence de la longueur du PEG entre l'AcM et le TCO demeure ainsi nonconsensuelle. Cependant, il est intéressant de noter que la grande majorité des études de PRIT TCO/TZ publiées par la suite ont été réalisées avec des conjugués AcMs-TCO ne contenant pas d'espaceur PEGylé.

La structure de la TZ est également un paramètre important pouvant influer sur la réactivité avec les TCO et donc *in fine* impacter l'efficacité de la PRIT. Différentes structures de TZ ont ainsi été caractérisées *in vitro* à la fois en termes d'hydrophobicité, de réactivité mais également de stabilité (PBS et sérum de souris) puis comparées *in vivo* dans des études de biodistributions[253]. Les sondes TZ les plus lipophiles ont montré une stabilité significativement moindre associée à une élimination hépatique plus importante que les sondes hydrophiles et une rétention tumorale plus faible. Une seconde étude a comparé *in vitro*, par des analyses de résonance plasmonique de surface (SPR), et *in vivo*, par imagerie SPECT-CT, l'influence de la nature des TZ, des espaceurs entre la TZ et le radionucléide ainsi que des macrocycles chélateurs[254]. Cette étude a ainsi démontré une importante corrélation entre la structure du cycle TZ et la nature de l'espaceur sur l'interaction TCO/TZ. Ainsi, une TZ liée à un phényle et reliée à un PEG (*i.e.* TZ-2) semble plus réactive qu'une TZ entourée de pyridines (*i.e.* TZ-4) et donc plus favorable à la PRIT (Figure 44).

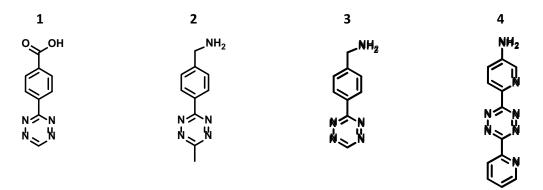


Figure 44: Structures des 4 TZ les plus décrites dans les publications portant sur la PRIT par chimie bioorthogonale. La TZ-2 est utilisée dans les études de l'équipe de Zeglis alors que la TZ-4 est notamment employée dans les études de l'équipe de Rossin et Robillard. Adapté d'après Meyer et al. [254]

V. Bilan, dernières avancées dans la PRIT et perspectives

Les quatre grands systèmes de PRIT démontrent la progression des concepts thérapeutiques pour le traitement ciblé des tumeurs solides. Si certaines de ces techniques demeurent au stade expérimental (MORFs/PNAs, chimie bioorthogonale) d'autres ont en revanche atteints avec succès le cap des études cliniques (avidine-biotine, bsAcs). La majorité des systèmes de radioimmunothérapie préciblée nécessite cependant d'être optimisée.

Le préciblage par réaction de chimie bioorthogonale représente un intérêt dans les stratégies de PRIT du fait qu'il s'affranchit des problèmes d'immunogénicité et de l'ingénierie complexe pour les MORFs, PNAs et bsAcs, tout en permettant une interaction rapide, spécifique et réalisable sans catalyseur dans les conditions physiologiques (**Tableau 12**). La vitesse de réaction (k_2) fait ainsi partie des paramètres importants à prendre en compte pour l'exploitation de ces réactions au sein des systèmes biologiques. Les réactions s'effectuant à faible vitesse, telles que la CuAAC, sont donc inadaptées pour de la PRIT (**Tableau 13**). Des réactions de cycloaddition mettant en jeu de nouveaux analogues sont régulièrement évaluées, soit par chimie computationnelle -une approche de modélisation moléculaire qui permet de prédire la réactivité de nouveaux analogues via l'utilisation de modèles mathématiques (modèles distorsion/interaction)[255][256]- soit directement par voie expérimentale.

| Stratégie de | Année de | Vitesse de | Stabilité | Spécificité | Études | |
|------------------|------------|-------------------------------------|--------------------|---------------|--------------|---|
| 1:- | 7 | réaction | <i>in vivo</i> des | | | Limitations |
| precipiage | decouverte | (M ⁻¹ .s ⁻¹) | composants | d Interaction | sanbiuio | |
| (Strept)avidine- | | | | Modérée à | Oui | Risques de dégradation de la biotine radiomarquée |
| | 1987 | $\approx 10^7$ | Élevée | | 11/100040 | Immunogénicité induite par la (strept)avidine |
| aunoin | | | | aanala | rnases I/ II | Risques de fixation à la biotine endogène |
| | | | | | | Vecteurs limités aux AcMs et formes |
| | | | | | | dérivéesd'AcMs |
| | | | | Faible sans | | Faibles % d'Al dans les tumeurs |
| hsAcs | 1988 | ≈ 10³- 10 ⁵ | ÉΙρνόρ | agent de | inO | Affinité entre l'haptène et le bsAcs dépend du |
| | 9 | 2 |) | 5 | Phases III | radiométal utilisé |
| | | | | clairance | | Risques d'immunogénicité selon la structure du |
| | | | | | | bsAcs (quadroma) |
| | | | | | | Ingénierie des bsAcs lourde et coûteuse |
| MORE | 1997 | ≈ 10 ⁴ | ÉΙρνόρ | Modérée | u ON | Modifications difficiles à faire |
|) |)) |) |) | | -) | Difficulté d'utiliser des agents de clairance |
| PNAs | 1998 | ≈ 10 ⁴ | Élevée | Modérée | Non | Mêmes limitations que les MORFs |
| | | , | | | | Faible % d'Al dans les tumeurs |
| oimid | | | | | | Risques d'isomérisation des TCO en CCO (IEDDA) |
| ט ב | 2008 | $\approx 10^{-3} - 10^{6}$ | Modérée | Élevée | Non | Synthèse des TZ difficile (rendements faibles) |
| bioorthogonale | | | | | | ■ Cinétique lente (SPAAC) |
| | | | | | | Hydrophobicité des groupements DBCO (SPAAC) |

| Réaction | Composants | Catalyseur | Vitesse de réaction (M¹.s¹) | Avantages | Inconvénients | Références |
|------------|-----------------------------|--------------|-----------------------------------|--|---|------------------------------|
| Staudinger | Azoture et Phosphine | Non | ≈ 10 ⁻³ | Liaison irréversible | Oxydation des phosphines Cinétique de réaction lente | [222, 226, 258] |
| CuAAC | Azoture et Alcyne | Oui Cu(I) | ≈ 10 - 100 | Réaction rapide | Toxicité du cuivre (I) | [228, 231] |
| SPAAC | Azoture et Alcyne | Non | ≈ 10 ⁻² - 1 | Stabilité des composants (cycloalcynes) | Réactifs envers les thiols Faible cinétique | [232] |
| IEDDA | TZ et TCO ou TZ et NB | Non | ≈1-10 ⁶ | Réaction rapide, fluorogénique, Sans catalyseur, dans les conditions de pH et de température physiologiques | Stabilité des composants (isomérisation TCO-CCO) | [236, 238, 244, 245, 259] |

En 2016, l'équipe de Rossin a décrit expérimentalement une nouvelle réaction de chimie click-to-release, nommée IEDDA par élimination pyridazine, consistant à libérer un principe actif d'un conjugué AcM-ADC lié à une tumeur[260]. Dans cette stratégie, les AcMs sont conjugués avec des TCO eux-mêmes déjà liés à un pro-médicament ou à une toxine via un linker de type carbamate. La réaction d'IEDDA entre le TCO et la sonde TZ entraîne la formation du cycloadduit 1,4 dihydropyridazine qui subit un réarrangement en pyridazine avec formation de N₂. Mais ce réarrangement déclenche la libération du carbamate, suivie immédiatement d'un dégagement de CO₂ et de la libération du composé cytotoxique ou de la toxine accrochée au carbamate au niveau de la tumeur. La découverte de cette réaction ainsi que la preuve de concept *in vivo* de cette approche ont été réalisées par cette même équipe, dans un modèle de cancer colorectal implanté en souscutané chez la souris, avec un conjugué AcM-ADC de type CC49-TCO-Doxorubicine. Les résultats de biodistribution de la sonde TZ-DOTA-¹⁷⁷Lu montrent un faible % d'Al dans les tumeurs, entre 1 et 2 %, indiquant que cette approche nécessite d'être optimisée avant d'envisager des études de thérapie (Figure 45).

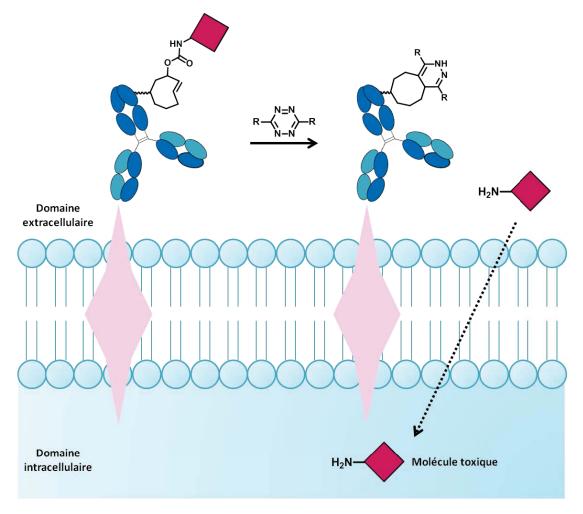


Figure 45: Activation de l'antibody-drug conjugate (ADC) via la réaction IEDDA d'élimination pyridazine (click-to-release). Modifié d'après Rossin et al.[260]

Partie 2 : Objectifs de la thèse

La radioimmunothérapie (RIT) permet d'irradier de façon spécifique des tumeurs à l'aide d'AcMs conjugués à des radionucléides. Son efficacité thérapeutique est cependant entravée sur les tumeurs solides, de par la faible pénétration des AcMs au sein des tumeurs et est associée à une importante toxicité hématologique du fait de la lente clairance des AcMs radiomarqués. Dissocier l'injection des AcMs de celle du radioligand semble donc pertinent pour réduire cette hématotoxicité et améliorer l'indice thérapeutique de la RIT : il s'agit des approches de radioimmunothérapie préciblée (PRIT). La stratégie de PRIT la plus récente met en jeu l'interaction entre deux espèces chimiques très réactives que sont le *trans*-cyclooctène (TCO) et la tétrazine (TZ) au travers d'une réaction rapide et biocompatible.

Ainsi, les études effectuées au cours de ma thèse se sont articulées autour de deux axes, l'un consistant à étudier les conséquences des modifications d'AcMs suite au greffage avec les unités TCO et l'autre concernant l'étude de différentes sondes TZ radiomarquées dans le but de déterminer la configuration optimale pour la PRIT de la carcinose péritonéale(CP) (Figure 46).

Dans un premier temps, nous avons effectué des études de pharmaco-modulation des AcM-TCO en variant à la fois le nombre d'unités TCO greffées par AcM puis en modulant la longueur de l'espaceur situé entre l'AcM et le TCO par l'insertion de chaîne polyéthylène glycol (PEG). Nous avons ainsi évalué l'influence de ces modifications d'AcM sur l'efficacité de la PRIT, à la fois *in vitro* et *in vivo* au sein de deux modèles de CCR différents, implantés soit en sous-cutané soit en orthotopique dans la cavité péritonéale de façon à reproduire la CP. De même ont été étudiées *in vitro* la stabilité des composants TCO ainsi que l'influence de l'isomérisation des TCO dans leur forme inactive *cis*-cyclooctène (CCO).

Dans une seconde partie nous avons évalué *in vivo*, au travers d'études de biodistributions, différentes structures de TZ radiomarquées au Lutécium-177 afin de déterminer laquelle pourrait permettre d'obtenir le plus fort pourcentage d'activité dans les tumeurs. Enfin, des études de survie ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique de la PRIT par chimie bioorthogonale sur des tumeurs disséminées.

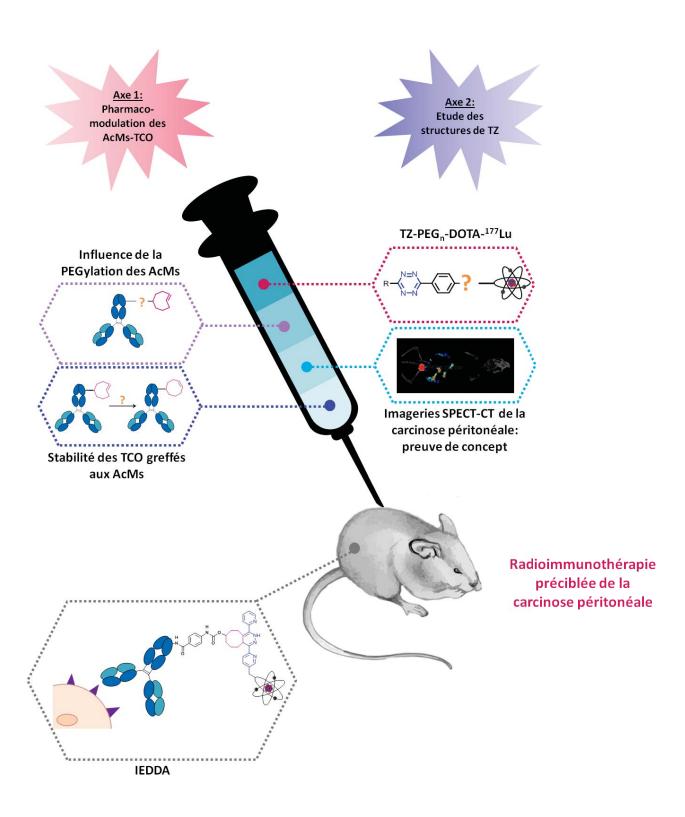


Figure 46 : Schéma présentant les deux axes d'études de la stratégie de radioimmunothérapie préciblée utilisant la chimie bioorthogonale.

Partie 3: Matériels et Méthodes

I. Lignées cellulaires et anticorps

Les études de préciblage ont été effectuées sur deux lignées de cancer colorectal. (Tableau 14). Ces deux lignées cellulaires sont cultivées dans un milieu supplémenté avec 10 % de SVF et sont maintenues à 37 °C avec 5 % de CO₂ dans une étuve humide.

| | HT29 | A431-CEA-Luc |
|-----------------------|---|---|
| Morphologie | | |
| Origine cellulaire | Adénocarcinome de côlon humain | Carcinome épithélial de côlon humain |
| Provenance | Dr. Boucheix Hôpital Paul Brousse, Villejuif | Dr. Pouget IRCM U1194 Montpellier |
| Milieu de culture | DMEM | DMEM-F12 |
| Antibiotiques | 1 % gentamycine | 1 % pénicilline 1 % streptomycine |
| Transfection | Non | Oui ACE et Luc Effectué par l'IRCM |
| Pression de sélection | Non | Oui ACE : généticine (1 %) Luc : hygromycine (1%) |
| Antigène ciblé | TSPAN8 Exprimé de façon constitutive | ACE |
| Anticorps monoclonal | Ts29.2[178] IgG2b | 35A7[184] IgG1 |

Tableau 13 : Conditions de culture et caractéristiques des lignées de côlon. DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen, Cergy Pointoise, France). ACE (ou CEA) : Antigène carcino-embryonnaire. TSPAN8 : Tétraspanine 8. Luc : Luciférase.

II. Pharmaco-modulation des anticorps

a. Variation du nombre de TCO

L'efficacité de la chimie bioorthogonale dépend entre autres paramètres du nombre de TCO greffés à l'AcM. Ces TCO se greffent sur les résidus lysine des AcMs et leur nombre doit être choisi de façon à induire une réponse optimum, c'est-à-dire permettre de fixer un maximum de TZ. En

revanche les modifications apportées ne doivent pas être trop importantes au risque de dénaturer la structure de base de l'AcM, ce qui aurait pour conséquence de diminuer la fraction immunoréactive. Ainsi, il est possible de moduler le nombre de TCO greffés sur les AcMs en augmentant le nombre d'équivalents mis dans le mélange réactionnel. Pour les expériences *in vitro*, 100 µg de Ts29.2 ou de 35A7 ont été modifiés avec des quantités croissantes de TCO, soit 0, 5, 15, 20 ou 30 équivalents de TCO pour 1 équivalent d'AcM.

b. Variation de la longueur de l'espaceur PEG

La distance entre l'AcM et le TCO a été pharmaco-modulée par l'insertion de chaînes polyéthylène glycol (PEG) de différentes longueurs (PEG₄ et PEG₁₂). De la même façon que pour l'AcM-TCO ne contenant pas de PEG (AcM-PEG₀-TCO), les AcMs PEGylés ont été modifiés par l'ajout de quantités croissantes d'unités PEG_n-TCO, allant de 0 à 30 équivalents pour 1 équivalent d'AcM (**Tableau 14**).

| Equivalents de PEG _n - TCO mis en réaction | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 30 |
|---|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------|
| Ts29.2-PEG ₀ -TCO | 0 | 1,8 | 3,5 | 4,6 | 5,3 | 6,4 |
| | [0-0] | [2-3] | [1-6] | [2-7] | [3-8] | [4-9] |
| Ts29.2-PEG ₄ -TCO | 0 [0-0] | 1,3 [0-2] | 2,9 [1-5] | 4,1 [2-6] | 5,6 [4-7] | ND |
| Ts29.2-PEG ₁₂ -TCO | 0 | 1,3 | 3,0 | 7,4 | 11,3 | 16,0 |
| | [0-0] | [1-2] | [2-4] | [7-8] | [10-13] | [14-17] |

| Equivalents de PEG _n . TCO mis en réaction | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 30 |
|---|-------|-----------|-----------|-------|-------|---------|
| 35A7-PEG ₀ -TCO | 0 | 0,6 | 1,6 | 2,2 | 3,0 | 3,7 |
| | [0-0] | [0-1] | [1-2] | [1-3] | [2-4] | [3-4] |
| 35A7-PEG ₄ -TCO | 0 | 1,7 | 3,7 | 5,7 | 7,6 | 11,6 |
| | [0-0] | [1-2] | [3-4] | [5-7] | [6-9] | [10-13] |
| 35A7-PEG ₁₂ -TCO | 0 | 1,2 | 2,8 | 6,3 | 8,8 | 13,0 |
| | [0-0] | [1,1-1,3] | [2,5-3,1] | [6-7] | [8-9] | [12-14] |

Tableau 14 : Nombre moyen de PEG_n-TCO greffés par AcM en fonction des différents équivalents mis en réaction. ND : non déterminé.

II. Sondes tétrazines

a. Tétrazines fluorescentes

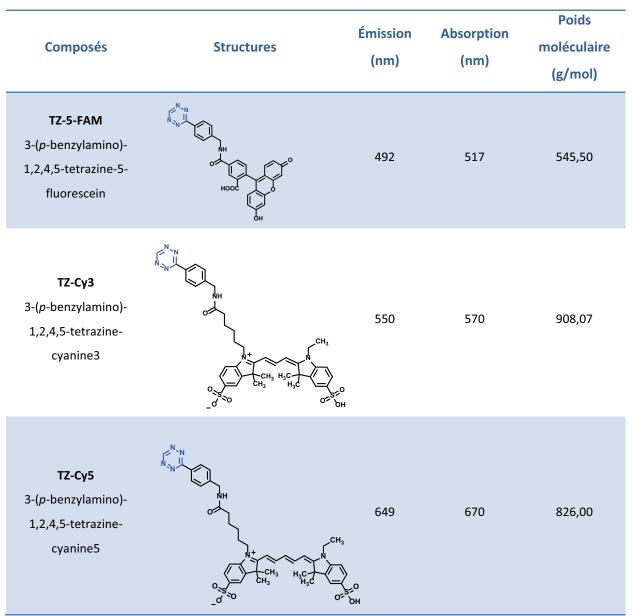


Tableau 15 : Structures et caractéristiques des différentes tétrazines fluorescentes utilisées.

Afin d'obtenir un signal optimal pour chacune des expériences de préciblage menées en fluorescence plusieurs TZ fluorescentes ont été utilisées. Bien que les propriétés physicochimiques des fluorophores organiques couplés à ces TZ soient différentes, cela n'altère pas l'interaction TCO/TZ du fait de la très forte affinité et spécificité entre ces deux molécules. Cependant, au cours d'une même expérience, un seul type de sonde fluorescente a été utilisé pour comparer les différents AcMs-PEG_n-TCO entre eux et cela afin d'éviter d'introduire un quelconque biais. Les TZ fluorescentes ont toutes été achetées chez JenaBioscience (Allemagne). Ainsi, la 3-(p-benzylamino)-

1,2,4,5-tetrazine-5-fluorescein (TZ-5-FAM) et la 3-(*p*-benzylamino)-1,2,4,5-tetrazine-cyanine3 (TZ-Cy3) ont été utilisées pour les expériences *in vitro* tandis que la 3-(*p*-benzylamino)-1,2,4,5-tetrazine-cyanine5 (TZ-Cy5) a été quant-à-elle injectée chez les souris du fait de son émission dans le proche infrarouge qui permet de visualiser plus profondément dans les tissus mous (**Tableau 15**).

b. Tétrazines radiomarquées

Trois sondes TZ ont été explorées au travers d'études de biodistribution et de thérapie préciblée dans le modèle de CP (**Tableau 16**). Ainsi, les TZ-PEG₄-DOTA-¹⁷⁷Lu (*i.e.* TZ-**1**), TZ-PEG₈-DOTA-¹⁷⁷Lu (*i.e.* TZ-**3**) et TZ-PEG₁₂-DOTA-¹⁷⁷Lu (*i.e.* TZ-**4**) ont été synthétisées et radiomarquées directement par les radiochimistes de l'unité tandis que la TZ-PEG₇-DOTA-¹⁷⁷Lu (*i.e.* TZ-**2**) a été fournie par l'équipe du P' B. Zeglis (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA)[244],[245]. Les structures de ces TZ diffèrent en plusieurs points. Ainsi, les TZ-**1,3,4** possèdent un cycle tétrazine avec deux pyridines de part et d'autre tandis que la TZ-**2** possède un cycle tétrazine relié uniquement à un phényle en position *para*. La seconde différence provient de la longueur de l'espaceur PEG qui varie entre les 4 composés (longueurs 4, 7, 8 et 12). Enfin, le macrocycle DOTA est légèrement différent entre les TZ-**1,3,4** et la TZ-**2** permettant une coordinance soit de 7 soit de 9 vis-à-vis du métal radioactif.

| | Churching | Activités molaires | - Control of the cont |
|---|---|--------------------|--|
| Composes | Structures | (GBq/µmoles) | Provenance |
| TZ-PEG ₄ DOTA- ¹⁷⁷ Lu (TZ-1) | | 12,2 | IMoST UMR 1240 Clermont-Ferrand D' E. Moreau D' S. Schmitt |
| TZ-PEG7 DOTA- ¹⁷⁷ Lu (TZ-2) | THE THE THE THE TANK | 13,9 | MSK Cancer Center New-York P ^r B. Zeglis D ^r R. Membreno |
| TZ-PEG8 DOTA- ¹⁷⁷ Lu (TZ-3) | | ဧကို | IMoST UMR 1240 Clermont-Ferrand D' E. Moreau D' S. Schmitt |
| TZ-PEG ₁₂ DOTA- ¹⁷⁷ Lu (TZ-4) | | 7,4 | IMoST UMR 1240 Clermont-Ferrand D' E. Moreau D' S. Schmitt |

Tableau 16: Structures et caractéristiques des différentes tétrazines synthétisées et radiomarquées au Lutécium-177. TZ: tétrazine. PEG: polyéthylène-glycol. DOTA: acide 1,4,7,10-tétraazacyclododecane-1,4,7,10-tétraacétique. ¹⁷⁷Lu: Lutécium-177.

III. Études moléculaires par SDS-PAGE

La migration sur gel SDS-PAGE d'AcMs modifiés et la révélation de ces gels nous ont permis à la fois de vérifier la réactivité et la stabilité des conjugués AcM-TCO et également de réaliser des études sur l'isomérisation des TCO conjugués.

Ainsi, après ajout de Laemli 4X, une quantité de 1-5 μg de Ts29.2-PEG_n-TCO ou de 35A7-PEG_n-TCO a été déposée -sans réduction préalable au β -mercaptoéthanol- sur gel de polyacrylamide à 4-15 % (Biorad, France). Le gel est ensuite rincé 5 min sous agitation dans 100 mL d'H₂O Milli-Q (Millipore, France) pour ôter les traces de SDS puis a été incubé 10 min sous agitation lente, dans le noir, à TA dans un bain d'H₂O Milli-Q contenant 0,02 mM de TZ-5-FAM. Après un nouveau rinçage 5 min sous agitation avec 100 mL d'H₂O Milli-Q le gel a été imagé au Chemidoc (Biorad, France). La quantité totale de protéines déposée a ensuite été mise en évidence par coloration du gel au SimplyBlueTM SafeStain (ThermoFisher Scientific, France). Un ratio entre l'intensité de fluorescence et la quantité totale de protéine déposée a été effectué pour la bande majoritaire de l'AcM (située à \approx 130 KDa) afin de comparer les interactions des différents AcM-PEG_n-TCO entre eux.

IV. Études in vitro

a. Culture cellulaire en 3D

Dans un premier temps, différentes quantités de cellules HT29 (1000, 3000 ou 6000) ont été ensemencées dans du DMEM contenant 0,5 % de méthylcellulose (R&D Systems, USA) dans des plaques 96 puits à fonds coniques (ThermoFisher Scientific). Les sphéroïdes ont ensuite été incubés dans les conditions de culture standard, à 37 °C (5 % de CO_2) dans un environnement humide. Les agrégats de cellules ont commencé à se former après 24 h d'incubation, les sphéroïdes ayant ainsi été obtenus 48 h après ensemencement. L'évolution de leur taille et de leur morphologie a été suivie tous les jours à la même heure par imagerie à l'aide d'un microscope inversé à contraste de phase (Eclipse TS100, Nikon). Le suivi a été effectué jusqu'à l'observation d'un détachement de cellules (dissociation du sphéroïde). Afin d'évaluer la croissance, 3 sphéroïdes ont été choisis aléatoirement pour chacune des conditions d'ensemencement pour être imagés puis analysés avec le logiciel ImageJ®. Le diamètre a ainsi été calculé à partir des images 2D en déterminant l'aire (S) par les formules du rayon ($R=\sqrt{S/\pi}$) et du volume ($V=4/3\pi\times R^3$). La circularité (C) des sphéroïdes a été mesurée avec la formule $C=4S/\pi$ et la densité (D) a été obtenue par comptage des cellules (Lame de comptage FAST READ 102, Biosigma D.R.L, Italie) après dissociation des sphéroïdes à la trypsine (Figure 47).

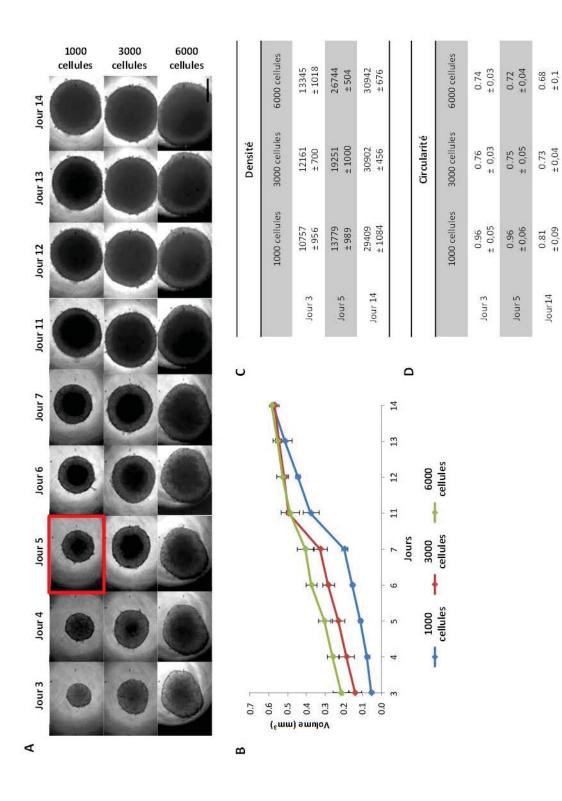


Figure 47: Caractérisation des sphéroïdes HT29 sur une période de 14 jours. (A) Suivi de la croissance par microscopie optique. (B) Volume mesuré avec ImageJ. (C) Densité correspondant au nombre de cellules par sphéroïde. (D) Circularité mesurée avec Imagel.

b. Cytométrie en flux

1. Évaluation de la reconnaissance AcM-PEG_n-TCO/Antigènes par cytométrie en flux quantitative

Le nombre d'antigènes (Ag) TSPAN8 et ACE reconnus par les différents AcMs modifiés a été mesuré par cytométrie en flux quantitative à l'aide d'un kit de diagnostic *in vitro* (Cellquant Calibrator®, Biocytex, France) et du cytomètre BD-LSRII (BD Biosciences, logiciel FACSDiva). Cette technique est proche de la cytométrie en flux classique, exceptée qu'elle utilise des billes de calibration recouvertes de quantités croissantes d'IgG de souris qui permettent ainsi d'obtenir une droite étalon. Le nombre d'Ag reconnus a donc été calculé avec les valeurs d'intensité de fluorescences moyennes mesurées et grâce à l'équation de la droite obtenue à l'aide des billes.

2. Étude de l'interaction AcM-PEG_n-TCO/ TZ-5-FAM

L'interaction AcM-PEG_n-TCO et TZ-5-FAM a été évaluée dans un premier temps par cytométrie en flux classique. Le même protocole a été utilisé sur les deux lignées cellulaires HT29 et A431-CEA-Luc. Les cellules ont été au préalable trypsinées et réparties à 1.10⁶/50 µL par condition puis incubées 30 min à 4 °C avec 0,03 nmol de Ts29.2-PEG_n-TCO ou de 35A7-PEG_n-TCO. Les cellules ont ensuite été centrifugées 5 min à 461 g, les surnageants éliminés et les culots lavés 2 fois dans du DPBS puis de nouveau incubées 30 min à 4 °C, dans le noir avec 10-14 équivalents de TZ-5-FAM (respectivement au nombre de TCO par AcM) ou avec une solution 1/1000 d'AcII-FITC (donkey antimouse, ThermoFisher Scientific, France). Après lavage au DPBS, les culots sont repris dans 1 mL de DPBS pour être analysés au cytomètre (BD-LSRII, BD Biosciences, logiciel FACSDiva).

c. Immunofluorescence

1. Sur cellules en monocouches (2D)

L'interaction AcM-PEG_n-TCO et TZ-Cy3 a été évaluée par immunofluorescence (IF) sur les deux modèles cellulaires HT29 et A431-CEA-Luc suivant le même protocole. Ainsi, des chambres de culture 8 puits (Labteks, Sigma Aldrich, France) ont dans un premier temps été incubées 1 h à TA avec du collagène de queue de rat (Corning, USA) à 5 μg/cm² afin de permettre une meilleure adhérence des cellules durant le protocole d'IF. Une quantité de 1.10⁵ de cellules HT29 ou A431-CEA-Luc a été ensemencée avec le milieu de culture adéquat et réparti de façon homogène sur toute la surface du puits. Les chambres de culture ont ensuite été placées 48 h dans un incubateur humide (37 °C, 5 % de CO₂) avant les immunomarquages. Les AcMs-TCO, AcII et les TZ-Cy3 sont dilués dans du DPBS-2,5 %

BSA. Les cellules ont tout d'abord été incubées 30 min à TA avec 5 % de BSA-DPBS (saturation) puis 1h30 à 37 °C avec 0,03 nmol de Ts29.2-PEG_n-TCO ou de 35A7-PEG_n-TCO. Le tapis cellulaire a ensuite été rincé 2 fois avec 200 μL de DPBS en prenant garde de ne pas le décoller puis de nouveau incubé à 37 °C pendant 45 min dans le noir avec 1/500ème d'anticorps secondaire polyclonal (AcII donkey antimouse – Cyanine3 ou FITC, Jackson Immunoresearch, USA) dilué dans du DPBS contenant 2,5 % de BSA ou ont été incubées avec 10 à 14 équivalents de TZ-Cy3 (respectivement au nombre de TCO/AcM). Des co-incubations AcII et TZ-Cy3 ont également été réalisées suivant les mêmes concentrations qu'énoncées ci-dessus afin de montrer la co-localisation des deux signaux. En fin de protoccole, les cellules sont fixées 10 min à TA avec 10 % de formaline (Sigma Aldrich, France) puis les chambres retirées et les lames avec du Vectashield®-DAPI. Les lames ont été observées 24 h après au microscope confocal (Leica SPE/LSI, plateforme CLIC, Clermont-Ferrand).

2. Sur sphéroïdes (3D)

Pour chaque condition testée une dizaine de sphéroïde de 5 jours ont été récoltés précautionneusement avec un embout de cône de 200 μL préalablement coupé à son extrémité et déposés délicatement dans des tubes de 5 mL. Le protocole d'IF est identique à celui appliqué sur les cellules en monocouches. Pour améliorer la pénétration du DAPI dans la structure 3D, celui-ci a été dilué au 1/500ème et co-incubé en même temps que l'AcII et la TZ-Cy3. Après fixation à la formaline (10 %, 15 min à TA) les sphéroïdes ont subi un protocole de clarification dans le but d'améliorer leur indice de réfraction et ainsi pouvoir observer et imager les couches Z situées en profondeur (**Figure 48**).

Ce protocole de clarification, adapté du protocole ClearT² de Boutin *et al.*[261] a consisté à incuber les sphéroïdes successivement 15 min à TA avec une solution contenant 25 % de formamide/10 % de PEG₈₀₀₀ (Sigma-Aldrich, France) puis 1h30 avec 25 % de formamide/ 10 % de PEG₈₀₀₀.

Après clarification les sphéroïdes ont été montés entre lame et lamelle dans du Vectashield®-DAPI en prenant bien garde de ne pas les écraser. Pour éviter toute dégradation des sphéroïdes ou perte de fluorescence, l'observation en microscopie confocale a systématiquement été réalisée 24 h après les immunomarquages.

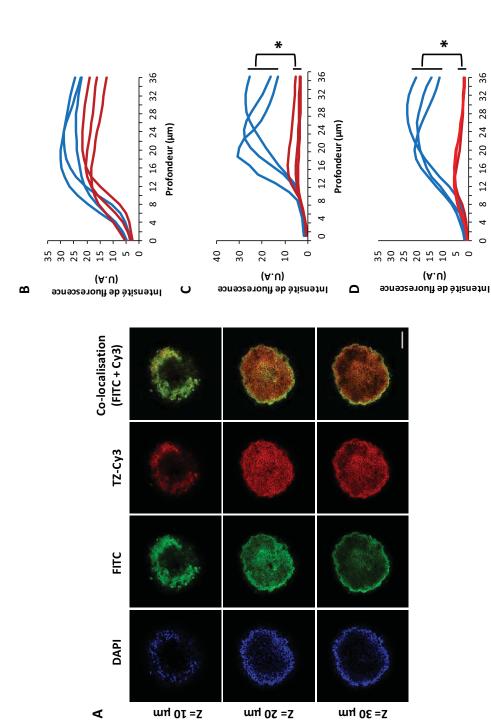


Figure 48: Amélioration de la profondeur d'acquisition par microscopie confocale des sphéroïdes HT29 par clarification ClearT². (A) Images confocales à différentes profondeurs Z obtenues après incubation des sphéroïdes avec 10 µg/mL de Ts29.2-TCO. Bleu : coloration des noyaux au DAPI. Vert : Signal de l'AcII-FITC. Rouge : Signal du marquage TZ-Cy3. Orange : colocalisation AcII-FITC+TZ-Cy3. Echelle: 100 µm. (B-D) Comparaison des intensités de fluorescence entre les sphéroïdes clarifiés (bleu, n=3) et non-clarifiés (rouge, n=3) pour les trois canaux de fluorescence, à savoir DAPI (B), AcII-FITC (C) et TZ-Cy3 (D). *p < 0,01, test T apparié de Student.

Profondeur (µm)

Sphéroïdes non-clarifiés Sphéroïdes clarifiés

3. Paramètres d'acquisition en microscopie confocale

La totalité des acquisitions a été réalisée sur un microscope confocal Leica SPE-LSI (Plateforme CLIC, Clermont-Ferrand, France). Les mêmes réglages et les mêmes intensités de laser ont été appliqués sur l'ensemble des images 2D ou 3D de façon à pouvoir comparer les différentes conditions entre elles. Trois lasers ont été utilisés : 405 nm pour le canal du DAPI, 488 nm pour celui du FITC et enfin 532 nm pour la cyanine3. Les images 2D et 3D ont ainsi été prises avec une résolution de 1024 x 1024 pixels, un zoom de 1, un gain de 950, un offset à -0,5 -ce qui permet d'éliminer le bruit de fond parasite- et enfin une correction de phase à -36,92. Les images ont été réalisées en mode bidirectionnel avec des acquisitions de l'ensemble des couches Z tous les 2 μm. Pour les cellules en 2D, 3 champs aléatoires par puits ont été imagés pour chaque expériences. Pour les sphéroïdes, les acquisitions ont été menées jusqu'à la profondeur Z maximum détectable, sur une quantité de 3-4 sphéroïdes par condition testée.

4. Quantification des signaux membranaires fluorescents

Les signaux fluorescents membranaires de la TZ-Cy3 et de l'AcII-FITC ont été quantifiés à l'aide de plusieurs algorithmes fonctionnant avec le logiciel Fiji (ImageJ®).

Brièvement, pour l'algorithme utilisé sur les cellules en monocouches 2D une série de calques a été appliqué sur l'image de départ de façon à discriminer le signal membranaire du vide (cytoplasme) et du signal du DAPI (noyaux) (**Tableau 17**). Une projection en Z a ensuite été réalisée sur l'ensemble des images (l'ensemble des couches Z imagées) afin d'obtenir un signal médian de l'ensemble de l'image. Une valeur de l'intensité moyenne de fluorescence a donc finalement été calculée par l'ordinateur permettant ainsi d'effectuer des comparaisons statistiques entre les différentes conditions de test.

```
1. title0=getTitle();
2. run("Reduce Dimensionality...", "slices keep");
3. close(title0);
4. title=getTitle();
5. run("Z Project...", "projection=[Average Intensity]");
6. selectWindow(title);
7. run("Z Project...", "projection=[Max Intensity]");
8. setOption("BlackBackground", true);
9. setAutoThreshold("Huang dark");
10. run("Convert to Mask");
11. run("Options...", "iterations=4 count=4 black pad do=Open");
12. run("Measure");
13. imageCalculator("AND create", "MAX_"+title,"AVG_"+title);
14. run("Measure");
```

```
15. RID1 = getResult("RawIntDen", 0);

16. RID2 = getResult("RawIntDen", 1);

17. print(255*RID2/RID1);

18. IJ.deleteRows(0, 1);

19. close("Results");
```

Tableau 17 : Algorithme de quantification du signal membranaire fluorescent utilisé sur les images en confocal réalisées sur les cellules 2D.

Concernant les quantifications des signaux membranaires fluorescents réalisées sur les sphéroïdes HT29, deux algorithmes différents ont été utilisés. Le premier a consisté à quantifier le signal en 2D à une profondeur Z donnée par zones concentriques allant du bord jusqu'au centre du sphéroïde (Tableau 18).

```
1. title=getTitle();
getPixelSize(unit, pixelWidth, pixelHeight);
3. mean_pix_size = (pixelWidth + pixelHeight)/2;
4. intensity threshold = 0;
5. waitForUser("Go to the slice and channel you want to process.");
6. Stack.getPosition(channel, slice, frame);
7. waitForUser("Go to the channel with the nuclei.");
8. Stack.getPosition(nuclei, slice2, frame2);
9. Stack.setPosition(nuclei, slice, frame);
10. setBatchMode(true);
11. run("Duplicate...", "title=dup");
12. setAutoThreshold("Huang dark");
13. setOption("BlackBackground", true);
14. run("Convert to Mask", "method=Huang background=Dark black");
15. run("Fill Holes");
16. run("Exact Euclidean Distance Transform (3D)");
17. rename("Distance");
18. close("dup");
19. selectWindow(title);
20. Stack.setPosition(channel, slice, frame);
21. run("Duplicate...", "title=Intensity");
22. row=0;
23. w=getWidth();
24. h=getHeight();
25. for(x=0;x<=w;x++)
26. -{
27. for(y=0;y<=h;y++)
28. {
29. selectWindow("Distance");
30. d=getPixel(x,y);
31. selectWindow("Intensity");
32. v=getPixel(x,y);
33. if(v>intensity_threshold)
35. setResult("X",row,x);
36. setResult("Y",row,y);
37. setResult("Distance (pixels)", row, d);
38. setResult("Distance", row, d*mean_pix_size);
```

```
39. setResult("Intensity", row, v);
40. row++;
41. }
42. }
43. }
44. updateResults();
45. close("Intensity");
46. close("Distance");
47. setBatchMode(false);
48. IJ.renameResults(title+"-results");
49. xValues=Table.getColumn("Distance");
50. yValues=Table.getColumn("Intensity");
51. Plot.create("Spheroid Intensity profile", "Distance from border ("+unit+")", "Intensity");
52. Plot.setColor("#00BA38");
53. Plot.add("circles", xValues, yValues);
```

Tableau 18 : Algorithme 2D de quantification du signal membranaire fluorescent pour les sphéroïdes imagés en microscopie confocale.

Le second algorithme a consisté à quantifier le signal en 3D sur toutes les couches du sphéroïde par zones concentriques allant de la surface jusqu'au centre et prenant ainsi en compte les 3 axes (X, Y et Z) (**Tableau 19**).

```
1. title=getTitle();
2. getDimensions(w, h, channels, slices, frames);
3. getVoxelSize(pw, ph, pd, unit);
4. mean pix size = (pw + ph)/2;
5. interp_ratio = pd/mean_pix_size;
6. intensity threshold = 0;
7. waitForUser("Go to the channel you want to process.");
8. Stack.getPosition(channel, slice, frame);
9. waitForUser("Go to the channel with the nuclei.");
10. Stack.getPosition(nuclei, slice2, frame2);
11. Stack.setPosition(nuclei, slice, frame);
12. setBatchMode(true);
13. run("Duplicate...", "title=dup duplicate channels="+nuclei);
14. setAutoThreshold("Huang dark stack");
15. setOption("BlackBackground", true);
16. run("Convert to Mask", "method=Huang background=Dark black");
17. run("Fill Holes", "stack");
18. run("Scale...", "x=1.0 y=1.0 z="+interp_ratio+" width="+w+" height="+h+"
19. depth="+round(interp_ratio*slices)+" interpolation=None process");
20. rename("interp");
21. close("dup");
22. run("Exact Euclidean Distance Transform (3D)");
23. rename("ISODistance");
24. close("interp");
25. run("Scale...", "x=1.0 y=1.0 z=- width="+w+" height="+h+" depth="+slices+" interpolation=None 26.
process");
27. rename("Distance");
28. close("ISODistance");
29. selectWindow(title);
```

```
30. Stack.setPosition(channel, slice, frame);
31. run("Duplicate...", "title=Intensity duplicate channels="+channel);
32. row=0;
33. for(z=1;z<=slices;z++)
34. {
35. selectWindow("Distance");
36. setSlice(z);
37. selectWindow("Intensity");
38. setSlice(z);
39. for(x=0;x<=w;x++)
40. {
41. for(y=0;y<=h;y++)
42. {
43. selectWindow("Distance");
44. d=getPixel(x,y);
45. selectWindow("Intensity");
46. v=getPixel(x,y);
47. if(v>intensity_threshold)
48. {
49. setResult("X",row,x);
50. setResult("Y",row,y);
51. setResult("Z",row,z);
52. setResult("Distance (pixels)", row, d);
53. setResult("Distance", row, d*mean pix size);
54. setResult("Intensity", row, v);
55. row++;
56. }
57. }
58. }
59. }
60. close("Intensity");
61. close("Distance");
62. setBatchMode(false);
63. updateResults();
64. IJ.renameResults(title+"-results-3D");
65. xValues=Table.getColumn("Distance");
66. yValues=Table.getColumn("Intensity");
67. Plot.create("3D Spheroid Intensity profile", "Distance from border ("+unit+")", "Intensity");
68. Plot.setColor("#00BA38");
69. Plot.add("circles", xValues, yValues);
```

Tableau 19 : Algorithme 3D de quantification du signal membranaire fluorescent pour les sphéroïdes imagés en microscopie confocale.

IV. Études in vivo

a. Modèles animaux

Les études *in vivo* ont été réalisées sur des souris NMRI Nude femelles, de génotype Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu} ou NMRI Nu/Nu, âgées de 5 semaines, et proviennent respectivement des laboratoires Janvier Labs (Le Genest St Isle, France) et Charles River (L'arbresle, France). Les animaux ont été hébergés dans des conditions standard, à 5 par cage, sur des portoirs ventilés, à une

température comprise entre 21 et 24 °C et une hygrométrie de 60 %, suivant un cycle jour/nuit de 12 h/ 12 h et avec un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*. Les souris ayant reçu des injections de radioligands sont placées dans des armoires plombées, hébergées soit à 3 individus par cage soit en cage individuelle le temps de la décroissance radioactive. L'ensemble des expérimentations a été effectué en conformité avec les recommandations du guide pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire et a été validé par le comité d'éthique local (CEMEAA n°002) ainsi que par le Ministère de l'Enseignement et de la Recherche (saisine n° 5103-20160420120209100). Les imageries *in vivo* ont été effectuées au sein du laboratoire, sur la plateforme IVIA : les imageries optiques ont été réalisées à l'aide d'un imageur IVIS Spectrum (Perkin Elmer) tandis que les acquisitions scintigraphiques ont été obtenues par imagerie SPECT-CT (Mediso, RS2D).

B. Xénogreffes

Les cellules HT29 ou A431-CEA-Luc ont été trypsinées, comptées à l'aide d'une cellule de Malassez, centrifugées 8 min à 461 g à TA. Les culots HT29 sont ensuite repris dans du DPBS tandis que les culots A431-CEA-Luc sont repris dans du DMEM supplémenté avec 1 % pénicilline/streptomycine pour avoir une concentration finale respectivement à $3.10^6/150~\mu$ L et 1.10⁶/250 µL. Les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane (2,5 % de gaz, 2:3 d'oxygène) puis injectées soit en sous-cutané dans le flanc droit (modèle HT29), soit en i.p. dans le cadrant inférieur droit (modèle orthotopique A431-CEA-Luc). Dans le modèle HT29, la croissance tumorale a été mesurée à intervalles réguliers à l'aide d'un pied à coulisse. Le volume tumoral (en mm³) est calculé selon la formule $V=(L \times I^2)/2$, avec L correspondant à la longueur (en mm) et I la largeur (en mm). Pour des raisons éthiques, lorsque le volume tumoral atteint 2000 mm³, soit environ 10 % du poids de la souris, les animaux sont alors sacrifiés. Dans le modèle orthotopique A431-CEA-Luc, la prise tumorale est vérifiée 24 h après la greffe par imagerie en bioluminescence puis suivie à intervalles réguliers. Les animaux vigiles sont ainsi injectés en i.p. avec 15 mg/mL, soit 250 μL, de luciférine (Perkin Elmer, France). Après 10 min de métabolisation du substrat, les souris sont anesthésiées (2,5 % d'isoflurane, 2 :3 d'oxygène) et imagées. En complément de l'imagerie les animaux ont également été pesés à intervalles réguliers afin de contrôler leur état général. En cas de perte de poids supérieure à 20 % les animaux sont alors sacrifiés.

c. Modèle sous-cutané HT29

1. Evaluation de l'interaction Ts29.2-PEG_n-TCO / TZ-Cy5

Après 7 jours de pousse tumorale, 24 souris ont été réparties aléatoirement dans deux conditions de tests subdivisées en 4 groupes chacune (n=3 souris par groupe) (Tableau 20). Dans la première condition les souris ont été injectées en intraveineuse (i.v.) avec 0,3 nmol de Ts29.2-0-3 préalablement incubés avec de la TZ-Cy5 (4 à 8 équivalents, respectivement au nombre de TCO portés par l'AcM) pendant 30 min à TA dans un tube. Cette partie des groupes correspond à la condition dite de ciblage direct des tumeurs. Dans la seconde condition, dite de préciblage, les 4 groupes ont quant-à-eux été injectés dans un premier temps en i.v. avec 0,3 nmol de Ts29.2-0-4 suivi 24 h après par l'injection i.v. de la TZ-Cy5 (4 à 8 équivalents, respectivement au nombre de TCO portés par l'AcM). Les AcMs et la TZ-Cy5 ont été dilués respectivement dans du sérum physiologique et dans du sérum physiologique contenant 0,5 % de DMSO. Pour évaluer l'interaction Ts29.2-**0-4/**TZ-Cy5 les souris ont été imagées 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h et 120 h après injection de la TZ-Cy5 et le signal fluorescent localisé dans les tumeurs a été quantifié. La TZ fluorescente étant peu soluble, celle-ci s'est accumulée au moment de l'injection i.v. dans le système lymphatique des souris. De fait, le signal fluorescent présent au niveau des ganglions axillaires a également été quantifié afin de vérifier si la quantité de TZ-Cy5 perdue était la même entre les différents AcMs testés. Les animaux ont été sacrifiés 7 jours après injection de la TZ-Cy5.

| Condition | Groupe | Abréviation | Effectif |
|----------------|-------------------------------|------------------|----------|
| | Contrôle | Ts29.2- 0 | 3 |
| | Ts29.2 sans TCO | 1323.2 0 | 3 |
| Ciblage direct | Ts29.2-PEG ₀ -TCO | Ts29.2- 1 | 3 |
| | Ts29.2-PEG ₄ -TCO | Ts29.2- 2 | 3 |
| | Ts29.2-PEG ₁₂ -TCO | Ts29.2- 3 | 3 |
| | | | |
| | Contrôle | Ts29.2- 0 | 3 |
| | Ts29.2 sans TCO | 1323.2- 0 | 3 |
| Préciblage | Ts29.2-PEG ₀ -TCO | Ts29.2- 1 | 3 |
| | Ts29.2-PEG ₄ -TCO | Ts29.2- 2 | 3 |
| | Ts29.2-PEG ₁₂ -TCO | Ts29.2- 3 | 3 |

Tableau 20 : Les différents groupes de test pour les études d'interaction Ts29.2-PEG_n-TCO / TZ-Cy5 sur le modèle HT29 selon la condition évaluée.

2. Biodistributions de la TZ-1

Après 7 jours de croissance tumorale, les animaux ont été répartis de façon aléatoire dans les différents groupes de test (**Tableau 21**). Pour cette étude, deux quantités de Ts29.2-TCO ont été évaluées pour voir si cela avait un impact sur le pourcentage d'activité injectée (% d'IA) au niveau de la tumeur. Le groupe contrôle (n=6) a ainsi été injecté en i.v. uniquement avec 10 MBq de TZ-**1**. Les deux autres groupes (n=15 par groupe) ont quant à eux été injectés en i.v. avec respectivement soit 50 μg soit 200 μg de Ts29.2-**1** (6-8 TCO par Ts29.2) suivis 24 h après par l'injection i.v. de 10 MBq de TZ-**1**. (**Résultats non montrés**)

| Condition | Groupe | Dose | Effectif | Prélèvements |
|-----------|------------------|------------------------|----------|------------------|
| Contrôle | Contrôle | 10 MBq | 6 | 4 h et 24 h |
| | TZ- 1 | 10 10104 | Ü | 411 Ct 2411 |
| PRIT | Ts29.2- 1 | 50 μg | 15 | 4 h, 24 h, 48 h, |
| | 1323.2 2 | 10 MBq de TZ- 1 | 13 | 72 h et 144 h |
| PRIT | Ts29.2- 1 | 200 μg | 15 | 4 h, 24 h, 48 h, |
| | 1323.2 1 | 10 MBq de TZ- 1 | 13 | 72 h et 144 h |

Tableau 21 : Les différents groupes de test pour l'étude de biodistribution de la TZ-1 dans le modèle HT29.

3. Imageries SPECT-CT

Après anesthésies à l'isoflurane (2,5 %, 2 :3 d'oxygène), deux animaux de chaque groupe ont été imagés, en corps entiers, par tomographie à émission monophotonique couplée à un scanner (SPECT-CT, nanoScan SM, Mediso, RS²D, France) à 1 h, 24 h, 48 h, 72 h et 144 h post injection de la TZ-1. Les acquisitions et le traitement d'images ont été réalisés grâce au logiciel InterView Fusion (Nucline, France).

4. Sacrifices et prélèvements

Les sacrifices et prélèvements ont été réalisés 4 h et 24 h p.i. pour le groupe contrôle et 4 h, 24 h, 48 h, 72 h et 144 h p.i. de la TZ-**1** pour les groupes ayant reçu le Ts29.2-TCO.

Dans tous les groupes la quasi-totalité des organes (i.e. sang, urine, cœur, poumons, foie, reins, pancréas, estomac, intestin, caecum, rate, côlon, ovaires, muscle gastrocnémien, os de la patte, thyroïde, ganglions lymphatiques axillaires, cerveau et la queue) ont été pesés et mis dans des tubes à scintillation pour être comptés dans un compteur gamma (Wizard, Perkin Elmer, France).

d. Modèle orthotopique A431-CEA-Luc

1. Évaluation de l'interaction 35A7-PEG_n-TCO / TZ-Cy5

Après 11 jours de croissance tumorale, 12 souris ont été réparties aléatoirement dans 4 groupes (n=3 souris par groupe) (**Tableau 22**). Les souris ont dans un premier temps été injectées en i.v. avec 0,3 nmol de 35A7-**0-4** suivi 24 h après par une injection i.p. de TZ-Cy5 (4 à 8 équivalents, respectivement au nombre de TCO portés par l'AcM). De la même façon que pour le modèle souscutané, les 35A7-**0-4** et la TZ-Cy5 ont été dilués respectivement dans du sérum physiologique ou dans du sérum physiologique contenant 0,5 % de DMSO. Des imageries en bioluminescence et en fluorescence ont été réalisées sur chaque animal respectivement soit à 2 h et 4 jours après injection soit à 2 h, 4 h et tous les jours pendant 4 jours. Au 4ème jour p.i. de la TZ-Cy5 les souris ont été sacrifiées et leurs tumeurs prélevées pour être imagées successivement en bioluminescence et en fluorescence.

| Condition | Groupe | Abréviation | Effectif |
|------------|-----------------------------|----------------|----------|
| | Contrôle 35A7 sans TCO | 35A7- 0 | 3 |
| Préciblage | 35A7-PEG ₀ -TCO | 35A7- 1 | 3 |
| | 35A7-PEG ₄ -TCO | 35A7- 2 | 3 |
| | 35A7-PEG ₁₂ -TCO | 35A7- 3 | 3 |

Tableau 22 : Les différents groupes de test pour les études d'interaction 35A7-PEG_n-TCO / TZ-Cy5 en préciblage sur le modèle A431-CEA-Luc.

2. Biodistributions des TZ-1-4

Dans une première étude de biodistribution deux conditions ont été évaluées. Les animaux ont tout d'abord reçus 50 µg de 35A7-1 soit en i.v. soit en i.p. suivi 24 h après par une injection i.p. de 10 MBg de TZ-1 (Tableau 23).

| Condition | Effectif | Mode d'injection 35A7- TCO | Doses |
|------------|----------|-------------------------------|-------------------------------------|
| Contrôle | 12 | i.p. | 3 MBq de TZ- 1 |
| Préciblage | 9 | i.v. | 50 μg de 35A7-1 |
| | | | 10 MBq de TZ- 1 (24 h après) |
| | 9 | in | 50 μg de 35A7- 1 |
| | 9 | i.p. | 10 MBq de TZ- 1 (24 h après) |

Tableau 23 : Répartition des groupes pour l'étude de biodistribution n°1 portant sur la TZ-1 dans le modèle de carcinose péritonéale d'origine colorectale. l.v. : intraveineuse. l.p. : intrapéritonéale.

Une seconde étude a par la suite été menée, afin de comparer les biodistributions de différentes structures de TZ-1-4. Les souris ont ainsi reçu dans un premier temps 50 µg de 35A7-1 en i.v. puis 10 MBq de TZ-1-4 en i.p. 24 h après (Tableau 24). Par ailleurs, les TZ-1-4 ont été administrées en i.p. sans injection préalable de 35A7-1 afin d'effectuer un suivi de biodistribution par imagerie SPECT-CT, aux temps 4 h et 24 h post injection avec des prélèvements d'organes au temps 24 h (n=3 par groupe).

| Tétrazine | Effectif | Dose | Activité molaire (GBq/ μmoles) |
|-----------|----------|--------|-----------------------------------|
| TZ-1 | 12 | 10 MBq | 12,2 |
| TZ-2 | 12 | 10 MBq | 13,9 |
| TZ-3 | 12 | 10 MBq | 9,3 |
| TZ-4 | 12 | 10 MBq | 7,4 |

Tableau 24 : Répartition des groupes pour l'étude n°2 comparant les biodistributions des TZ-1-4 dans le modèle de carcinose péritonéale d'origine colorectale.

3. Imageries SPECT-CT

Après anesthésie à l'isoflurane (2,5 %, 2 :3 d'oxygène), 2 à 3 animaux de chaque groupe ont été imagés, en corps entiers, par SPECT-CT à 2 h, 24 h, 48 h et 72 h p.i. des TZ-**1-4**. Le temps 144 h n'a pas pu être réalisé du fait d'un trop faible signal restant en lutécium (demi-vie : 6,8 jours). Les acquisitions et le traitement d'image ont été réalisés grâce au logiciel InterView Fusion (Nucline, France).

4. Sacrifices et prélèvements

Concernant la première étude de biodistribution, dans le groupe contrôle, les animaux ont été sacrifiés et leurs organes prélevés aux temps précoces 5 min 1 h et 3 h p.i. et à un temps plus tardif de 24 h p.i. de la TZ-1. Dans les groupes de PRIT les sacrifices et prélèvements ont eu lieu aux temps 24 h, 48 h et 144 h p.i. de la TZ-1.

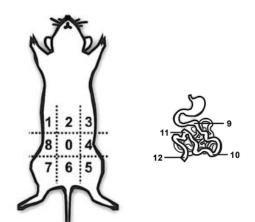
Pour la seconde étude de biodistribution les sacrifices et prélèvements ont eu lieu à 24 h, 48 h et 144 h p.i. des TZ-1-4.

Pour les deux études la quasi-totalité des organes (i.e. sang, urine, cœur, poumons, foie, reins, pancréas, estomac, intestin, caecum, rate, côlon, ovaires, muscle gastrocnémien, os de la patte,

thyroïde, ganglions lymphatiques axillaires, cerveau et la queue) ont été pesés et mis dans des tubes à scintillation pour être comptés dans un compteur gamma (Wizard, PerkinElmer, France).

5. Détermination du score de carcinose péritonéale (PCI) post-mortem

Le score de carcinose péritonéale (PCI) a été mesuré au cours de la nécropsie selon la méthode mise au point par Sugarbaker[66] et adapté chez le rongeur par Klaver et al.[262] (**Figure 49**). Ainsi, l'abdomen de la souris a été subdivisé en 13 régions et pour chacune d'entre elles un score allant de 0 à 3 a été attribué. Un score de 0 correspond à une absence de nodule tumoral visible dans la zone inspectée, 1 équivaut à de petits nodules de 1 à 2 mm localisés sur 1 ou 2 sites, 2 équivaut à des nodules de 2 à 4 mm localisés là encore sur 1 ou 2 sites et enfin un score de 3 met en évidence des tumeurs de taille supérieures à 4 mm ou bien des nodules plus petits mais qui sont localisés sur plus de 10 sites.



Régions:

- 0 Abdomen central
- 1 Quadrant haut droit
- 2 Région épigastrique
- 3 Quadrant haut gauche
- 4 Quadrant du milieu gauche
- 5 Quadrant bas gauche
- 6 Région pubienne
- 7 Quadrant bas droit
- 8 Quadrant du milieu droit
- 9 Jéjunum proximal
- 10 Jéjunum distal
- 11 Iléum proximal12 Iléum distal

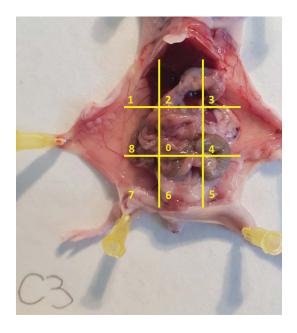
Score:

- 0 Aucune lésion visible
- Lésion de 1 à 2 mm (sur 1 ou 2 sites)
- 2 Lésion de 2 à 4 mm (sur 1 ou 2 sites)
- 3 Lésion de plus de 4 mm (ou sur plus de 10 sites)

Figure 49 : Détermination de l'index de carcinose péritonéale (PCI). Selon la méthode de Sugarbaker[66] adaptée chez le rongeur par Klaver *et al.*[262]

6. Dosimétrie

Afin d'évaluer la dosimétrie au sein des tumeurs péritonéales et dans les organes situés à proximité, un panel de cinq tumeurs a été prélevé de façon aléatoire sur chaque animal. Ces tumeurs ont été placées sur du papier millimétré, portant l'indication de la zone dans laquelle elles ont été prélevées, puis ont été photographiées afin de pouvoir mesurer les volumes tumoraux (**Figure 50**). Par la suite, chaque tumeur a été placée dans un tube de comptage indépendant afin de mesurer l'activité propre à chacune d'entre elles.



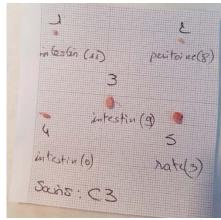


Figure 50 : Exemple de fiche de mesure de tumeurs péritonéales utilisée pour le calcul de dosimétrie. Le nom de l'organe où la tumeur a été prélevée ainsi que la zone PCI correspondante (entre parenthèses) sont indiqués en dessous de chaque tumeur. Le quadrillage millimétré permettrait d'évaluer les volumes tumoraux. La photographie montre comment la cavité péritonéale a été virtuellement divisée (en suivant la méthode de Klaver et al.[262]). A noter que les zones 9 à 12 ne sont pas notées sur la photographie car elles se trouvent sur des segments d'intestin et de côlon non visibles dans le cas présent.

7. Radioimmunothérapie préciblée de la carcinose péritonéale

i. Répartition des groupes de thérapie

L'étude de radioimmunothérapie préciblée de la carcinose péritonéale par chimie bioorthogonale a été effectuée en aveugle (*i.e.* l'expérimentateur principal ignorait la composition des groupes et ne savait donc pas si la cage observée avait reçu un traitement ou un placébo). Ainsi, 36 souris ont été réparties de façon aléatoire dans 8 groupes de test à raison de 6 animaux par groupe (**Tableau 25**). Douze souris ont reçu une injection placébo de NaCl, 6 ont été injectées uniquement avec 50 µg de 35A7-TCO, 6 uniquement avec 40 MBq de TZ-**1** en i.p. et 18 souris ont reçu dans un premier temps en i.v. 50 µg de 35A7 suivi 24 h après par l'injection i.p. de 10, 20 ou 40 MBq de TZ-**1** (*i.e.* PRIT 10 MBq, PRIT 20 MBq ou PRIT 40 MBq).

| Groupe | Effectif | Condition | Injections |
|--------------|----------|-----------|-------------------------------------|
| NaCl | 12 | Contrôle | 200 μL NaCl |
| 35A7-TCO | 6 | Contrôle | 50 μg de 35A7-TCO |
| TZ-1 40 MBq | 6 | Contrôle | 40 MBq de TZ- 1 |
| PRIT 10 MBq | 6 | Traitée | 50 μg de 35A7-TCO |
| | Ü | Traitee | 10 MBq de TZ- 1 (24 h après) |
| PRIT 20 MBq | 6 | Traitée | 50 μg de 35A7-TCO |
| PRIT 20 WIBY | Ü | Haitee | 20 MBq de TZ- 1 (24 h après) |
| PRIT 40 MBq | 6 | Traitée | 50 μg de 35A7-TCO |
| | O | rraitee | 40 MBq de TZ- 1 (24 h après) |

Tableau 25 : Répartition des groupes pour l'étude de thérapie préciblée de la carcinose péritonéale d'origine colorectale par chimie bioorthogonale. Les injections sont toutes réalisées en i.p. PRIT : Radioimmunothérapie préciblée.

ii. Mesure de la toxicité sanguine

La toxicité sanguine a été évaluée suivant deux paramètres : la variation de l'hématocrite et la baisse du nombre de leucocytes. Pour les mesures d'hématocrites, les souris ont tout d'abord été incisées à la pointe la queue puis 50 à 60 µL de sang ont été prélevés à l'aide d'un capillaire hépariné (Hirshmann, Allemagne). Les capillaires ont par la suite été centrifugés 15 min à 5000 g et mesurés pour faire le ratio du plasma sur le sang total. Le nombre de leucocytes a quant-à-lui été déterminé à l'aide d'un kit *in vitro* (Leuko-Tic, Bioanalytic, France). En bref, 20 µL de sang ont été prélevés au niveau de la veine caudale et ont été plongés dans une solution de bleu de Turquie pour entraîner l'hémolyse. Les leucocytes ont ainsi pu être comptés par microscope inversé à contraste de phase.

iii. Evaluation de la survie

Plusieurs critères concernant la physiologie, l'aspect et le comportement des animaux ont été sélectionnés pour mener à bien cette évaluation. Ils ont été choisis suivant les recommandations européennes en vigueur et sont en conformité avec les règles d'éthique du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Parmi les différents paramètres appliqués, trois d'entre eux ont été considérés comme « état critique » nécessitant l'euthanasie immédiate des animaux. Ainsi, une perte de poids supérieurs à 20 %, des tumeurs visibles et palpables sur l'abdomen entrainant une déformation de celui-ci ou bien encore la léthargie de l'animal figuraient parmi ces points limites. Des critères secondaires tels que l'aspect de la peau (signe d'anémie quand elle devient grise), l'aspect des yeux, le comportement social ou bien encore la réponse aux stimuli ont été utilisés en complément de cette mesure. Les animaux ont de fait été sacrifiés quand l'un des

points limites a été atteint ou bien lorsque le score total de l'ensemble des points de contrôle atteignait la somme de 9. Au sacrifice, une nécropsie a été réalisée sur chaque animal et une partie des tumeurs a été récupérée dans des zones aléatoires de la cavité péritonéale puis ont été soit fixées dans l'AFA soit congelées dans l'azote liquide pour d'éventuelles études histologiques ou biochimiques.

e. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec les logiciels StatView 2012 et XLSTAT. Sauf mention autre, les données continues sont exprimées par la moyenne ± écart moyen (SEM). Les valeurs obtenues *in vitro* ont été analysées soit par ANOVA soit *via* un test de Student apparié. Pour les données *in vivo*, les analyses ont été effectuées soit par ANOVA, soit *via* un test de Tukey, les survies étant réalisées quant-à-elles avec un test de Kaplan-Meier. Une valeur de p < 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

Partie 4 : Résultats

Au cours de cette thèse nous nous sommes intéressés à la mise en application de la PRIT par chimie bioorthogonale pour le traitement de la CP d'origine colorectale. Ces dix dernières années, de nombreuses réactions de chimie bioorthogonale ont été décrites, se distinguant principalement par leur stabilité et leur vitesse d'interaction. Nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur la réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse (IEDDA) qui met en jeu un AcM couplé à un trans-cyclooctene (TCO) d'une part et une sonde tétrazine (TZ) radiomarquée de l'autre. La faisabilité préclinique de l'interaction AcM-TCO/TZ a été démontrée ces dernières années, en imagerie[238] ainsi qu'en thérapie[244][245] dans des modèles de xénogreffes sous-cutanées de cancer du côlon. La preuve de concept de cette approche sur des tumeurs disséminées n'a en revanche pas encore été décrite à ce jour.

Les études que nous avons menées se sont articulées autour de deux axes, l'un consistant à étudier les conséquences des modifications d'AcMs sur leur immunoréactivité et l'autre portant sur la sélection de la meilleure sonde TZ radiomarquée dans le but de déterminer la configuration optimale pour la PRIT de la carcinose péritonéale.

Dans un premier temps nous nous sommes concentrés sur les modifications apportées aux anticorps, notamment en étudiant l'influence de la distance entre les AcMs et les TCO, à la fois sur la reconnaissance antigénique et sur l'interaction TCO/TZ (**Publication 1**). Pour cette étude des TZ fluorescentes ont été utilisées et la distance AcM-TCO a été pharmacomodulée par l'insertion d'espaceurs polyéthylènes glycol (PEG) de différentes longueurs (*i.e.* PEG₀, PEG₄ et PEG₁₂) afin d'étudier l'impact de ces modifications, *in vitro* et *in vivo*, dans deux modèles de CCR différents (souscutané et orthotopique). Nous avons ainsi montré que l'ajout de chaînes PEG sur l'AcM induit une baisse significative d'interaction TCO/TZ bien qu'elle n'entraîne pas de perte de reconnaissance antigénique. L'hypothèse avancée pour expliquer cette perte d'interaction TCO/TZ est qu'il y a un phénomène d'isomérisation de la double liaison *trans* pour former le composé *cis*-cyclooctène qui a une réactivité quasi nulle vis-à-vis de la TZ.

La seconde publication a porté sur l'étude *in vitro* de l'isomérisation *trans-cis* et a permis de démontrer que les AcM-PEG₀-TCO incubés dans du plasma murin subissaient une isomérisation de l'ordre de 90 % au bout de 5 h à 37 °C. Ce taux augmente parallèlement à la longueur de l'espaceur PEGylé (**Publication 2**). Une dernière approche sur un modèle cellulaire de sphéroïdes a permis d'évaluer l'influence du nombre de TCO greffés par AcM sur leur diffusion dans une structure 3D.

Dans la dernière partie seront exposés les études de biodistribution (élimination et fixation aux organes et aux tumeurs) des différentes sondes TZ radiomarquées ainsi que les essais de thérapie de la CP (**Publication 3**).

NB-1: Les renvois aux tableaux et figures pour les résultats présentés sous formes d'articles font référence aux numéros de figures (et tableaux) dans l'article en question.

NB-2: Dans les **publications 2 et 3** les données de caractérisation des molécules (supplementary informations) ne sont pas fournies.

Étude des modifications d'anticorps

L'étude de la pharmaco-modulation des AcMs dans le préciblage par chimie bioorthogonale sera présentée de façon détaillée dans le cadre de plusieurs articles (**Publications 1 et 2**, pages 113 à 144, **publication 3**, pages 154 à 168) ainsi que sous forme de résultats annexes (pages 145 à 148). Chaque article sera précédé d'une présentation synthétique de l'étude telle que réalisée ainsi que d'une synthèse des résultats obtenus.

I. Influence *in vitro* et *in vivo* de la PEGylation des AcMs-TCO sur deux modèles de cancer colorectaux (Publication 1)

1. Résumé de l'article

La stabilité des composants bioorthogonaux utilisés dans la réaction IEDDA est un pré-requis indispensable pour que la PRIT soit efficace. Si les TZ sont des composés stables, il n'en est pas de même pour les TCO. En effet, en 2013 l'équipe de Rossin a montré que les TCO conjugués aux AcM étaient désactivés progressivement dans les 72 heures suivant leur injection selon un phénomène d'isomérisation conduisant à la formation du composé CCO, inactif envers la TZ[239]. Cela a été démontré en comparant la réactivité vis-à-vis de la TZ d'AcMs-TCO contenant des espaceurs PEGylés -l'ajout des PEG étant supposée permettre une meilleure solubilité des conjugués ainsi qu'une meilleure accessibilité des TCO pour les TZ- à des AcMs-TCO sans PEG. Les auteurs ont ainsi mis en évidence que l'isomérisation des TCO en CCO était proportionnelle à l'ajout d'un espaceur PEG₁₂ entre l'AcM et les TCO, les rendant ainsi propices à réagir avec le cuivre (II) présent dans le sérum. Ils ont donc conclu que l'utilisation d'AcM-TCO sans espaceur PEGylé permettait de préserver la stabilité des TCO et était donc préférentielle pour des applications en PRIT. Une autre équipe a cependant montré en 2015 -in vitro, dans des modèles de cellules, d'AcM et de TZ différents- que les TCO ne subissaient pas d'isomérisation trans-cis mais étaient plutôt le siège de phénomènes d'interaction hydrophobes avec l'AcM, les rendant de fait inaccessibles aux sondes TZ, et que l'ajout d'espaceurs PEGylés, même de courte longueur permettait d'y remédier[250]. Face à ces résultats contradictoires concernant l'influence de la PEGylation des AcMs sur l'isomérisation nous avons jugé pertinent d'explorer ce premier point avant d'effectuer des évaluations avec les TZ radiomarquées. Les AcMs Ts29.2 et 35A7 ont été conjugués soit avec des TCO comportant des espaceurs PEGylés de différentes longueurs (i.e. PEG4 et PEG12) soit avec des TCO ne contenant pas de PEG (i.e. PEG0). A l'aide de sondes TZ fluorescentes nous avons évalué l'influence de la PEGylation sur l'interaction TCO/TZ *in vitro* et *in vivo* dans deux modèles de CCR différents, soit implanté en sous-cutané soit en orthotopique pour induire une dissémination péritonéale. Nous avons démontré, *in vitro* et *in vivo* dans les deux modèles, que l'ajout d'espaceurs PEGylés sur les AcMs diminue significativement l'interaction TCO/TZ.

2. Résultats : in vitro

a. Fraction immunoréactive

Nous avons tout d'abord vérifié la capacité des AcMs-PEG_n-TCO à reconnaître leurs cibles antigéniques par cytométrie en flux quantitative. Ainsi, nous avons pu observer qu'il n'y avait pas de différence significative dans le nombre d'Ag reconnus par les conjugués AcM-PEG_n-TCO, démontrant ainsi que les modifications apportées aux anticorps ne sont pas délétères pour l'interaction AcM/Ag. Cependant, les importantes modifications apportées par l'insertion du PEG₁₂ tendent à réduire la fraction immunoréactive de l'AcM-PEG₁₂-TCO, mais n'atteignent pas le seuil de significativité (**Fig. 3a-b**).

b. Interaction TCO/TZ

L'interaction entre les AcMs-PEG_n-TCO et les sondes TZ fluorescentes a été évaluée à la fois par cytométrie en flux et par immunofluorescence. Les résultats obtenus par cytométrie montrent que l'intensité de fluorescence est significativement plus faible avec les conjugués PEGylés qu'avec les AcMs-PEG₀-TCO (**Fig. 5**).

Les images confocales obtenues à l'aide des différents conjugués AcMs-PEGn-TCO ont permis de visualiser un signal au niveau membranaire, qui est absent dans la condition contrôle correspondant à l'incubation des cellules avec un AcM non-conjugué, confirmant ainsi l'interaction spécifique entre les AcMs-PEGn-TCO et les sondes TZ fluorescentes. Le signal membranaire a par la suite été quantifié à l'aide d'un algorithme fonctionnant avec le logiciel Fiji® (ImageJ). Par ailleurs, le nombre moyen d'unités PEGn-TCO greffés par AcM a été quantifié par MALDI-TOF et nous nous sommes aperçus que le nombre de groupement conjugués était sensiblement différent d'un PEG à l'autre. De façon à pouvoir comparer les conjugués AcM-PEGn-TCO entre eux, les intensités de fluorescence mesurées ont donc été normalisées par le nombre moyen de groupements greffés de façon à obtenir une valeur par TCO. Après normalisation, nous avons mis en évidence une diminution significative de l'intensité moyenne de fluorescence pour les AcMs-TCO PEGylés en comparaison avec celle des AcMs-PEG0-TCO, la plus forte diminution étant obtenue pour l'AcM-PEG12-TCO (Fig. 4).

3. Résultats : imageries en fluorescence in vivo

Deux modèles de CCR ont été utilisés pour évaluer l'interaction des conjugués AcM-PEG_n-TCO *in vivo*: un modèle de xénogreffe implanté en sous-cutané (*i.e.* cellules HT29) et un modèle orthotopique implanté en i.p. (*i.e.* cellules A431-CEA-Luc) permettant de reproduire la carcinose péritonéale. Une sonde TZ couplée à de la cyanine5 (Cy5) a été utilisée pour interagir avec les conjugués Ts29.2-PEG_n-TCO et 35A7-PEG_n-TCO.

a. Modèle sous-cutané HT29

Deux conditions de test ont été effectuées dans ce modèle. Dans la première, dite de ciblage direct, 50 µg de Ts29.2-PEGn-TCO et 0,3 nmoles de TZ-Cy5 fluorescente ont été préalablement incubés 10 min dans un tube avant d'être injectés en i.v. chez la souris. Dans la seconde modalité testée, les injections i.v. de 50 µg de Ts29.2-PEGn-TCO et de 0,3 nmoles de TZ-Cy5 ont été espacées de 24 h, ce qui correspond ainsi au délai du préciblage. Dans les deux conditions les souris ont été imagées à l'aide d'un IVIS Spectrum (Plateforme IVIA, Clermont-Ferrand) à différents temps post injection (p.i.) de la TZ-Cy5 (i.e. 24 h, 48 h, 72 h et 144 h). Les animaux ont été sacrifiés au 7ème jour p.i. et les organes principaux ainsi que les tumeurs ont été prélevés pour être imagés. En ciblage direct, les images obtenues ont montré un fort signal fluorescent au niveau tumoral, confirmant la capacité de reconnaissance spécifique des antigènes par les conjugués Ts29.2-PEG_n-TCO/TZ-Cy5 (Fig. 6.a). En préciblage, un signal fluorescent spécifique a été observé au niveau tumoral, démontrant l'interaction Ts29.2-PEG_n-TCO/TZ-Cy5 in vivo mais le signal obtenu était d'une intensité environ deux fois plus faible qu'en ciblage direct (Fig.6.b-c). Par ailleurs, un signal non spécifique a été observé au niveau des ganglions lymphatiques axillaires, dans les deux conditions de test, dû aux propriétés intrinsèques de la TZ-Cy5, un composé peu soluble dans le sang qui s'est retrouvé capté dans la lymphe au moment de l'injection i.v. Les images ex vivo des tumeurs et des organes sains a confirmé l'interaction spécifique entre les conjugués Ts29.2-PEG_n-TCO et les sondes TZ-Cy5 (Fig. 6.d). Les intensités de fluorescence mesurées au niveau tumoral et rapportées par le nombre de TCO greffé par AcM a démontré que la PEGylation des Ts29.2-TCO diminuait l'interaction TCO/TZ.

b. Modèle orthotopique disséminé A431-CEA-Luc

Les cellules A431-CEA-Luc sont co-transfectées pour exprimer à la fois l'antigène carcinoembryonnaire (i.e. ACE ou CEA) et la luciférase, ce qui permet de pouvoir effectuer un suivi de ces cellules une fois injectées chez l'animal grâce à l'injection de luciférine, un substrat détectable par bioluminescence. Ainsi des images ont été effectuées à intervalles réguliers à partir de 24 h post xénogreffe jusqu'au jour du sacrifice et ont permis de confirmer la prise de greffe tumorale au sein de la cavité péritonéale, validant ainsi le modèle orthotopique (**Fig. 7.a**). Vingt-et-un jours après la xénogreffe, les souris ont reçu une première injection i.v. de 50 μg de conjugués 35A7-PEG_n-TCO suivie 24 h par l'injection i.p. de 0,3 nmoles de TZ-Cy5 (**Fig. 7.b**). Les images obtenues montrent une interaction spécifique des 35A7-PEG_n-TCO et de la TZ-Cy5 au niveau péritonéal, confirmée par l'imagerie *ex vivo* des tumeurs à la fois en bioluminescence et en fluorescence (**Fig. 7.d**). La quantification de la fluorescence a été réalisée sur l'ensemble de la cavité péritonéale et a démontré là encore que la PEGylation des 35A7-TCO était délétère pour l'interaction TCO/TZ (**Fig. 7.c**).

4. Discussion

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'influence de la PEGylation des AcMs-TCO à la fois sur la reconnaissance des antigènes et sur l'interaction TCO/TZ. La conjugaison des PEG_n-TCO sur les AcMs s'effectue de façon aléatoire sur les résidus lysine des parties constantes et variables des IgG, risquant potentiellement de diminuer l'affinité des AcMs pour leurs antigènes respectifs, ce qui réduirait à termes l'efficacité thérapeutique de la PRIT. L'évaluation in vitro des conjugués AcMs-PEG_n-TCO a ainsi démontré que ni les conditions de couplage et de purification des AcMs ni l'addition d'un grand nombre de groupements PEG_n-TCO n'altérait de façon significative la fraction immunoréactive des AcMs conjugués. De plus, la PEGylation des AcMs-TCO a induit une diminution significative de l'interaction TCO/TZ sur les deux modèles cellulaires, suggérant la formation d'isomères CCO comme décrits par l'équipe de Rossin[238]. Les résultats contradictoires avec ceux obtenus in vitro par l'équipe de Rahim[250] pourraient s'expliquer par les modèles utilisés, qui sont différents, et également par le fait que nous ayons normalisé les intensités de fluorescence par le nombre moyen de PEG_n-TCO conjugué. L'isomérisation TCO/CCO est supposée être rapide dans les systèmes biologiques du fait de l'interaction des TCO avec le cuivre (II) sérique qui induirait un changement de conformation[238]. Nous avons ainsi comparé in vivo deux conditions différentes (i.e. ciblage direct vs préciblage) afin d'évaluer l'impact des interactions biologiques sur la réactivité des PEG_n-TCO. Il en résulte qu'en ciblage direct aucune différence statistique n'a été retrouvée entre les intensités de fluorescence des différents conjugués Ts29.2-PEG_n-TCO tandis qu'en préciblage la PEGylation a induit une perte d'interaction entre les Ts29.2-PEG_n-TCO et la TZ-Cy5 confortant ainsi l'hypothèse de l'isomérisation des TCO en CCO. Par ailleurs, les mêmes observations ont été réalisées sur le modèle orthotopique disséminé.

5. Conclusion

Nous avons démontré à la fois *in vitro* et *in vivo*, sur deux modèles de CCR différents que la PEGylation des conjugués AcMs-TCO était délétère pour l'interaction TCO/TZ induisant probablement une isomérisation des TCO en composé CCO non réactif. Le conjugué 35A7-PEG₀-TCO a donc été sélectionné comme étant le plus approprié pour les études de biodistributions et de PRIT de la carcinose péritonéale qui ont été effectuées par la suite avec les sondes TZ radiomarquées.

PUBLICATION 1

Antibody PEGylation in bioorthogonal pretargeting with *trans*-cyclooctene/tetrazine cycloaddition: *in vitro* and *in vivo* evaluation in colorectal cancer models

A. Rondon*, N. Ty*, J-B. Bequignat, M. Quintana, A. Briat, T. Witkowski, B. Bouchon, C. Boucheix, E. Miot-Noirault, J-P. Pouget, J-M. Chezal, I. Navarro-Teulon, E. Moreau and F. Degoul

* co-authors

Scientific Reports, 2017

Doi: 10.1038/s41598-017-15051-y



Received: 23 May 2017 Accepted: 16 October 2017 Published online: 02 November 2017

OPEN Antibody PEGylation in bioorthogonal pretargeting with trans-cyclooctene/tetrazine cycloaddition: in vitro and in vivo evaluation in colorectal cancer models

Aurélie Rondon^{1,3}, Nancy Ty¹, Jean-Baptiste Bequiqnat¹, Mercedes Quintana¹, Arnaud Briat¹, Tiffany Witkowski¹, Bernadette Bouchon¹, Claude Boucheix², Elisabeth Miot-Noirault¹, Jean-Pierre Pouget³, Jean-Michel Chezal¹, Isabelle Navarro-Teulon³, Emmanuel Moreau¹ & Françoise Degoul 101

Bioorthogonal chemistry represents a challenging approach in pretargeted radioimmunotherapy (PRIT). We focus here on mAb modifications by grafting an increase amount of trans-cyclooctene (TCO) derivatives (0 to 30 equivalents with respect to mAb) bearing different polyethylene glycol (PEG) linkers between mAb and TCO (i.e. PEG_0 (1), PEG_4 (2) and PEG_{12} (3)) and assessing their functionality. We used colorectal xenograft (HT29/Ts29.2) and peritoneal carcinomatosis (A431-CEA-Luc/35A7) as tumor cells/ mAbs models and fluorescent tetrazines (TZ). MALDI-TOF MS shows that grafting with 2,3 increases significantly the number of TCO per mAb compared with no PEG. In vitro immunofluorescence showed that Ts29.2 and 35A7 labeling intensity is correlated with the number of TCO when using 1,3 while signals reach a maximum at 10 equivalents when using 2. Under 10 equivalents conditions, the capacity of resulting mAbs-1-3 for antigen recognition is similar when reported per grafted TCO and comparable to mAbs without TCO. In vivo, on both models, pretargeting with mAbs-2,3 followed by TZ injection induced a fluorescent signal two times lower than with mAbs-1. These findings suggest that while PEG linkers allow a better accessibility for TCO grafting, it might decrease the number of reactive TCO. In conclusion, mAb-1 represents the best candidate for PRIT.

Radioimmunotherapy (RIT) consists in targeting specific antigens overexpressed by cancer cells with radiolabeled monoclonal antibodies (mAbs), ensuring selective tumor irradiation.

Some preclinical studies on colorectal cancer (CRC) and peritoneal carcinomatosis (PC) demonstrated that RIT approaches induced a significant effect alone or combined with either mAbs targeting transmembrane proteins 1-3 or chemotherapy 4,5. PC is a common evolution in patients with CRC and often leads to a poor survival prognosis⁶. Last years, current PC treatment, cytoreductive surgery combined with intraperitoneal chemotherapy, has notably improved the 5-year overall survival rate that still remains below 50% and strongly depends on the peritoneal carcinomatosis index (PCI) - from 44% if PCI < 6 to 7% if PCI > 17^{7,8}. The limitation of current PC treatments thus supports the development of new targeted therapies such as RIT.

¹Université Clermont Auvergne, INSERM U1240, Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, F-63000, Clermont Ferrand, France. ²Université Paris Sud, INSERM U935, Bâtiment Lavoisier, 14 Avenue Paul-Vaillant-Couturier, F-94800, Villejuif, France. ³Institut de Recherche en Cancérologie (IRCM), INSERM U1194 – Université Montpellier – ICM, Radiobiology and Targeted Radiotherapy, F-34298, Montpellier, France. Aurélie Rondon, Nancy Ty, Emmanuel Moreau and Françoise Degoul contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.D. (email: francoise.degoul@inserm.fr)

Although RIT presents good efficiency in the treatment of non-Hodgkin lymphomas9 it still remains not favoured in clinics for the treatment of solid tumors. Some practical points (cost, required radiopharmacy, arising of specific chemotherapies) limit the generalization of RIT, but the main problem lies in bone marrow toxicity. Indeed, the long half-life of radiolabeled mAbs in blood can induce hematotoxicity especially for solid tumors, which can be less sensitive as the mAbs diffuse poorly^{10,11}. Thereby, some strategies including pretargeting (PT) have been developed to overcome these drawbacks. PT consists in delaying the injection of radioactivity from that of the mAb. This should allow higher activities injected leading to higher tumor dosimetry¹². Several PT systems have been investigated since the last decades, such as streptavidin-biotin¹³ or bispecific antibodies¹⁴, all with some disadvantages, like immunogenicity or engineering difficulties respectively. Recently, a different PT system based on bioorthogonal chemistry features has been developed: mAbs' lysine residues are modified by addition of trans-cyclooctene (TCO) moieties that can be specifically recognized by a radiolabeled tetrazine (TZ) probe¹⁵. This system leads to low mAb modifications by addition of small chemical groups inert towards macrobiological molecules thus decreasing immune system activation 16. Through an inverse electron-demand [4+2] Diels-Alder (IEDDA) cycloaddition, TZ bind covalently to TCO with fast reaction kinetics ($k_2 = 2000$ M^{-1} s⁻¹ methanol/water (9:1))¹⁵ allowing to use low concentrations of conjugated mAbs. The feasibility of IEDDA cycloaddition in vivo was first demonstrated by Rossin and co-workers with imaging of colon cancer xenografts¹⁷. Mice bearing tumors first received CC49-TCO mAb followed by 111In-DOTA-TZ one day later. These approaches were then developed for PET imaging on mice bearing SW1222 colorectal carcinoma xenografts by pretargeting with huA33-TCO mAb followed by 64 Cu-DOTA-PEG $_{7}$ -TZ or 64 Cu-SarAr-TZ 24, 48 or 120 h later, revealing high specific tumor targeting and very good contrasts¹⁸. Recently, pretargeting-radioimmunotherapy (PRIT) in preclinical murine models of pancreatic cancer, using an anti-CA19.9 mAb, 5B1-TCO, induced a rapid and persistent uptake in tumors from 4 h to 120 h after injection of ¹⁷⁷Lu-DOTA-PEG₇-TZ probe having a rapid clearance from non-targeted tissues¹⁹. This approach resulted in significant growth delay and regression of BxPC3 xenografts for a single dose injected higher to 29.6 MBq thus demonstrating the efficiency of PRIT system¹⁹

This efficient strategy may however suffer from some drawbacks on the modified mAb especially the potential isomerization of functional TCO to more stable but inactive *cis*-cyclooctene (CCO)²⁰, the capacity of modified antibody to react with cognate antigens, and finally the availability of TCO-mAb conjugates towards TZ. Indeed, it was recently highlighted that TCOs could possibly be masked by hydrophobic interactions with mAb²¹ and that insertion of polyethylene glycol (PEG) linkers between mAb and TCO increased more than 5-fold the ability for TZ to bind TCO moieties without altering mAb binding. Moreover, for hydrophobic fluorophores, addition of short PEG linkers has been shown to reduce aggregation of mAb conjugates²². Furthermore, PEGylation of drugs and proteins is well known to increase water solubility, to reduce immunogenicity and to improve both pharmacokinetics and pharmacodynamics properties^{23–25}. While addition of PEG linkers on TCO-mAbs may improve their solubility and increase their tumor uptake, the rational concerning the appropriate length of PEG remains unclear.

We here address the consequences of mAbs modifications by PEG_n - TCO_n on both antigen and TZ recognition to determine the best one for PRIT. First, modified mAbs harbouring a growing number of PEG_n - TCO_n were compared according to grafting yield, recovery rate and *in vitro* functionality as alkylation can induce protein aggregation. Secondly, as PEGylated linkers on mAb-TCO can influence the reactivity of TCO toward TZ probes, three PEG lengths (PEG_0 -TCO (1), PEG_4 -TCO (2) and PEG_{12} -TCO (3)) were studied both *in vitro* and *in vivo* on Ag recognition in direct targeting and pretargeting experiments.

We focused our work on two different non-internalizing mAbs, anti-TSPAN8 mAb (Ts29.2)²⁶ and anti-CEA mAb (35A7)²⁷, harbouring **1–3** structures. Studies were either performed on a xenograft model -HT29 cells expressing TSPAN8- and on an orthotopic peritoneal carcinomatosis model -A431-CEA-Luc expressing CEA-. Assessments were made using fluorescent TZ probes -allowing optical investigations- and represent the first step for further PRIT studies on disseminated tumors.

Results

Modifications of mAbs: number of TCO grafted, reactivity and stability. Assessment of mAbs-1–3 (Fig. 1a) masses (m/z) by MALDI-TOF MS allowed determining the number of TCO_n -PEG $_n$ moieties grafted on mAbs (Fig. 2 and Supp. Fig. S1). This number was similar among the experiments ($n \ge 3$) and ranged from 1.3 to 16.0 for Ts29.2 and from 0.6 to 13.0 for 35A7. Interestingly, for the same number of equivalents of 1,3 the number of moieties grafted on mAbs increased significantly with the longest PEG spacer for both mAbs. All mAb-1–3 were recovered with good yields after grafting and size exclusion chromatography, except Ts29.2–2 for which there was a significant decrease when using 15, 20 and 30 equivalents of NHS ester 2 (62, 40 and 11% respectively).

We quantified the membrane fluorescence intensity with a home designed algorithm (Supp. Methods). The measured immunofluorescence intensity values for Ts29.2-1-3 on HT29 (Fig. 2) increased with PEG0 and PEG12 according to the number of TCO grafted. In contrast, with PEG4 the signal reached a maximum intensity at 10 equivalents before decreasing. The same observation was made with 35A7-1-3 (Supp. Fig. S1) on A431-CEA-Luc cells with lower signal intensity than TS29.2. According to these data, we have chosen to test mAbs modified with 10 equivalents of 1-3 for future experiments. However, as the number of 1,2 or 3 grafted may vary, we then normalized signal intensities by the mean of TCO engrafted. We have also assessed that mAbs-1-3 were stable and still reactive either after freezing at $-20\,^{\circ}\text{C}$ or storage at $4\,^{\circ}\text{C}$ over at least a month (Supp Fig. S2).

Antigen recognition by modified mAbs. In our conditions, about 150,000 TSPAN8 membrane antigens were recognized by Ts29.2 mAbs (Fig. 3a). There is no significant difference in the number of TSPAN8 antigens recognized by the unprocessed Ts29.2 (Stock), Ts29.2 processed without TCO addition (TCO 0) and the modified Ts29.2-1-3. Concerning the A431-CEA-Luc cells, nearly 80,000 CEA antigens were recognized by 35A7 mAbs

n = 4

Ts29.2-1: Ts29.2-PEG₀-TCO
35A7-1: 35A7-PEG₀-TCO
35A7-2: 35A7-PEG₁₂-TCO
35A7-3: 35A7-PEG₁₂-TCO
35A7-3: 35A7-PEG₁₂-TCO
35A7-3: 35A7-PEG₁₂-TCO
35A7-3: 35A7-PEG₁₂-TCO

Figure 1. Pretargeting components. (a) Ts29.2 and 35A7 mAbs conjugates 1–3. (b) Structures of TCO1b 1 and TCO-NHS esters derivatives 2–3.

(Fig. 3b). As obtained with Ts29.2 there was no significant difference in the number of CEA antigens recognized by 35A7-1-3 compared to the unprocessed or unmodified one. However, there was a decrease for mAbs-3 intensities which may be due to some aggregations already described with highly modified mAbs.

In vitro functional assessment of mAbs-1-3. Targeting of Ts29.2-1-3 on HT29 cells (Fig. 4a) and 35A7-1-3 on A431-CEA-Luc cells with both fluorescent TZ-Cy3 and polyclonal anti-mouse Ab-FITC showed an overlay of fluorescent membrane signal (merged images), demonstrating a specific interaction between TCO groups and TZ. This comforts that modifications of mAbs-1-3 did not alter their antigen recognition. Absence of signal with TZ-Cy3 in control cells incubated with unmodified mAbs confirmed the specificity of TCO/TZ interaction. Same observations were made with 35A7-1-3 on A431-CEA-Luc cell model (Supp. Fig. S3). Intensity signals obtained with mAb-2,3 on both cell lines showed a decrease of fluorescence compared to non-PEGylated mAbs (Fig. 4b). ROI quantification was made on the entire image and was reported per TCO (Fig. 4c, D). We observed a significant decrease of signal intensity with mAbs-2 and mAbs-3 compared to mAbs-1, for both Ts29.2 and 35A7. Results showed that the longer the PEG, the lower the signal. In addition, MFI assessed by flow cytometry using TZ-5-FAM (Fig. 5a, b) also showed a significant decrease according to the PEG linker length when normalized with the number of TCOs.

In vivo functional assessments of mAbs-1-3 pretargeting. HT29 xenograft model. Tumors were located in the right flank and were all homogeneous in size and shape. Direct targeting (DT) of modified Ts29.2 (Fig. 6a and Supp Fig. S4) showed a specific signal in tumors persistent up to 7 days post injection. ROI average radiance reported to the number of TCO grafted on mAbs (Fig. 6c) demonstrated no significant difference between PEGylated mAbs and the non-PEGylated one. In pretargeting (PT) groups (Fig. 6b) we first obtained for each mAb a significant signal in lymph nodes (LN), which progressively diminished over time after TZ-Cy5 injection. The same observation was made in the control group and in DT groups 24 h post injection (Supp Fig. S4) suggesting some venous extravasation phenomenon due to the TZ-Cy5 hydrophobic structure. After quantification of ROI signal in LN (Supp. Fig. S5) we found that the venous extravasation of TZ-Cy5 in PT groups was similar with all mAbs and therefore had no impact on the interpretation of the results.

In vivo fluorescent imaging of PT groups also showed a specific signal located in the tumor (Fig. 6b and Supp. Fig. S6) visible on imaging up to 3 days after TZ-Cy5 injection and quantifiable until the 7^{th} day of experimentation. ROI average radiance per TCO (Fig. 6c) demonstrated that the signal is significantly higher for Ts29.2-1 than with PEG₄ and PEG₁₂. In addition, signal intensity in PT is two times lower than in DT, which could be attributable to the bioavailability of the hydrophobic TZ-Cy5 when injected separately from mAbs-TCO.

Peritoneal carcinomatosis model. Bioluminescence imaging during 14 days demonstrated that A431-CEA-Luc cells have gradually invaded the entire peritoneal cavity, thereby validating PC model (Fig. 7a). Mice necropsy allowed scoring the peritoneal carcinomatosis index (PCI) (Supp. Fig. S7), with a mean value around 8.9 ± 0.6 (TCO $_0$: 9.0 ± 0 ; PEG $_0$: 9.3 ± 0.9 ; PEG $_4$: 9.3 ± 0.9 ; PEG $_1$: 8.0 ± 0.7). Homogeneity of PCIs ensured a good

| | of equivalent of TCO ed in the reaction | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 30 |
|-----------------------------------|---|--------|-----------|-----------|-----------|--------------|--------------|
| Ts29.2 PEG ₀ TCO | Mean yield (%) | 84 | 82 | 76 | 73 | 79 | 72 |
| | Mean number of grafted TCO | 0[0-0] | 1.8 [2-3] | 3.5 [1-6] | 4.6 [2-7] | 5.3 [3-8] | 6.4 [4-9] |
| | lFimaging | 4.00 | 21.31 | 31.17 | 42.43 | 53.33 | 69.35 |
| | Mean yield (%) | 86 | 77 | 73 | 62 | 40 | 11 |
| Ts29.2 PEG ₄ TCO | Mean number of engrafted PEG ₄ -TCO | 0[0-0] | 1.3 [0-2] | 2.9 [1-5] | 4.1 [2-6] | 5.6 [4-7] | nd |
| | lFimaging | 0.98 | 20.26 | 59.01 | 58.74 | 40.66 | 29.75 |
| | Mean yield (%) | 73 | 81 | 78 | 75 | 92 | 89 |
| Ts29.2 PEG ₁₂ | Mean number of engrafted PEG ₁₂ -TCO | 0[0-0] | 1.3 [1-2] | 3.0 [2-4] | 7.4 [7-8] | 11.3 [10-13] | 16.0 [14-17] |
| TCO | lFimaging | 0.78 | 11.81 | 29.49 | 47.62 | 45.86 | 55.93 |

Figure 2. Relation between the number of TCO grafted on Ts29.2 mAbs and their functionality. Number of TCO grafted was determined by MALDI-TOF MS and is expressed as mean values [min-max], n=3 independent experiments. Yields correspond to the mAbs recovery after grafting process. All IF imaging were made with the same settings. White numbers are mean fluorescence intensity quantified on the corresponding IF imaging. Scale bar: $50\,\mu m$.

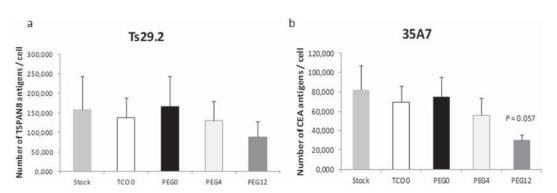


Figure 3. (a-b) Functionality of mAbs-1–3 towards their cognate antigens. Number of TSPAN8 (a) or CEA (b) antigens detected by Ts29.2 or 35A7 mAbs conjugates 1–3. All samples were made in triplicates in three independent experiments. Statistical analyses were made using 2-paired Student T-test. P-value < 0.05 was considered significant.

repeatability of PC xenografts among the different groups, consolidating the obtained results. *In vivo* fluorescent imaging of PT of 35A7 modified mAbs 24h, 48h and 72h after TZ-Cy5 labeling resulted in a specific signal in PC tumors (Fig. 7b and Supp. Fig. S8). In addition, quantification of ROI average radiance per TCO on the entire peritoneal cavity (Fig. 7c) demonstrated a significant higher fluorescent signal with 35A7-1 compared to 35A7-2,3 as obtained with Ts29.2 modified mAbs on HT29 model. Representative *ex vivo* imaging of PC tumors

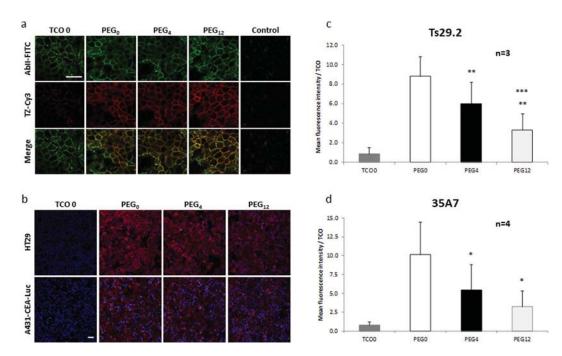


Figure 4. (a) Reliability of Ts29.2-1-3 to recognize their target and assessment of their interaction with TZ-Cy3 using confocal microscopy. HT29 cells were first incubated with $10\,\mu g/mL$ of Ts29.2 processed without TCO addition (TCO 0), Ts29.2-1 (PEG₀), Ts29.2-2 (PEG₄) or Ts29.2-3 (PEG₁₂) and then with both 1/500 AbII-FITC_(495-519 nm) and 0.02 mM TZ-Cy3_(550-570 nm). Control condition corresponds to incubation without Ts29.2. Green signal corresponds to AbII-FITC labeling and red signal to TZ-Cy3 labeling. Green and red images were merged to show signal co-localization. Scale bar: 30 μm. (b-d) Quantification of mean fluorescence intensity per TCO for mAb-1-3. (b) Immunofluorescence of HT29 or A431-CEA-Luc cells incubated with mAbs-1-3 and TZ-Cy3_(550-570 nm). Merged images of red: TZ-Cy3 cell membrane signal and blue: nucleus stained with DAPI. Same settings were applied for all images. Scale bar: 50 μm. Each well was imaged 3 times at random locations; all Z sections every 2 μm per field were imaged. (c-d) Graphs of fluorescent signal intensity obtained after ROI quantification by ImageJ software on HT29 (c) (n = 3 different experiments), or A431-CEA-Luc (d) (n = 4 different experiments). ROI were 3D-automatically computerized on the entire image and were then reported per TCO. Statistical analysis was made using two-paired Student T-test. *P < 0.05: PEG₀ vs PEG₄ and PEG₁₂, ***P < 0.01: PEG₀ vs PEG₄ and PEG₄ vs PEG₁₂, ***P < 0.0002: PEG₀ vs PEG₁₂.

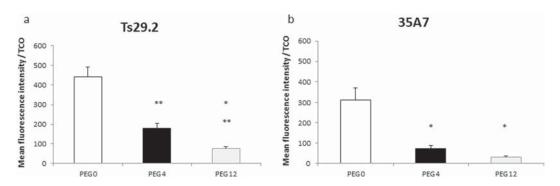


Figure 5. (a-b) Assessment of mAbs-1-3 capacity to interact with TZ-5-FAM using flow cytometry. Values are mean fluorescence intensity (MFI) \pm SEM reported per the number of TCO grafted on each mAb (n = 3 independent experiments). Statistical analysis was made using two paired Student T-test. P < 0.05 was considered significant. *P < 0.05: PEG₀ vs PEG₄ and PEG₁₂ and PEG₁₂; **P < 0.01: PEG₀ vs PEG₄ and PEG₁₂.

(Fig. 7d) assessed successively by bioluminescence and fluorescence showed an overlay of signals thus confirming the specific targeting of tumor antigens by the different modified 35A7 mAbs as observed using *in vivo* imaging.

Discussion

The aim of this study was to evaluate the effects of mAb modifications on both antigen recognition and their ability to be recognized following binding. These modifications were introduced randomly on lysine residues presents

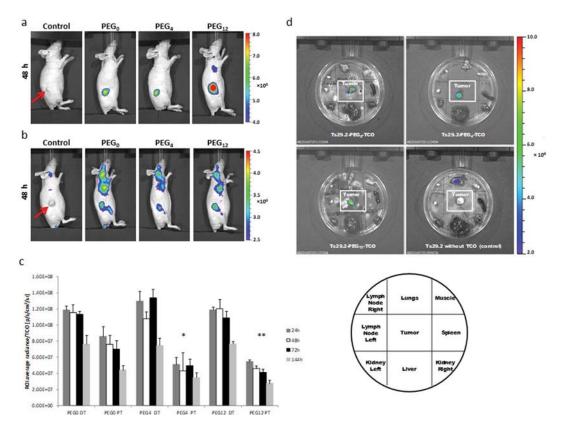


Figure 6. *In vivo* assessments of Ts29.2-1-3 on HT29 xenograft model. Figures represent *in vivo* imaging 48 h post TZ-Cy5 or mAb-TCO/TZ-Cy5 injections. Red arrows show the location of the tumor. (a) Direct targeting with Ts29.2 without TCO (Control) or Ts29.2-1-3 after preliminary incubation 30 min with TZ-Cy5 in tube. (b) Pretargeting with Ts29.2 without TCO (Control) or Ts29.2-1-3, TZ-Cy5 was injected 24 h after mAbs. (c) Graph of ROI average radiance reported per the number of TCO of each mAb. Results are expressed as mean \pm SEM (n = 3). Statistical analysis was made using one-way ANOVA. *P < 0.01: PEG₀ PT vs PEG₄ PT; **P < 0.005: PEG₀ PT vs PEG₁₂ PT. (d) Representative *ex vivo* imaging of tumors between other tissues. The scheme shows the repartition of the organs in the Petri box. Lymph nodes were sampled in the axillary region. Muscle corresponds to the left gastrocnemius.

all along the two IgG chains. This should therefore modify their capacity to recognize the targeted protein or to be recognized by antibodies or ligands.

First, we found that addition of PEG spacers on mAbs-TCO enhanced the number of moieties grafted on mAbs, especially for the longest PEG with significant higher values for both Ts29.2 and 35A7. One explanation might be the steric hindrance caused by TCO1b 1 which could hamper the accessibility to lysines while the TCO-PEG_n-NHS alkyl chain structure could reduce this effect between adjacent groups in the folded protein. The yields of 35A7-1-3 conjugates were stable while those of Ts29.2-1,3 generally ranged at 70–90%. Surprisingly, yield of Ts29.2-2 fell around 10% suggesting an aggregation of mAbs. It would be interesting to determine precisely on which lysine activated esters 1, 2 and 3 are grafted in order to assess if that would influence mAbs functionality, contributing to the knowledge of grafting mechanisms. This question will be explored in further experiments.

In vitro evaluation using quantitative flow cytometry demonstrated on both models that purification process and mAbs' modifications by addition of **1–3** do not alter their ability to recognize cell membrane antigens. In both immunofluorescence and CMF experiments PEGylated mAbs presented signal intensities significantly lower than the non-PEGylated one, especially for the longest PEG. This suggests that the interaction between TCO and TZ was altered by PEGylation. In contrast, Rahim and his team demonstrated *in vitro* that 90% of TCOs grafted on mAb were unreactive due to hydrophobic interactions with mAb, a phenomenon which could be overcome by increasing the distance between TCO and mAb through addition of several PEG units (PEG₄ and PEG₂₄), therefore demonstrating the longer the PEG the higher the signal²¹. This discrepancy can be explained by the difference in the mAb/TCO structures used and quantifications based on the global signal (for Rahim and his team) compared with normalized intensity to TCO (our study). However, addition of PEG linkers between mAb and TCO (PEG₁₂) was suggested to increase CCO isomer formation²⁰ supporting our observations.

Near infrared (NIR) fluorescence imaging on mice bearing human HT29 xenograft showed a specific signal localized in tumors which confirmed the ability of TZ-Cy5 to bind TCO directly *in vivo* as previously reported with radiolabeled TZ probes^{17,19,28,29}. The high signal in axillary LN -regardless of the mAb tested- after TZ-Cy5 IV injection can be explained by extravasations in lymphatic system due to the lipophilic properties of Cy5-TZ conjugates leading to a poor solubility. On A431-CEA-Luc model indeed there was no TZ-Cy5 signal located

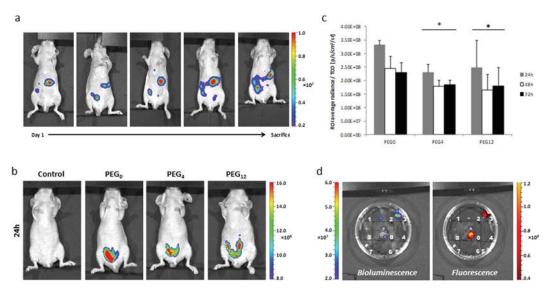


Figure 7. (a) Bioluminescence imaging of PC tumor xenografts. PC induced by IP xenografts with 1.10^6 A431-CEA-Luc cells. Imaging was made 10 min post IP injection of $300\,\mu\text{L}$ of luciferin ($15\,\text{mg/mL}$). Representative mouse imaging from day 1 post cell engraft to sacrifice. (**b-d**) $35\,\text{A7-1-3}$ pretargeting on PC tumors. (**b**) Pretargeting with $35\,\text{A7-1-3}$. Figure represents fluorescent *in vivo* imaging $24\,\text{h}$ post IP injection of TZ-Cy5. Imaging for $48\,\text{h}$ and $72\,\text{h}$ after IP injection of TZ-Cy5 are in supplementary data 88. (**c**) *In vivo* ROI average radiance of the entire peritoneal cavity, reported to the number of TCO of each modified mAb. Statistics were made using one-way ANOVA. *P < 0.05: PEG $_0$ vs PEG $_4$ and PEG $_{12}$. (**d**) *Ex vivo* bioluminescent and fluorescent imaging of PC tumors. White numbers represent the 9 main peritoneal regions, as reported by Klaver *et al.* 36 .

in LN after IP injection of the TZ probe highlighting the importance of the injection mode. To our knowledge, none of the other imaging or PRIT studies made using the TCO/TZ cycloaddition detected any signal in LN. This confirms that the LN signal in our NIR fluorescence imaging is not specific and was due to the organic cyanine fluorophore, not to the TZ itself.

Comparison between DT and PT experiments demonstrated a two times lower signal for PT, which can be caused by TZ availability. Interestingly, this was reported in another pretargeting approach of LS-174T colon xenografts imaging with anti-CEA x anti-hapten mAb using the TF2 dock and lock system³⁰. Biodistribution studies highlights that PT induced a lower tumor uptake and resulted in specific tumors targeting and minimal toxicity in bone marrow compared to DT. However, this PT system caused some nephrotoxicity which would imply to limit the dose injected for therapy in clinic. Nephrotoxicity was also observed in other PRIT strategies using the avidin/biotin system on colon PC tumors with a dual probe^{99nt}Tc-HYNIC-lys(Cy5.5)-PEG4-biotin for SPECT/CT and *ex vivo* NIR fluorescence imaging³¹. The high % of ID in kidneys observed in this PT approach can be acceptable for imaging but is pejorative for RIT. In contrast, in our models, we did not notice any fluorescence in vital organs (except the LN) thus reinforcing the safety of bioorthogonal PRIT strategy. In addition, other studies using TCO/TZ cycloaddition with radiolabeled TZ have demonstrated a rapid renal clearance of the TZ probe in few hours and residual radiation doses in kidneys comparable with the other non-targeted organs, thus comforting our NIR fluorescence imaging results^{17,19,32}.

Some TCO moieties could be deactivated *in vivo* through isomerization to the unreactive *cis*-cyclooctene (CCO) isomer due to its interactions with copper-containing proteins^{20,33}. Shortening the distance between mAb and TCOs was proposed and shown an increase of the steric hindrance which impeded TCOs to react with serum protein-bound copper²⁰. We thus compared DT and PT using mAbs-1–3 with the aim to determine the *in vivo* influence of the biological medium on antigen recognition and TZ interaction. Considering that the number of TCO grafted on mAbs was variable between 1, 2 and 3 we reported the signal intensities per the mean number of TCO as we previously made for *in vitro* studies. Thereby, in PT, when normalized, PEGylation of mAbs led, in both *in vivo* models, to a diminution of the signal intensity. In addition, in DT experiments on HT29 model, we found that there was no significant difference between PEGylated and non-PEGylated Ts29.2. In those groups mAbs-1–3 were first incubated 10 min with TZ-Cy5 and then injected in mice. Considering the fact that signal intensity is identical for the three mAbs we could confirm that PEGylation did not alter the antigen recognition. Without normalizing by TCO number (Supp. Fig. S10), the DT signal radiance significantly increased with PEG length especially with PEG₁₂. The PT signal intensity also increased with 3 compared to 1 but without reaching statistical significance.

We thus demonstrated in *in vivo* pretargeting experiments that with or without normalizing the signal intensity by the number of TCO, the addition of PEG linkers should decrease the interaction between TCO moieties and TZ. Indeed, ligation between TCO and TZ leads irreversibly to a covalent cycloadduct¹⁵ and when incubated in saline the interaction between the two entities was complete and stable. Indeed, stability studies demonstrated that isomerization of grafted TCO moieties into the *cis* derivative is limited in the interval of time. This highlights

that functional TCOs could be deactivated *in vivo* by isomerization to the unreactive CCO when they are distant from the mAb and/or that the alkyl chain could be folded against mAb and impede the access of the TZ^{21} .

For our applications, PEGylation of mAbs-TCO thus do not represent an interest as it did not improve the interaction with TZ. We now planned to test the influence of PEGylation on the physicochemical properties, reactivity and stability of the TZ probes. Indeed, TZ-DOTA is a lipophilic molecule and addition of PEG linkers between DOTA chelator macrocycle and TZ should improve its solubility, thus allowing accelerating renal clearance without altering the ability of the radioligand to bind TCO-mAbs¹⁹.

In conclusion, we optimized an efficient process for addition of TCO and PEG-TCO on mAb by adding moieties containing few *trans/cis*-isomerization and with a reproducible number of TCO grafted per mAb. We highlighted the importance of the TCO's number engrafted on mAbs as it can modify the interaction with TZ or antigens through *in vitro* and *in vivo* experiments. Finally, mAb-1 containing no PEG linker represents the best candidate for next bioorthogonal PRIT experiments on disseminated tumors in peritoneal cavity. To our knowledge, this is the first demonstration of TCO/TZ IEDDA pretargeting system on PC model using NIR fluorescence imaging. The high specificity of the TCO/TZ interaction and the safety of organic dyes could enable this system to be applied in a first step for imaging guiding cytoreductive surgery of PC thus helping the surgeon to locate precisely small size tumors. In a second step, the high tumor detection we observed suggests that with appropriated therapeutic radioisotopes, PRIT could represents an alternative to conventional PC therapies.

Methods

Cell lines and antibodies. HT29 cell line, colon adenocarcinoma expressing TSPAN8, were provided by Dr. C. Boucheix (Inserm, Villejuif, France) as the non-internalizing murine anti-TSPAN8 monoclonal antibody (mAb) Ts29.2 (IgG2b)³⁴. The cell line was maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% foetal serum, 1% gentamycin and was incubated at 37 °C with 5% CO₂ in humidified environment.

A431-CEA-Luc cell line, epithelial colon carcinoma transfected with constructs encoding both CEA and luciferase, were provided by Dr. J-P. Pouget and Dr. I. Navarro-Teulon (IRCM, Inserm, Montpellier, France) as well as the non-internalizing murine anti-CEA mAb 35A7 (IgG1) 27 . The cell line was cultured in Dulbecco's Modified Eagle F12 Medium supplemented with 10% foetal serum, 1% penicillin/streptomycin, 1% geneticin, 1% hygromycin and was incubated at 37 °C with 5% CO₂ in humidified environment.

Synthesis of pretargeting components. Procedure detailed in Supplementary methods.

mAb modifications. Procedure detailed in Supplementary methods.

Determination of the number of 1,2 and 3 moieties per mAb. For the range experiments $100 \, \mu g$ of mAbs were functionalized with different equivalents of TCO and the corresponding mean numbers of TCO grafted determined using MALDI-TOF MS were reported in Fig. 2 (Ts29.2) and Supplementary Figure 2 (35A7). For *in vitro* and *in vivo* studies $500 \, \mu g$ of mAbs were used for TCO grafting at 10 equivalents of PEG_n-TCO. The mean number of moieties grafted per mAb was the following: Ts29.2-1 (3.3 PEG₀-TCO), Ts29.2-2 (4.2 PEG₄-TCO), Ts29.2-3 (5.2 PEG₁₂-TCO); 35A7-1 (2.1 PEG₀-TCO), 35A7-2 (3.3 PEG₄-TCO) and 35A7-3 (4.3 PEG₁₂-TCO). The procedure for MALDI-TOF MS analysis is detailed in Supplementary methods and a typical quantification is reported in Supplementary Figure S9.

mAb-1-3 stability. Procedure detailed in Supplementary methods.

Tetrazines. For the different experiments three fluorescent TZ probes were purchased at JenaBioscience, Germany, namely: 3-(*p*-benzylamino)-1,2,4,5-tetrazine-5-Fluorescein (TZ-5-FAM) absorbance/emission lengths 492/517 nm, molecular weight (MW) 545.50 g/mol, 3-(*p*-benzylamino)-1,2,4,5-tetrazine-cyanine3 (TZ-Cy3) absorbance/emission at 550/570 nm, MW 908.07 g/mol and 3-(*p*-benzylamino)-1-2-4-5-tetrazine-cyanine 5 (TZ-Cy5) absorbance/emission at 649/670 nm, MW 826.00 g/mol. Those different fluorophores do not alter the ability of TZ to bind TCO moieties due to the high affinity and specificity of TZ with TCO and due to the ability of organic dyes to not interfere with biological function. In addition, in the same experiment we always compared mAbs labeled with the same fluorophore-TZ -i.e the most adapted to obtain significant signal detection according to laser capacity of the device we used- in order to avoid an introduction of any bias into the experiments.

Flow cytometry. Determination of antigen level on cell surface. The number of TSPAN8 and CEA antigens respectively present on HT29 and A431-CEA-Luc cells' surface was quantified using an *in vitro* kit assays (CellQuant Calibrator®, Biocytex, France) and a flow analyser (BD-LSRII flow cytometer with FACSDiva Software (BD Biosciences)). All experiments were made according to the manufacturer instructions and in triplicates. The statistical significance was tested with a PLSD Fisher test and considered to be significant when p < 0.05.

Assessment of the interaction between TCO and TZ. After trypsinization 1.10⁶ HT29 or A431-CEA-Luc cells were incubated 30 min at 4 °C with 0.03 nmol of Ts29.2-1-3 or 35A7-1-3 then washed in Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), centrifuged 5 min at 461 g and supernatants were removed to avoid unspecific ligation. Cells were finally incubated 30 min at 4 °C in dark with 10–14 equivalent of TZ-5-FAM with respect to the number of TCO or with 1/1000 donkey anti-mouse antibody labeled with AlexaFluor 488 (ThermoFisher Scientific, France). After washing and centrifugation cells pellets were resuspended in 1 mL DPBS and samples were analysed using flow analyser.

Immunofluorescence assays. 1.10^5 HT29 or A431-CEA-Luc cells were incubated in 8 well labtek chambers (Sigma Aldrich, France) beforehand coated 1 h at RT at $5\,\mu\text{g/cm}^2$ with rat tail collagen I (Corning, USA). Before tests, cell layers were incubated 30 min with DPBS-BSA 5% at RT and then 1h30 at $37\,^{\circ}\text{C}$ / 5% CO $_2$ with 0.03 nmol Ts29.2-1-3 or 35A7-1-3 diluted in DPBS-BSA 2.5%. In a second step, cells were incubated 45 min at $37\,^{\circ}\text{C}$ / 5% CO $_2$ with 1/1000 donkey anti-mouse labeled with Cyanine 3 (Jackson ImmunoResearch, USA) diluted in DPBS-BSA 2.5% or 10–14 equivalent of TZ-Cy3 with respect to the number of TCO diluted in DPBS-BSA 2.5% - DMSO 0.5%. Cells were then fixed with 10% formalin (Sigma Aldrich, France). Chambers were finally removed from the labteks and blades were mounted in vectashield-DAPI mounting medium then observed using a confocal imager (Leica SPE, ICCF platform, Clermont-Ferrand, France). Region of interest (ROI) was quantified on the entire image using ImageJ software. Three fields per well, all Z-sections every $2\,\mu$ m, were randomly imaged and quantified with an automated 3D-strategy. Imaging settings and quantification procedure were detailed in supplementary methods.

Animals. This investigation is conforms to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health* (NIH Publication n°85–23, revised 1996). All experiments were made in accordance with the relevant guidelines and regulations and were approved by both the local Ethic committee of Clermont-Ferrand (CEMEAA n°002) and French Ministry of Education and Research (approval n°5103-2016042010209100). Twenty four female mice (Nude NRMI Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}) from Janvier Labs, (Le Genest-Saint-Isles, France) and 12 female mice (Nude NMRI Nu/Nu) from Charles River (L'Arbresle, France) were used for colon adenocarcinoma and peritoneal carcinomatosis models, respectively. Mice (5 weeks old, median weight 22 g) were housed in standard conditions (n = 5 per cage on ventilated racks, temperature 21–24°C, 60% humidity, 12 h light/ 12 h dark cycle) with free access to standard food and water.

Intravenous (IV) injections were all made in lateral tail vein of vigil mice. *In vivo* imaging was made under general anesthesia using isoflurane gas 2.5 per cent and 2:3 oxygen. Euthanasia was made by cervical dislocation after isoflurane gas overdose. Near infrared (NIR) fluorescence imaging was made using an IVIS fluorescent imager (IVIA platform, Clermont-Ferrand, France) at 640–680 nm wavelengths. Imaging procedures were detailed in supplementary method.

Colon adenocarcinoma model. Experimental design. 24 female mice anesthetized with 2% isoflurane gas were subcutaneously (SC) xenografted with 3.106/100 µL HT29 cells in the right flank. Then, mice were randomly divided into 8 groups (n = 3 per group). In four groups, mice were both IV injected with 0.3 nmol of Ts29.2-1-3 or without TCO (control group) and 4–8 equivalents of TZ-Cy5 with respect to TCO. Antibodies and TZ-Cy5 were previously incubated 30 min at RT in eppendorf tube. Those groups correspond to the direct targeting groups. The four other groups were first IV injected with 0.3 nmol of Ts29.2-1-3 or without TCO (control group) followed 24 h later by IV injection of 4–8 equivalents of TZ-Cy5 with respect to TCO, corresponding to the pretargeting groups. Antibodies and TZ-Cy5 dilutions were made in saline solution and saline with DMSO 0.5% respectively.

In vivo imaging. In both DT and PT conditions mice were imaged 2 h, 4 h and 6 h after TZ-Cy5 injections and once a day during 7 days. Mice were sacrificed at day 7.

Peritoneal carcinomatosis model. Experimental design. 12 female mice were intraperitoneally (IP) xenografted with $1.10^6/250\,\mu\text{L}$ A431-CEA-Luc cells. Tumor growth was followed using bioluminescence imaging through IP injections of 15 mg/mL of luciferin two times per week during 11 days. Then, mice were randomly allocated to the different groups (n = 3 per group: control, PEG₀, PEG₄ and PEG₁₂) and were first IV injected with 0.3 nmol of 35A7 without TCO (Control) or 35A7-1-3 followed 24 h later by IP injection of 4–8 equivalents of TZ-Cy5 with respect to TCO number. Dilutions of all mAbs and TZ-Cy5 were in saline solution and saline solution-DMSO 0.5%, respectively.

PCI determination. Peritoneal carcinomatosis index (PCI) is a gold-standard reference quantifying the number of peritoneal tumors ranging from 1 to 39 indicating the degree of severity³⁵. We determined PCI using the sum of the score adapted for rodent by Klaver and co-workers³⁶. Briefly, mice abdomen was divided into 13 regions and tumors observed in each region were scored semiquantitatively according to 0: no macroscopic lesions; 1: limited lesions from 1 to 2 mm; 2: moderate lesions from 2 to 4 mm and 3: abundant lesions (more than 10 sites or lesions over 4 mm) (Supplementary Figure S8).

Mice imaging. For all mice, bioluminescence imaging was made 2 h after TZ-Cy5 injection and 4 days later, 10 min after IP luciferin injection. In all groups, fluorescence imaging was made 2 h and 4 h after TZ-Cy5 injection and daily during 4 days. At day 4, mice were sacrificed and tumors were imaged by bioluminescence and fluorescence successively.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using XLSTAT 2012 software. Continuous data were expressed with the mean and standard deviation (SEM). To compare continuous values of the different modified antibodies a one-way ANOVA or two-paired Student T-test were used. We considered p < 0.05 statistically significant.

References

- 1. Ychou, M. et al. Adjuvant radioimmunotherapy trial with iodine-131-labeled anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibody F6 F(ab')2 after resection of liver metastases from colorectal cancer. Clin. Cancer Res. 14, 3487–3493 (2008).
- 2. Hanaoka, H. *et al.* Fractionated radioimmunotherapy with ⁹⁰ Y-labeled fully human anti-CEA antibody. *Cancer Biother. Radiopharm.* **29**, 70–76 (2014).

- 3. Derrien, A. et al. Therapeutic efficacy of alpha-RIT using a 213Bi-anti-hCD138 antibody in a mouse model of ovarian peritoneal carcinomatosis. Front. Med. 2 (2015).
- 4. Aarts, F. et al. A comparison between radioimmunotherapy and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for the treatment of peritoneal carcinomatosis of colonic origin in rats. Ann. Surg. Oncol. 14, 3274–3282 (2007).
- de Jong, G. M. et al. Experimental study of radioimmunotherapy versus chemotherapy for colorectal cancer. Br. J. Surg. 98, 436–441 (2011).
- 6. Jayne, D. G., Fook, S., Loi, C. & Seow-Choen, F. Peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. Br. J. Surg. 89, 1545-1550 (2002).
- Elias, D. et al. Prognostic similarities and differences in optimally resected liver metastases and peritoneal metastases from colorectal cancers. Ann. Surg. 261, 157–163 (2015).
- 8. Faron, M. et al. Linear relationship of peritoneal cancer index and survival in patients with peritoneal metastases from colorectal cancer. Ann. Surg. Oncol. 23, 114–119 (2016).
- 9. Witzig, T. E. *et al*. Phase I/II trial of IDEC-Y2B8 radioimmunotherapy for treatment of relapsed or refractory CD20⁺ B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 17, 3793–3803 (1999).
- Navarro-Teulon, I., Lozza, C., Pèlegrin, A., Vivès, E. & Pouget, J.-P. General overview of radioimmunotherapy of solid tumors. *Immunotherapy* 5, 467–487 (2013).
- 11. Larson, S. M., Carrasquillo, J. A., Cheung, N.-K. V. & Press, O. W. Radioimmunotherapy of human tumours. *Nat. Rev. Cancer* 15, 347–360 (2015).
- 12. Chatal, J.-F. & Hoefnagel, C. A. Radionuclide therapy. The Lancet 354, 931-935 (1999).
- 13. Hnatowich, D. J., Virzi, F. & Rusckowski, M. Investigations of avidin and biotin for imaging applications. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 28, 1294–1302 (1987).
- 14. Sharkey, R. M., Rossi, E. A., McBride, W. J., Chang, C.-H. & Goldenberg, D. M. Recombinant bispecific monoclonal antibodies prepared by the dock-and-lock strategy for pretargeted radioimmunotherapy. Semin. Nucl. Med. 40, 190–203 (2010).
- Blackman, M. L., Royzen, M. & Fox, J. M. Tetrazine ligation: fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels—Alder reactivity. J. Am. Chem. Soc. 130, 13518–13519 (2008).
- Sletten, E. M. & Bertozzi, C. R. Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality. Angew. Chem. Int. Ed. 48, 6974–6998 (2009).
- 17. Rossin, R. et al. In vivo chemistry for pretargeted tumor imaging in live mice. Angew. Chem. Int. Ed. 49, 3375-3378 (2010).
- 18. Zeglis, B. M. et al. Optimization of a pretargeted strategy for the PET imaging of colorectal carcinoma via the modulation of radioligand pharmacokinetics. Mol. Pharm. 12, 3575–3587 (2015).
- 19. Houghton, J. L. et al. Establishment of the *in vivo* efficacy of pretargeted radioimmunotherapy utilizing inverse electron demand Diels-Alder click chemistry. *Mol. Cancer Ther.* 16, 124–133 (2017).
- 20. Rossin, R. et al. Highly reactive trans-cyclooctene tags with improved stability for Diels-Alder chemistry in living systems. Bioconjug. Chem. 24, 1210–1217 (2013).
- Rahim, M. K., Kota, R. & Haun, J. B. Enhancing reactivity for bioorthogonal pretargeting by unmasking antibody-conjugated transcyclooctenes. Bioconjug. Chem. 26, 352–360 (2015).
- 22. Sano, K. et al. Short PEG-linkers improve the performance of targeted, activatable monoclonal antibody-indocyanine green optical imaging probes. Bioconjug. Chem. 24, 811–816 (2013).
- Chapman, A. P. PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 531–545 (2002).
- 24. Harris, J. M. & Chess, R. B. Effect of PEGylation on pharmaceuticals. Nat. Rev. Drug Discov. 2, 214–221 (2003).
- Zhang, X., Wang, H., Ma, Z. & Wu, B. Effects of pharmaceutical PEGylation on drug metabolism and its clinical concerns. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 10, 1691–1702 (2014).
- 26. Maisonial-Besset, A. et al. Tetraspanin 8 (TSPAN 8) as a potential target for radio-immunotherapy of colorectal cancer. Oncotarget (2017).
- 27. Boudousq, V. et al. Brief intraperitoneal radioimmunotherapy of small peritoneal carcinomatosis using high activities of noninternalizing 125I-labeled monoclonal antibodies. J. Nucl. Med. 51, 1748–1755 (2010).
- 28. Devaraj, N. K., Thurber, G. M., Keliher, E. J., Marinelli, B. & Weissleder, R. Reactive polymer enables efficient *in vivo* bioorthogonal chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 4762–4767 (2012).
- Reiner, T. & Zeglis, B. M. The inverse electron demand Diels-Alder click reaction in radiochemistry: radiochemical applications of Diels-Alder click chemistry. J. Label. Compd. Radiopharm. 57, 285–290 (2014).
- 30. Frampas, E. et al. Pretargeted radioimmunotherapy of colorectal cancer metastases: models and pharmacokinetics predict influence of the physical and radiochemical properties of the radionuclide. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 38, 2153–2164 (2011).
- 31. Dong, C. et al. SPECT/NIRF dual modality imaging for detection of intraperitoneal colon tumor with an avidin/biotin pretargeting system. Sci. Rep. 6, 18905 (2016).
- 32. Houghton, J. L. et al. Pretargeted immuno-PET of pancreatic cancer: overcoming circulating antigen and internalized antibody to reduce radiation doses. J. Nucl. Med. 57, 453–459 (2016).
- 33. Keinänen, O. et al. Pretargeted PET imaging of trans-cyclooctene-modified porous silicon nanoparticles. ACS Omega 2, 62–69 (2017).
- 34. Ailane, N. et al. Effect of an anti-human Co-029/tspan8 mouse monoclonal antibody on tumor growth in a nude mouse model. Front. Physiol. 5 (2014).
- Jacquet, P. & Sugarbaker, P. H. Peritoneal Carcinomatosis: Principles of Management (ed. Sugarbaker, P. H.) 82, 359–374 (Springer US, 1996).
- 36. Klaver, Y. L. B. et al. Intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy after cytoreductive surgery for peritoneal carcinomatosis in an experimental model. Br. J. Surg. 97, 1874–1880 (2010).

Acknowledgements

A.R. received a PhD fellowship from FEDER *Région Auvergne-Rhône-Alpes*. This project is also sustained by Cyclopharma. We thank Caroline Vachias and Pierre Pouchin from their expertise for confocal imaging studies performed on the ICCF platform (Clermont-Ferrand, France). Flow cytometry experiments were performed on the CICS platform (Clermont-Ferrand, France) with the technical help of Christelle Blavignac. *In vivo* imaging was made on the multimodal imaging IVIA platform (Clermont-Ferrand, France).

Author Contributions

A.R., N.T., J.-B.B., M.Q., A.B., T.W., B.B., E.M. and F.D. performed the experiments. A.R., N.T., M.Q., E.M., and F.D. analyzed the data and wrote the manuscript text. C.B., J.-P.P. and I.N.-T. provided antibodies and cells material and contributed to the design of the project and the discussion. E.M.-N. and J.-M.C. contributed to the discussion. F.D. supervised the project. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-017-15051-y.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2017

Étude des modifications d'anticorps

II. Influence du taux d'isomérisation TCO/CCO sur l'interaction AcMs-PEG_n-TCO/TZ (Publication 2)

1. Résumé de l'article

Du fait du risque d'isomérisation des TCO en CCO inactifs envers les TZ, décrits par l'équipe de Rossin[239] et sur la base de nos résultats antérieurs[263], nous avons décidé d'évaluer *in vitro* l'impact de la pureté des solutions de TCO utilisées avant conjugaison aux AcMs sur le processus d'isomérisation. Ainsi, les AcMs Ts29.2 et 35A7 ont été conjugués avec des solutions de groupements PEG_n-TCO (*i.e.* PEG₀, PEG₄ et PEG₁₂) contenant différents ratios TCO/CCO (*i.e.* 90-10 %, 50-50 % ou 10-90 %).

Les ratios TCO/CCO des solutions ont été déterminés par HPLC avant couplage aux AcMs et le nombre de groupements PEG_n-TCO (ou CCO) finalement greffé sur les AcMs a été évalué par MALDI-TOF. La réactivité des AcMs-PEG_n-TCO(+/- CCO) a ensuite été évaluée à la fois par immunofluorescence (sur cellules HT29 et A431-CEA-Luc) et sur gel d'acrylamide.

Nous avons ainsi montré que les TCO conjugués aux Ts29.2 et au 35A7 subissaient une isomérisation rapide dans le plasma, d'autant plus importante que le taux d'isomères CCO de départ était élevé. De plus, la PEGylation des AcMs-TCO semble augmenter ce phénomène. Cette étude démontre donc l'importance du contrôle des solutions de TCO utilisées pour la conjugaison.

2. Résultats

a. Immunofluorescence

Les cellules HT29 ont été incubées dans un premier temps avec les différents conjugués Ts29.2-PEG_n-TCO contenant ⁺/- d'isomères CCO puis ont été incubées avec de la 0,3 nmoles de TZ-Cy3. L'observation au microscope confocal démontre un marquage membranaire fluorescent qui diminue significativement de façon linéaire, entre les Ts29.2-PEG_n-TCO conjugués avec des ratios TCO/CCO de 90/10, 50/50 et 10/90 confirmant ainsi une perte d'interaction avec la TZ-Cy3. Des résultats identiques ont été obtenus dans le modèle A431-CEA-Luc. Les 35A7-PEG₁₂-TCO(⁺/- CCO) n'ont en revanche pas encore été évalués (Supplementary Fig).

b. Incubations et dépôts sur gel d'acrylamide

Pour évaluer précisément l'impact de la présence des isomères CCO sur l'interaction TCO/TZ nous avons incubé chaque conjugué soit dans du PBS soit dans du plasma-50 % PBS, à 37 °C pendant 24 h. Des aliquots de ces solutions ont été prélevés au bout d'une 1 h, 5 h et 24 h et déposés sur gel d'acrylamide. Les résultats de trois expériences indépendantes confirment que plus le taux de CCO est important, plus l'interaction TCO/TZ-5-FAM est faible. De plus, l'interaction TCO/TZ-5-FAM est stable en PBS pendant 24 h pour les conjugués Ts29.2-PEG_{0,4} contenant des ratios TCO/CCO de 90/10 % (**Fig. 3**). En revanche, à partir de 50 % de CCO, une diminution significative et progressive au cours du temps de l'interaction TCO/TZ-5-FAM est observée. Pour le conjugué Ts29.2-PEG₁₂, le signal diminue à partir de 5 h d'incubation, quelque soit le ratio d'isomères de départ.

Lorsque les conjugués Ts29.2-PEG_{0,4}-TCO(†/- CCO) sont incubés dans du plasma-50 % PBS, une rapide isomérisation, à hauteur de 90 % après 5 h, est observée pour les ratios TCO/CCO de 90/10 et 50/50 % (**Fig. 4**). Le conjugué Ts29.2-PEG₁₂ subit en revanche une isomérisation de 100 % à partir de 5 h d'incubation. De plus, le ratio TCO/CCO de 10/90 % induit une isomérisation totale dès 5 h d'incubation, quelque soit la longueur de l'espaceur PEGylé du conjugué Ts29.2-TCO.

3. Discussion

Les résultats obtenus par immunofluorescence démontrent que l'interaction TCO/TZ est significativement réduite lorsque les solutions de TCO utilisées pour le couplage aux AcMs ne sont pas pures (i.e. 90-100 % d'isomères TCO). Cette diminution a ainsi été quantifiée par électrophorèse sur gel d'acrylamide en réalisant des incubations de conjugués †/. isomérisés, soit dans du PBS, soit dans du plasma- 50 % PBS. Ainsi, les conjugués greffés avec des solutions contenant 50 % ou plus d'isomères CCO subissent une isomérisation drastique au cours du temps. Plus le taux de CCO mis en réaction est important plus le conjugué s'isomérise, ce qui tend à montrer que la présence de CCO augmente le taux d'isomérisation des TCO conjugués. Cette observation met ainsi en évidence pour la première fois l'importance de contrôler les taux d'isomérisation des solutions de TCO utilisées afin d'utiliser des lots le plus purs possible pour la conjugaison AcMs-TCO. De plus, cette propension à l'isomérisation est aggravée par la présence d'espaceurs PEGylés sur les AcMs-TCO, ce qui conforte les résultats précédemment publiés montrant que la PEGylation était délétère pour l'interaction TCO/TZ[263].

Les résultats obtenus concernant le Ts29.2-PEG₀-TCO conjugué avec un ratio TCO/CCO de 90/10 % montrent que 10 % de molécules réactives subsistent au bout de 24 h. Des études de biodistribution qui comparent l'influence de différents délais (*i.e.* 24, 48 et 72 h) entre les injections

des AcMs-TCO et des sondes TZ radiomarquées montrent que le délai le plus court (i.e. 24 h) est le plus favorable[245]. Ces observations in vivo sont en totale adéquation avec les résultats obtenus in vitro.

4. Conclusion

Dans cette étude nous avons évalué *in vitro* l'intérêt du contrôle de l'isomérisation des TCO en CCO, inactifs envers la TZ. Celle-ci se produit rapidement, à hauteur de 90 % dans les 24 h post-incubation dans du plasma-50 % PBS. De plus, nous avons confirmé le rôle prépondérant de la PEGylation dans l'induction de cette isomérisation et donc la nécessité d'utiliser des AcMs-TCO non-PEGylés dans les stratégies de PRIT. Nos travaux suggèrent la possibilité d'une isomérisation en chaîne des résidus réactifs, ce qui consitue un risque non négligeable d'altérer *in fine* l'efficacité de la PRIT.

PUBLICATION 2

Optimized synthesis of PEGylated *trans*-cyclooctene derivatives for highly efficient bioorthogonal chemistry

J-B. Bequignat, N. Ty, **A. Rondon**, L. Taiariol, J-M. Chezal, D. Canitrot, C. Boucheix, M. Quintana, I. Navarro-Teulon, F. Degoul and E. Moreau

Soumis, 2018

Optimized synthesis of PEGgylated trans-cyclooctene derivatives for highly efficient bioorthogonal

chemistry

Jean-Baptiste Bequignat, a Nancy Ty, a Aurélie Rondon, Ludivine Taiariol, Jean-Michel Chezal, a

Damien Canitrot,^a Claude Boucheix,^c Mercedes Quintana,^a Isabelle Navarro-Teulon,^b Françoise

Degoul^a and Emmanuel Moreau^{a,*}

^a Clermont Université, Université d'Auvergne, Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, BP

184, F-63005 Clermont-Ferrand, France. Inserm, U 1240, F-63000 Clermont-Ferrand, France. Centre

Jean Perrin, F-63011 Clermont-Ferrand, France.

^b Institut de Recherche en Cancérologie (IRCM), U1194 – Université Montpellier – ICM, Radiobiology

and Targeted Radiotherapy, 34298 Montpellier cedex 5.

^c Université Paris Sud, U935, Bâtiment Lavoisier, 14 Avenue Paul-Vaillant-Couturier, 94800 Villejuif.

*Corresponding author: Emmanuel Moreau. Tel.: + (33) 4 73 15 08 06, Fax: + (33) 4 73 15 08 01, e-

mail: emmanuel.moreau@uca.fr

Keywords

bioothogonal chemistry; IEDDA; pretargeting; trans-cyclooctene

128

Abstract

During the last decade, the pretargeting approach using the inverse-electron demand Diels-Alder (IEDDA) cycloaddition has been proposed as a theranostic tool for many cancers. However, to the best of our knowledge, pretargeted radioimmunotherapy (PRIT) has not yet been transferred to clinical trials. This study is based on one major limitation of the IEDDA strategy relying on transcyclooctene (TCO) stability. Indeed, TCO may isomerize into its more stable but unreactive ciscyclooctene (CCO) isomer form. We have therefore developed reproducible methods for both TCO and PEGylated TCO derivatives syntheses and analytical follow up, leading to high purities in TCO isomer form (i.e. superior or equal to 94 %). We therefore design TCO/CCO mixtures of 90/10 %, 50/50 % and 10/90 % in order to evaluate in vitro the influence of TCO solutions purity on the IEDDA efficiency with fluorescent tetrazine (Tz). As expected, high ratios of CCO led to a decrease in fluorescence intensities in both immunofluorescence and acrylamide gels assays. Furthermore, PEGylated mAbs-TCO conjugates led to higher isomerization compared to the non-PEGylated ones and surprisingly, the presence of a high rate of CCO isomers induced quicker inactivation of TCO than the purest TCO/CCO ratio. In conclusion, we have developed efficient and reproducible purification methods for TCO precursor and TCO derivatives, obtaining TCO compound with less than 5 % of CCO isomers leading to more reactive TCO/Tz in vitro interaction.

Highlights

- 1. AgNO $_3$ silica gel column allows obtaining **TCO1b** with 100 % of isomeric purity.
- 2. Chain reaction: high rate of CCO before mAbs' grafting inactivates quickly TCO moieties
- 3. PEGylation of mAbs-TCO increases TCO to CCO isomerization
- 4. HPLC methods allows controlling the rate of CCO before mAbs'grafting

Introduction

Radioimmunotherapy (RIT) consists of treating tumors using radiolabelled monoclonal antibodies (mAbs). Radioimmunoconjugates were developed on the basis of prosthetic groups *i.e* small molecules radiolabeled linked to lysine using N-hydroxysuccinimidyl (NHS) esters and on cysteines using Michael additions with maleimides. Efficiency of RIT is well establish in hematological diseases, such as non-Hodgkin lymphoma (NHL) with the approval in 2002 of the ibritumomab tiuxetan (Zevalin®, Bayer), an anti-CD20 radiolabelled with Yttrium-90. However, clinical trials of RIT of solid tumors face some major drawbacks as mAbs diffusion in tumors and hematotoxicity caused by the long clearance of mAbs [1]. Thereby, strategies delaying the injection of mAbs and radiolabelled probe in two distinct steps were developed and called pretargeted radioimmunotherapy (PRIT).

Different PRIT approaches were developed since the last 30 years, such (strept)avidin/biotin, bispecific antibodies or oligonucleotides [2-6]. The most recent approach uses bioorthogonal click chemistry and led to several reactions with different kinetic profiles. Taking into account the physical decay of radionuclides during the radiosynthesis process, the click chemistry offers/supports an attractive paradigm due to its selectivity, rapidity, ease and modularity of ligation. Not surprisingly, the classical CuAAC ligation leads the pack as it was the first click chemistry reaction described. However, the coordination of the oxidative Cu(I) can also dramatically alter the chelating amino acid residues [7] Thereby, researches were oriented to a "second generation" of catalyst-free click reactions such as Staudinger ligation, Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition (SPAAC) or Inverse Electronic-Demand Diels-Alder (IEDDA) cycloaddition [8, 9, 10]. The quickest bioorthogonal click reaction occurs between a trans-cyclooctene (TCO) and a tetrazine (Tz). TCO moieties are generally linked to mAbs lysine residues, through nucleophilic substitution, while Tz were bound to chelator macrocycles via polyethylene glycol (PEG) linkers. TCO and Tz react directly in vivo, very quickly, (k₂= 10³-10⁶ M⁻¹.s⁻¹) [11] through an inverse electron demand Diels-Alder cycloaddition, in physiologic conditions of pH and temperature and without risk of non-specific interaction on biological macromolecules.

In 2010, Rossin *et al.* have first demonstrated the feasibility of IEDDA on living system through *in vivo* SPECT-CT imaging of mice bearing colon cancer subcutaneous xenografts [12] They have used an anti-TAG72 mAb CC49 modified by about 7 TCO/mAb and a ¹¹¹In-DOTA-Tz probe. Then, several teams have developed pretargeting using TCO/Tz interaction either in fluorescence assays, mice PET imaging or therapy preclinical studies [13-15] SPECT and PET imaging studies demonstrated the possibility to use IEDDA to specifically target tumors with low background noise and high tumor

to non-target organs ratios [16]. In addition, dosimetry calculations comforts that the dose received by non-targeted organs was significantly lower for PRIT compared to traditional RIT [17]. Furthermore, preclinical studies made recently demonstrated impressive results of PRIT efficiency in mice bearing colorectal subcutaneous tumors by showing a total regression of tumors associated with a long survival of treated mice compared to control groups [18]. However, to the best of our knowledge, there was no clinical transfer of bioorthogonal chemistry using IEDDA cycloaddition, neither for imaging nor PRIT. One difficultly may rely on numerous pitfalls, such as TCO stability and/or Tz reactivity. Preclinical optimizations of TCO/Tz interaction thus seem mandatory before clinical translation. Some studies were already published dealing with the reactivity of the radiolabelled Tz probe which correlated the pharmacokinetic of the molecule with IEDDA efficiency [15]. Thereby, new series of radiolabelled Tz probes were assessed and the more lipophilic showed a loss of reactivity.

Conversely, the impact of mAbs modifications on both antigen recognition and TCO reactivity was poorly documented. Indeed, Rossin and co-workers demonstrated first, in vivo, that CC49-TCO bearing a PEG₁₂ linker was less reactive than the corresponding non-PEGylated one [19]. The loss of reactivity was potentially due to isomerization of TCO to the inactive cis-cyclooctene (CCO) isomer form. Indeed, TCO to CCO isomerization is known to occurring when the compound is exposed to light or heat but in vivo conversion is difficult to evaluate. However, Rossin et al. described that PEGylation of CC49-TCO induces interactions between TCO and copper (II) contained in serum which increases TCO to CCO isomerization, compared to the non-PEGylated CC49-TCO which remained stable during 72 h. The position of the hydroxyl group was also responsible, as axial position increased 10-fold reactivity compared to the equatorial position. Another study, made in vitro using fluorescent Tz probes, suggested that there was no TCO to CCO isomerization but hydrophobic interactions between mAbs and TCO impeding the access to Tz probes [21]. The authors thus demonstrated that insertion of PEG linkers between mAbs and TCO, even shorter (i.e. PEG₄), improves reactivity with Tz. In a previous work [22], we demonstrated -in both in vitro and in vivo experiments on two different models of colorectal cancers- that PEGylation is detrimental to TCO/Tz interaction.

The purpose of this study was to evaluate *in vitro* both the rate of the TCO to CCO isomerization and the influence of CCO isomers on mAbs-TCO stability to optimize TCO/Tz interaction in HT29 cells with an antibody Ts29.2 directed against constitutive expressed TSPAN8. We first synthesized and purified reproducibly both TCO1b and TCO derivatives (*i.e.* PEG₀-TCO, PEG₄-TCO, PEG₈-TCO and PEG₁₂-TCO) to evaluate the effect of PEGylation on isomerization phenomenon. PEGylated compounds were also mixed with different amount of CCO to obtain precise ratios of

TCO/CCO (*i.e.* respectively 90/10 %, 50/50 % and 10/90 %) in order to measure if TCO purity influences the TCO to CCO isomerization rate in Ts29.2 mAbs /HT29 model. The TCO to CCO isomerization was assessed by SDS-gel electrophoresis and immunofluorescence assays on HT29 cells.

Results and discussion

Improvement of TCO1b isomeric purity using original purification process

^aReactants and conditions: i) h^V (254 nm, methyl benzoic acid, rt, 16h; ii) a) 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-aminobenzoic acid, triphosgene, rt, 16h; b) TCO, rt, 48h; iii) a) TsCl, TEA, DMAP, rt, 16h; b) NaH, HO(CH₂₎₃OTIPS; rt, 16h; iv) $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, rt, 30 min; v) H_2 , 1 bar, Pd/C; vi) appropriate PEGylated derivatives, TEA, rt, 25h; vii) diNHS, pyridine, rt, 13h;

Figure 1: Syntheses of TCO1B and PEGylated TCO derivatives from CCO.

TCO was synthesized from commercially available **CCO** as described by Royzen *et al.* [23] (Fig. 1). We succeed to obtain **TCO1b** with highly reproducible 100/0 % purity ratios of TCO/CCO compared to a 70/30 % ratio described by Rossin and co-workers [12, 23] Thereby, photochemical conversion of CCO to **TCO1b** compound was obtained in two steps (Fig. 1). We observed several times that **TCO1b** could be obtained with a purity of 100 % but variations were also induced by syntheses processes

leading to ranges of 95/5 % to 35/65 % purity ratios of **TCO1b/CCO1b** (HPLC control, supporting information). However, classical chromatographic separation of TCO1b from **CCO1b** isomers is complex due to their similar polarity on silica gel. We thus optimized synthesis of **TCO1b** by developing an original method allowing separating TCO and CCO isomers. Thus, during the first step in the synthesis of **TCO1b**, the mixture is continuously purified using an AgNO₃ silica gel column. This led to a specific retention of **TCO1b** on the column while the corresponding CCO was eluted (Supporting information). Elution of **TCO1b** was then made using both dichloromethane and 37 % ammoniac. We also used an alternative protocol, with the same AgNO₃ silica gel column, consisting to elute first **CCO1b** using ethyl acetate then to elute **TCO1b** by the addition of ethyl acetate/trimethylamine (60/40, v/v) leading to a 100 % isomeric purity of compound **TCO1b** (supporting information).

Novel synthesis of PEGylated TCO derivatives 2-4

An original synthesis of PEGylated spacers 4b-d carrying an amine function on one side and a carboxylic function on the other side was developed. The acid function was conjugated on PEG through a propionic acid appendage. The amine function allows binding with TCO moieties and the activation of the acid function conjugating PEGn-TCO with mAbs lysine residues. NH2PEGnCO2H 4b-d were then obtained from N₃PEG_nOH **1b-d** in three steps. Compounds **1b-d** were tosylated [23, 24] and then coupled to monosilylated propanyl alcohol [25] to afford 2b-d with yields of 37-60 %, respectively. In presence of Jones reagent, TIPS group from compound 2b-d were straightforward removed and the resulting alcohol function was converted into a terminal acid function. The azide function located at the opposite was then reduced using catalytic hydrogenation to finally obtain 4bd with an overall yield of 50-63 %. It should be noted that before finding this efficient method, several other ways of synthesis have been investigated (supporting information). PEGylated TCOderivative **5b** were obtained from **TCO1b**, as described by Rossin et al. [12] (i.e. 1 eq. of PEGylated 4b, 10 eq. de trimethylamine, rt) and then monitored using HPLC. Formation of a new compound and traces of TCO1b were observed after 16 h reaction (see Supporting information). Further additions of 4b (i.e. a total up to 3 eq.) have allowed obtaining a complete consumption of the TCO1b in 5b-d, containing isomer CCO-PEGylated 5b'. Compound 5b was thus purified on AgNO3 silica gel column but this surprisingly increased the isomerization rate. Purification attempts through washing steps using acid solution, followed by brine or elution using C18 column also failed. We thus optimized the formation of 5b-d using 1.5 eq. of the appropriate PEGylated linkers 4b-d and 10 eq. of TEA at rt which led to good yields and purity ratios of TCO/CCO superior to 90/10 % (Table 1). For this step, once the starting material **TCO1b** was almost totally consumed, the crude mixtures should be directly engaged in the next step (*i.e.* activation of acid function) and does not need additional purification.

| n _ | Conversion 4b-d into 5b-d | TCO/CCO ratio for conversion 5b-d into 6b-d | | | Overall |
|-----|------------------------------|---|------------|----------------|---------|
| | TCO/CCO ratio | crude product | after | after | yield |
| | | | prep. HPLC | lyophylization | |
| 3 | 100/0 | 88/12 | 94/6 | 94/6 | 66 |
| 7 | 100/0 | 83/17 | 100/0 | 100/0 | 31 |
| 11 | 94/6 | 92/8 | 100/0 | 93/7 | 67 |

Table 1: Synthesis of PEGylated TCO derivatives

Acid function of compound **5b-d** was finally activated as described, *i.e.* diNHS 2.35 eq. and pyridine 1.25 Eq., rt [1] Complete reaction of **5b-d** into **6b-d** was observed after 1 h by monitoring using HPLC and was associated to an important isomerization of **6c, d**. Alternative conditions, *i.e.* oxalyl chloride or NHS/DCC or NHS/EDCI, rt afforded expected compounds **6b-d** but induced both reproducibility and isomerization problems (data not shown). Purification of **6b-d** using simple silica gel or AgNO₃ silica gel failed. Finally, optimal conditions were found as diNHS (1.5 eq.), DMAP (0.2 eq.) and TEA (3 eq.), followed by purification step on a preparative C18 and lyophilization (Table 1). It is interesting to note that **TCO1b** and compounds **6b-d** could be stocked in acetonitrile solution, at - 4°C up to 6 months without increasing the isomerization (Monitoring was performed using HPLC).

Conjugation of mAbs with TCO1b or TCO PEGylated derivatives.

Biological experiments were performed on two non-internalizing mAbs, *i.e.* anti-tetraspanine 8 mAb (Ts29.2) and anti-CEA mAb (35A7, results not shown). Proof of concept of IEDDA pretargeting approach on fluorescence imaging in colorectal cancer model was recently published.[22] The goal of the present study is to evaluate the influence of the amount of CCO before mAbs grafting on the interaction with a fluorescent Tz probe. Two commercially available Tz were thus used, *i.e.* Tz-Cy3 and Tz-5-FAM (Jena Bioscience, Germany). We have related below that precursors **6b-**d could be obtained with a TCO/CCO purity ratio ranged 94/6 % to 100/0 % (Table 1).

Different amount of CCO were added to the **1-4** adducts to obtain determined ratios of TCO/CCO isomers (i.e. 90/10%, 50/50% and 10/90%). Control of the TCO/CCO isomerization rate was checked using HPLC method both before and after the mix with CCO isomers.

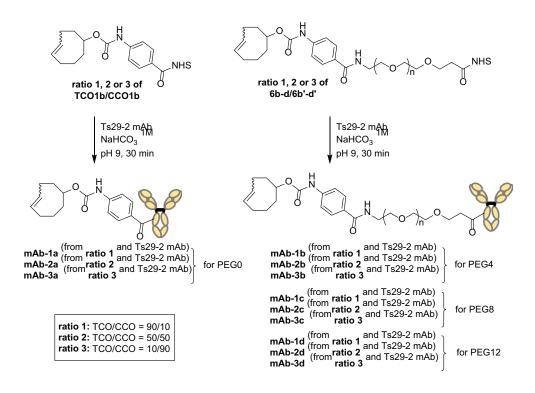


Figure 2: Conjugation of Ts29.2 with TCO and PEG-TCO derivatives containing 0 to 90 % ratios of CCO.

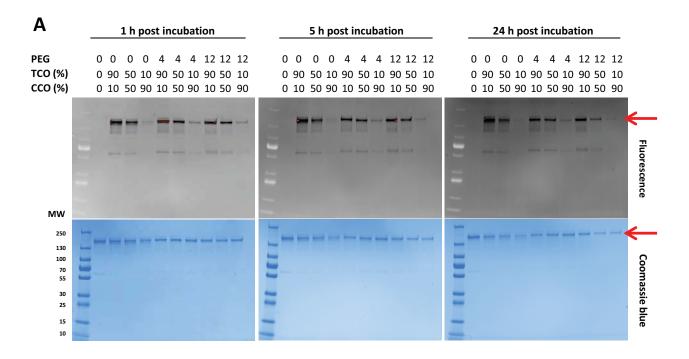
MALDI-TOF MS allowed determining the mean number of TCO/CCO moieties grafted *per* mAb. However, the isomerization rate once TCO were grafted cannot be measured due to similar masses between TCO and CCO. The mean number of TCO-CCO moieties grafted *per* mAb ranged reproducibly from 7.6 to 7.7 for Ts29.2-1a-Ts29.2-3a and from 3.5 to 4.4 for both Ts29.2-1b-Ts29.2-3b, Ts29.2-1c-Ts29.2-3c and Ts29.2-1d-Ts29.2-3d (n = 3). In addition, the average number of TCO-CCO conjugated is quite similar between Ts29.2-1c-Ts29.2-3c and Ts29.2-1d-Ts29.2-3d despite the difference in PEG length.

In vitro evaluation of the influence of CCO amount before Ts29-2 mAb grafting on both stability and interaction using a tetrazine fluorescent probe

To demonstrate the influence of the amount CCO before the grafting on mAb on the interaction with a fluorescent Tz, we used two *in vitro* approaches. In the first one, we have made incubations of Ts29.2-1,2,4,b-d aliquots in PBS or murine plasma-50 % PBS at 37 °C during 24 h and picked up samples at different time points (*i.e.* 1 h, 5 h and 24 h) to assess TCO/Tz interaction on acrylamide SDS-PAGE gels. TCO reactivity was thus evaluated using fluorescent Tz probes by measuring the fluorescence intensity. In PBS incubation, we observed as expected a progressive decrease of fluorescence intensity proportional to the ratio of CCO whatever the PEG length (Fig. 3). However,

with the 90/10 % TCO/CCO ratio, the longer PEG linker displays a lower efficacy. Five hours incubation led to a two-fold decrease of the fluorescence intensity highlighting a prompt isomerization rate of TCO to CCO in PBS at 37 °C. For each PEG length and whatever the TCO/CCO ratio, fluorescence dramatically decreased over 5 h of incubation in murine plasma (*i.e.* from 70 to 100 %) demonstrated that TCO isomerizes quickly (Fig. 4). However, only Ts29.2 bearing no PEG linker was still reactive after 24 h of incubation in plasma demonstrating that PEGylation of mAbs is detrimental to TCO stability. We also observed that the higher the percentage of CCO before mAbsgrafting the lower the fluorescence intensity. Those results thus demonstrated that the presence of CCO isomers in the mixture before mAbs-grafting induces a chain reaction, increasing TCO to CCO isomerization so decreasing TCO/Tz interaction. In addition, we confirmed that the presence of PEG linkers between mAbs and TCO decreases TCO stability and induces more isomerization so was not suitable for PRIT strategies.

TCO/Tz interaction was also evaluated on HT29 cells using immunofluorescence assays. An amount of 10 μg/mL of each Ts29-2-**1,2,4,b-d** was incubated on HT29 cells followed 1h30 later by 10-12 equivalents of fluorescent Tz-Cy3. After 1 h 30, 10-12 equivalents of Tz-Cy3 (with respect to the mean number of TCO grafted *per* mAb) were incubated (Fig. 5). Figure 5A depicted representative confocal imaging. For each PEG length (i.e. PEG₀, PEG₄ and PEG₁₂), we observed, as expected, a strong decreases of the fluorescence intensity located at cell membrane which is proportional to CCO ratio. Quantification of the mean fluorescence intensity localized on the cell membrane were then performed (Figure 5B). We observed a similar trend whatever the PEG length. However, the decrease of fluorescence intensity according to CCO ratios is more important for PEG₄ and PEG₁₂ compared to PEG₀ confirming that the presence of PEGylated linkers induces a faster TCO isomerization.



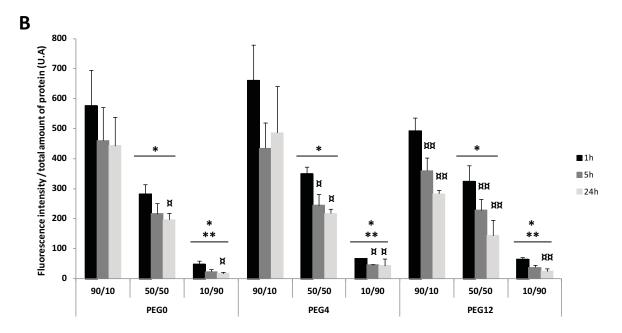


Figure 3: Influence of the amount of CCO in the reaction medium before Ts29.2 grafting on both Ts29.2-PEG_n-TCO stability in DPBS and interaction with TZ-5-FAM. (A) Stability assessed on gels after incubation of Ts29.2-PEGn-TCO at 37 °C in DPBS during 24 h. The red arrow shows the location of mAbs. Fluorescence was obtained after incubating gels 10 min with TZ-5-FAM. (B) Quantification of the fluorescence intensity reported on the total amount of protein loaded. Abscissa represents the ratio of TCO/CCO isomers added in the reaction for mAbs grafting. Statistical analysis was made using one-way ANOVA. * P < 0.05: 50/50 vs 90/10 and 10/90 vs 50/50. ** p < 0.001: 10/90 vs 90/10. m p < 0.05: 24h vs 1h, 5h vs 1h, 24h vs 5h. m p < 0.001: 5h and 24h vs 1h

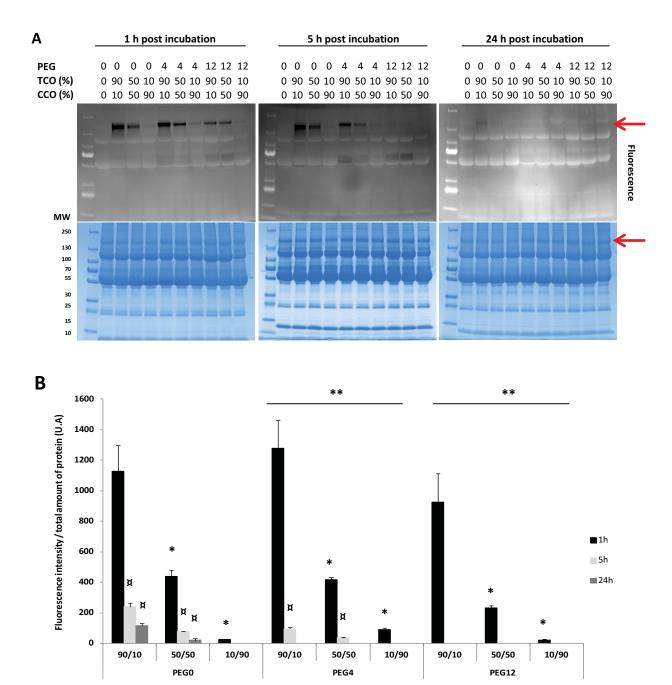


Figure 4: Influence of the amount of CCO in the reaction medium before Ts29.2 grafting on both Ts29.2-PEG_n-TCO stability in mice plasma diluted in 50 % DPBS and interaction with TZ-5-FAM. (A) Stability assessed on gels after incubation of Ts29.2-PEGn-TCO at 37 °C in plasma-50% DPBS during 24 h. The red arrow shows the location of mAbs. Fluorescence was obtained after incubating gels 10 min with TZ-5-FAM. (B) Quantification of the fluorescence intensity reported on the total amount of protein loaded. Abscissa represents the ratio of TCO/CCO isomers added in the reaction for mAbs grafting. Statistical analysis was made using one-way ANOVA. *P < 0.0001: 50/50 vs 90/10, 10/90 vs 90/10 and 10/90 vs 50/50. **p < 0.001: PEG4 vs PEG0, PEG12 vs PEG0 and PEG12 vs PEG4. \times p < 0.0001: 24h vs 1h, 24h vs 5h and 5h vs 1h.

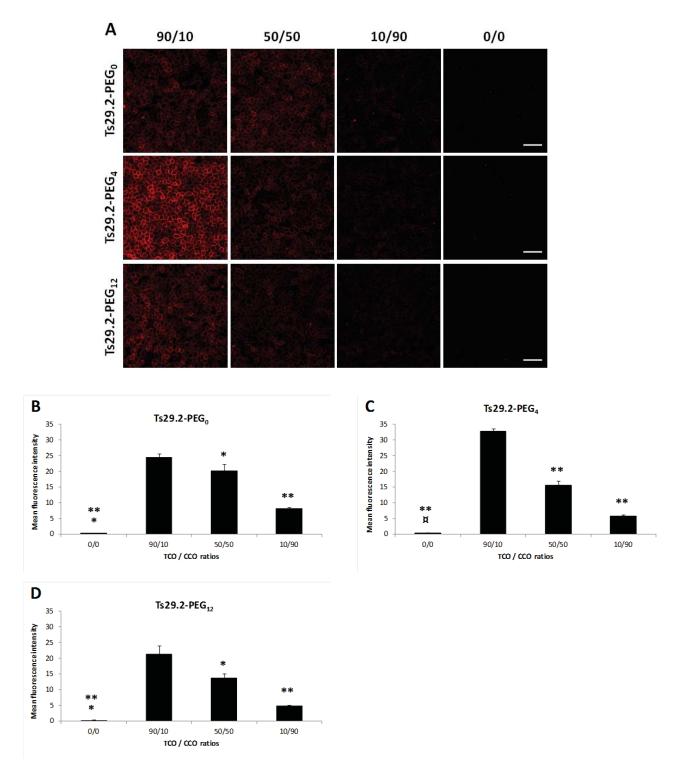


Figure 5: Assessment of the interaction between Ts29.2-TCO/CCO and TZ-Cy3 through immunofluorescence assays. Experiments were made on HT29 cells. (A) Representative confocal imaging. An amount of 0.3 nmol of Ts29.2-PEGn grafted with different ratios of TCO/CCO isomers was incubated during 1h30 followed by 45 min incubation of 10-12 equivalents of TZ-Cy3 $_{(550-570\ nm)}$ with respect to TCO number. White scale bar: 50 μ m. (B-D) Quantification of the mean fluorescence intensity localized on the cell membrane using ImageJ software. *P < 0.05: 0/0 vs 10/90 and 50/50 vs 90/10; *P < 0.001: 0/0 vs 10/90, ** P < 0.0001: 0/0 vs 90/10 and 50/50, 10/90 vs 50/50 and 90/10, and 50/50 vs 90/10

Conclusion

During the last decade, the IEDDA pretargeting approach showed a great interest for the development of theranostic tools that could be applied to several cancers but was not transferred to the clinic, yet. One major concern is the stability of TCO moieties grafted on mAbs which tends to isomerise into inactive CCO isomer. In this study we thus managed new experiments to determine if the TCO/CCO isomeric purity ratio of mixtures before mAbs's grafting would have an influence on TCO moieties stability and *in fine* on tetrazine interaction. We first enhanced TCO1b and PEGylated TCO derivatives syntheses with high isomeric TCO/CCO purities ratios (*i.e.* equal or superior to 94 %). Then, we demonstrated *in vitro* that the higher the CCO ratio before mAbs' grafting the faster the TCO isomerisation in plasma. This observation highlights the importance of controlling TCO purity before conjugation on mAbs to maximize TCO stability and TCO/Tz interaction. Moreover, mAbs bearing PEG linkers undergo quicker isomerization than the non-PEGylated ones confirming that mAbs-PEG₀-TCO with high isomeric TCO purity were the most appropriate for pretargeting approaches.

References

- [1] Navarro-Teulon I, Lozza C, Pèlegrin A, Vivès E, Pouget JP (2013) General overview of radioimmunotherapy of solid tumors.Immunotherapy. ;5(5):467-87. doi: 10.2217/imt.13.34
- [2] Stickney DR, Anderson LD, Slater JB, Ahlem CN, Kirk GA, Schweighardt SA and Frincke JM. (1991) Bifunctional antibody: a binary radiopharmaceutical delivery system for imaging colorectal carcinoma. Cancer Res. 51, 6650–6655
- [3] Kalofonos H P, Rusckowski M, Siebecker DA, Sivolapenko GB, Snook D, Lavender JP, Epenetos AA and Hnatowich DJ. (1990) Imaging of tumor in patients with indium-111-labeled biotin and streptavidin-conjugated antibodies: preliminary communication J. Nucl. Med. 31, 1791–1796
- [4] Weiden PL, Breitz HB, Press O, Appelbaum JW, Bryan JK, Gaffigan S, Stone D, Axworthy D, Fisher D and Reno J. (2000) Pretargeted radioimmunotherapy (PRIT) for treatment of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): initial phase I/II study results Cancer Biother.Radiopharm. 15, 15— 29 DOI: 10.1089/cbr.2000.15.15
- [5] Liu, G., Dou, S., Liu, Y., Wang, Y., Rusckowski, M., and Hnatowich, D. J. (2011) 90Y labeled phosphorodiamidate morpholino oligomer for pretargeting radiotherapy Bioconjugate Chem. 22, 2539–2545 DOI: 10.1021/bc200366t
- [6] Bagshawe KD. (2006) Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) for cancer Expert Rev. Anticancer Ther. 6, 1421–1431 DOI: 10.1586/14737140.6.10.1421
- [7] Huisgen, R. (1963) 1.3-Dipolare Cycloadditionen Rückschau und Ausblick. Angew. Chem., 75 (13), 604–637 DOI: 10.1002/ange.19630751304.

- [8] Dommerholt, J., Rutjes, F. P. J. T., Delft, F. L. van. Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloaddition of Cycloalkynes and Organic Azides. *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374* (2), 16 DOI: 10.1007/s41061-016-0016-4.
- [9] Blackman, M. L., Royzen, M., Fox, J. M. Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (41), 13518–13519 DOI: 10.1021/ja8053805.
- [10] Sletten, E. M., Bertozzi, C. R. From mechanism to mouse: a tale of two bioorthogonal reactions. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (9), 666–676 DOI: 10.1021/ar200148z.
- [11] Blackman, M., Royzen M. and Fox J. (2008) Tetrazine ligation: fast bioconjugation based on inverse electron demand Diels-Alder reactivity. J. Am. Chem. Soc. 130(41):13518-13519. Doi: 10.1021/ja8053805.
- [12] Rossin R., Verkerk PR., van den Bosch SM., Vulders RC., Verel I., Lub J., Robillard MS. (2010) In vivo chemistry for pretargeted tumor imaging in live mice. Angew Chem Int Ed Engl. 49(19):3375-8. doi: 10.1002/anie.200906294.
- [13] Rossin, R., Robillard, M. S. (2014) Pretargeted imaging using bioorthogonal chemistry in mice. Current Opinion in Chemical Biology. 21, 161–169. Doi: 10.1016/j.cbpa.2014.07.023.
- [14] Zeglis,B. M., Mohindra, P., Weissmann, G. I., Divilov, V., Hilderbrand, S. A., Weissleder, R., Lewis, J. S. (2011) Modular Strategy for the Construction of Radiometalated Antibodies for Positron Emission Tomography Based on Inverse Electron Demand Diels-Alder Click Chemistry. Bioconjugate Chem. 22, 2048–2059. dx.doi.org/10.1021/bc200288d |
- [15] Meyer, J. P., Houghton, J. L., Kozlowski, P. Abdel-Atti, D., Reiner, T., Pillarsetty, N. V., Scholz, W. W., Zeglis, B. M., Lewis, J. S. (2016) (18)F-Based Pretargeted PET Imaging Based on Bioorthogonal Diels-Alder Click Chemistry. Bioconjug. Chem. 27, 2, 298-301. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00504.
- [16] Zeglis BM, Brand C, Abdel-Atti D, Carnazza KE, Cook BE, Carlin S, Reiner T, Lewis JS.(2015) Optimization of a Pretargeted Strategy for the PET Imaging of Colorectal Carcinoma via the Modulation of Radioligand Pharmacokinetics. Mol Pharm. 12(10):3575-87. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00294
- [17] Rossin R, Läppchen T, van den Bosch SM, Laforest R, Robillard MS. (2013)Diels-Alder reaction for tumor pretargeting: in vivo chemistry can boost tumor radiation dose compared with directly labeled antibody. J Nucl Med. 54(11):1989-95. doi: 10.2967/jnumed.113.123745.
- [18] Membreno R, Cook BE, Fung K, Lewis JS, Zeglis BM (2018).Click-Mediated Pretargeted Radioimmunotherapy of Colorectal Carcinoma.Mol Pharm;15(4):1729-1734. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00093.
- [19]. Rossin R, van den Bosch SM, Ten Hoeve W, Carvelli M, Versteegen RM, Lub J, Robillard MS. Highly reactive trans-cyclooctene tags with improved stability for Diels-Alder chemistry in living systems. (2013) Bioconjug Chem. Jul 17;24(7):1210-7. doi: 10.1021/bc400153y
- [20] Rahim, R. M., Kota, R., Haun, J. B. (2015) Enhancing Reactivity for Bioorthogonal Pretargeting by Unmasking Antibody-Conjugated trans-Cyclooctenes. Bioconjug. Chem., 26, 2, 352–360. doi: 10.1021/bc500605g

- [21] Läppchen, T., Rossin, R., van Mourik, T. R., Gruntz, G., Hoeben, F. J. M., Versteegen, R. M., Janssen, H. M., Lub, J., Robillard, M. S. (2017) DOTA-tetrazine probes with modified linkers for tumor pretargeting. Nucl Med Biol. 55, 19-26. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2017.09.001.
- [22] Rondon, A., Ty, N., Bequignat, J. B., Quintana, M., Briat, A., Witkowski, T., Bouchon, B., Boucheix, C., Miot-Noirault, E., Pouget, J. P., Chezal, J. M., Navarro-Teulon, I., Moreau, E., Degoul, F. (2017) Antibody PEGylation in bioorthogonal pretargeting with trans-cyclooctene/tetrazine cycloaddition: in vitro and in vivo evaluation in colorectal cancer models. Sci. Rep. 7, 1, 14918. doi: 10.1038/s41598-017-15051-y.
- [23] Royzen, M., Yap, G. P. A. Fox, J. M. (2008) A Photochemical Synthesis of Functionalized trans-Cyclooctenes Driven by Metal Complexation. J. Am. Chem. Soc., 130, 12, 3760–3761.
- [24] Ciampi, S., Böcking, T., Kilian, K. A., James, M., Harper, J. B., Gooding, J. J. Functionalization of Acetylene-Terminated Monolayers on Si(100) Surfaces: (2007) A Click Chemistry Approach. *Langmuir* 23 (18), 9320–9329 DOI: 10.1021/la701035g.
- [25] Thauvin, C., Perino, A., Contal, E., Morin, E., Schutz, P., Meunier, S., Wagner, A. (2011) Programmed Dispersions of MWNTs in Aqueous Media by Coating with Photopolymerizable Synthetic Amphiphiles. J. Phys. Chem. C, 115 (15), 7319–7322 DOI: 10.1021/jp2000464.
- [26] Dias, L. C., de Oliveira, L. G., Vilcachagua, J. D., Nigsch, F. Total Synthesis of (+)-Crocacin D †. J. Org. Chem. 2005, 70 (6), 2225–2234 DOI: 10.1021/jo047732k.

Étude des modifications d'anticorps

III. Étude *in vitro* de la diffusion des AcMs-TCO_n dans un modèle 3D de sphéroïde.

1. Introduction

Au cours des études précédentes, nous avons démontré que la PEGylation des AcM-TCO diminuait l'interaction avec les TZ fluorescentes (cf. publication 1) mais que les modifications apportées aux AcMs n'altéraient pas leur capacité de reconnaissance envers les Ag. Bien que cette dernière observation ait pu être faite sur deux modèles différents, les études ont été menées sur des cellules en suspension, un modèle qui est loin de représenter la complexité tumorale. Les études in vitro sont traditionnellement effectuées sur des cultures de cellules adhérentes en 2-dimensions (2D)[264]. Bien que ces modèles aient fait leurs preuves dans de nombreuses études, ils présentent néanmoins des limites. En effet, en culture 2D, les cellules évoluent les unes à côté des autres et ne se chevauchent pas, une caractéristique qui empêche donc de refléter l'architecture compacte d'une tumeur ou de permettre d'évaluer la distribution ou la toxicité d'un médicament[265][266]. Ainsi, de nombreux modèles de culture en 3-dimensions (3D) ont été développés depuis quelques décennies et proposés comme alternatives à la culture 2D classique[267]. De plus, de récentes études ont démontré une différence significative de morphologie et de physiologie entre les cellules en 3D et celles cultivées en monocouche du fait de contraintes d'interaction physiques et biologiques différentes[266]. Les modèles en 3D apparaissent ainsi comme plus représentatifs de tumeurs in vivo que ceux en 2D, tant au niveau de la morphologie que de la physiologie des cellules, et permettent notamment de prendre en compte certaines caractéristiques tumorales telles que la prolifération, l'hypoxie ou la mort cellulaire[268]. Dans cette étude nous avons ainsi évalué l'influence des modifications d'AcM sur leur distribution et pénétration dans une structure cellulaire en 3D. Nous avons dans un premier temps développé et caractérisé un modèle de sphéroïdes à partir des cellules de carcinome épithélial colique HT29 (Matériel et Méthodes, page 90). Par la suite la distribution des conjugués Ts29.2-TCO_n (i.e. 0, 5, 10, 15, 20 et 30 équivalents de TCO pour 1 équivalent de Ts29.2) a été évaluée dans les sphéroïdes HT29 par microscopie confocale, en comparant les intensités de fluorescence mesurées pour chaque anticorps.

2. Résultats

Les sphéroïdes HT29 ont été incubés avec les conjugués Ts29.2-TCO_n puis co-traités avec un Ac secondaire couplé à du FITC ainsi qu'avec de la TZ-Cy3 avant d'être imagés par microscopie confocale (**Figure 52.A**). Les images ont été obtenues après mise au point d'un protocole de clarification (**cf. Matériel et Méthodes, page 92**). Elles montrent une co-localisation des signaux du FITC et de la Cy3 localisés au niveau membranaire ainsi qu'une absence de signal Cy3 dans la condition d'incubation avec le Ts29.2 ne contenant pas de TCO. Cela confirme ainsi l'interaction spécifique entre les conjugués Ts29.2-TCO_n et la TZ-Cy3 dans ces modèles 3D. Les acquisitions ont été réalisées sur différentes couches Z des sphéroïdes.

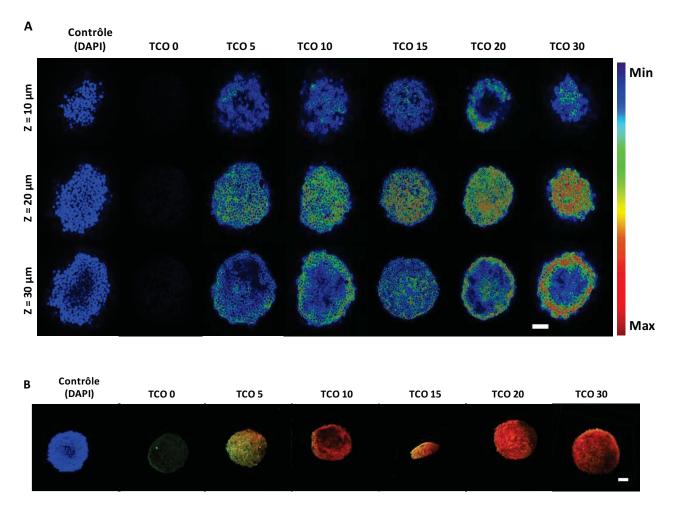


Figure 51 : Evaluation de la diffusion des anticorps Ts29.2-TCO_n dans les sphéroïdes HT29 par microscopie confocale. (A)Sphéroïdes HT29 incubés dans un premier temps avec 10 μ g/mL de Ts29.2 non greffé avec des TCO (= TCO 0) ou de Ts29.2 conjugués avec 5, 10, 15, 20 ou 30 équivalents de TCO suivis d'une co-incubation avec 1/500ème d'AcII-FICT et 0,02 mM de TZ-Cy3($_{550-570~nm}$). Les images sont représentées en fausses couleurs selon l'intensité du signal. Echelle : 100 μ m. (B) Projection 3D de la superposition des signaux AcII-FICT et TZ-Cy3 réalisée avec le logiciel Imaris®. Echelle : 100 μ m.

À une profondeur de 20 µm le signal est apparu maximal et homogène tandis qu'à 30 µm de profondeur les images ont montré des disparités dans l'intensité du signal entre la périphérie et le centre du sphéroïde. Nous avons observé, à la profondeur de 20 µm, une augmentation croissante de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de TCO conjugués par AcM. Ces résultats ont par ailleurs été confortés par les projections 3D effectuées avec le logiciel Imaris® (Figure 51.B)

Les observations par imagerie ont par la suite été quantifiées à la profondeur de 20 μm à l'aide d'un algorithme développé spécifiquement pour cette approche (Matériel et méthodes, pages 94 à 96) (Figure 52.A). De façon à comparer la diffusion des différents conjugués Ts29.2-TCO_n le signal mesuré pour la TZ-Cy3 a été rapporté au nombre moyen de TCO couplé par Ts29.2 (Figure 52.B). Aucune différence significative n'a été observée entre les diffusions des différents conjugués Ts29.2-TCO_n.

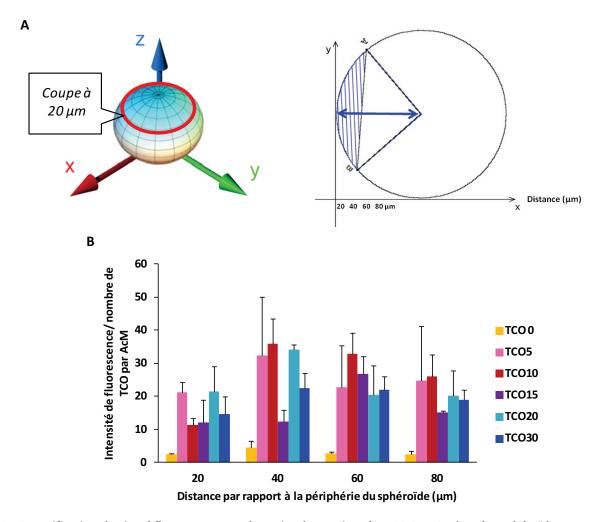


Figure 52 : Quantification du signal fluorescent membranaire des conjugués Ts29.2-TCO_n dans les sphéroïdes HT29. (A) Représentation schématique du fonctionnement de l'algorithme utilisé pour la quantification sous Fiji® (ImageJ). Les mesures ont été effectuées en 2D, à partir de la périphérie jusqu'au centre du sphéroïde (axes X, Y) à une profondeur de 20 μm (axe Z). (B) Intensités de fluorescences, quantifiées et rapportées au nombre de TCO conjugués par Ts29.2. Des analyses statistiques ont été réalisées avec un test de Fisher avec une correction de Bonferroni (p < 0,05 considéré comme significatif).

3. Discussion

Face à l'importante isomérisation des TCO en CCO conduisant à l'inactivation de près de 90 % des groupements réactifs en 24 h, l'addition d'un plus grand nombre de TCO par AcM pourrait être envisagée (cf. publication 2). Dans les publications portant sur le préciblage par chimie bioorthogonale, des variations du nombre moyen de TCO conjugué par AcM sont retrouvées, allant de 2-3 à 7-8 TCO par AcM[238][245][152]. L'impact de ces modifications sur la fraction immunoréactive de l'AcM et sur la diffusion des conjugués dans les tumeurs est néanmoins peu documenté. Concernant la reconnaissance AcM-TCO/Ag nous avons préalablement démontré que l'addition d'environ 1 à 10 TCO par Ts29.2 ou 35A7 n'altérait pas de façon significative les capacités de fixation des anticorps envers leurs antigènes respectifs[263]. En revanche, des questions demeurent concernant la diffusion des conjugués AcM-TCO dans les tumeurs solides, des structures compactes où la pénétration des AcMs natifs est connue pour être lente. En effet, l'encombrement stérique provoqué par l'addition de trop nombreux groupements pourraient entraver la pénétration des AcMs au sein des tumeurs et diminuer l'effet de la PRIT. Étudier la diffusion des conjugués AcM-TCO dans un modèle de sphéroïdes se révèle ainsi pertinent pour la compréhension de ces mécanismes.

L'uniformité des structures 3D est essentielle pour obtenir des résultats homogènes et reproductibles. Ainsi, les sphéroïdes HT29 utilisés dans cette étude avaient tous des diamètres homogènes d'environ $700 \pm 40~\mu m$. Malgré l'emploi d'un protocole de clarification (*i.e.* ClearT²[261]) permettant d'améliorer la réfraction de la lumière au sein de la structure compacte du sphéroïde, la visualisation des couches profondes du sphéroïde demeure cependant limitée. Le signal était détectable jusqu'à environ 30 μm de profondeur mais n'était pas homogène. Ainsi, les quantifications ont été effectuées sur la profondeur à 20 μm afin d'éviter les biais potentiels des limites techniques de détection. À cette profondeur, l'évaluation des conjugués Ts29.2-TCOn dans les sphéroïdes HT29 a montré qu'il n'y avait pas de différence significative quant à leur capacité de diffusion en 2D.

4. Conclusion

Dans le modèle de sphéroïde HT29, nous avons montré que les modifications apportées aux anticorps Ts29.2 n'influencent pas leur capacité de diffusion sur une profondeur de 20µm. Des améliorations des acquisitions confocales pourraient permettre de renforcer ces résultats et d'étudier l'influence des modifications des anticorps sur leur diffusion.

Étude des sondes tétrazines

I. Évaluations *in vivo* de différentes sondes TZ dans le préciblage de tumeurs péritonéales (Publication 3)

1. Résumé de l'article

De multiples études ont été réalisées ces dix dernières années sur la radioimmunothérapie (et/ou imagerie) préciblée par chimie bioorthogonale utilisant la réaction IEDDA[238][269][241]. La preuve de concept de l'efficacité thérapeutique de la PRIT a par ailleurs été démontrée en 2017 par l'équipe du P' Zeglis, utilisant des conjugués AcMs-TCO non PEGylés et des sondes TZ radiomarquées avec un radionucléide émetteur β- [244]. Les mêmes auteurs ont par la suite optimisé la PRIT de leur modèle, obtenant une régression totale des tumeurs dans les groupes traités, même à la plus faible activité (*i.e.* 18,7 MBq) associée à des pourcentages de survie bien supérieurs à ceux des groupes contrôles[245]. Ces résultats impressionnants ont été obtenus dans un modèle de tumeurs implantées en sous-cutanée. A notre connaissance aucune étude n'a à ce jour démontré la faisabilité de la PRIT utilisant la réaction IEDDA dans un modèle de tumeurs disséminées.

Dans un premier temps, nous avons donc réalisé la preuve de concept de la PRIT par réaction IEDDA dans le modèle orthotopique de carcinose péritonéale (cellules A431-CEA-Luc) en évaluant la biodistribution du radioligand par imagerie SPECT-CT et prélèvements. Pour cette première étude nous avons utilisé d'un côté des conjugués 35A7-TCO non-PEGylés (\approx 3-4 TCO/AcM) et de l'autre des sondes TZ-PEG₄-DOTA (*i.e.* TZ-1) radiomarquées au Lutécium-177 (**Fig. 1**). Une étude de thérapie a par la suite été réalisée avec ces mêmes composants et n'a pas donné de résultats positifs, ce qui nous a amené à reconsidérer la structure de la sonde TZ-1.

Ainsi, deux nouvelles sondes ont été synthétisées et radiomarquées : la TZ-PEG₈-DOTA-¹⁷⁷Lu (*i.e.* TZ-**3**) et la TZ-PEG₁₂-DOTA-¹⁷⁷Lu (*i.e.* TZ-**4**) (**Fig. 1**). La structure de la TZ-**4** est identique à celle décrite par Rossin et Robillard dans leurs études de biodistributions[238][269]. Les TZ-**1,3,4** diffèrent au niveau de la longueur de l'espaceur PEGylé situé entre la 1,2,4,5-tétrazine et le macrocycle DOTA, la 1,2,4,5-tétrazine étant quant-à-elle entourée de pyridines. D'autre part, la TZ-PEG₇-DOTA-¹⁷⁷Lu (*i.e.* TZ-**2**) qui a démontré son efficacité préclinique sur les tumeurs colorectales sous-cutanées[244][245] a également été évaluée dans cette étude. Sa structure diffère ainsi des trois autres à la fois au niveau du PEG et au niveau du cycle 1,2,4,5-tétrazine qui est seulement relié à un phényle au lieu des pyridines. Les TZ-**2,4** ont été utilisées comme références pour comparer à la fois l'influence de la

PEGylation et de l'encombrement stérique de la TZ dans son interaction avec les conjugués 35A7-TCO. Ces évaluations ont permis de déterminer la structure la plus favorable pour la PRIT de la carcinose péritonéale d'origine colorectale.

2. Résultats

a. Preuve de concept avec la TZ-1

Etant donné que le modèle étudié consiste en de petits nodules tumoraux disséminés dans la cavité péritonéale, nous avons testé deux modes d'injection différents pour les conjugués 35A7-TCO afin de déterminer la meilleure voie d'administration (*i.e.* i.v. ou i.p.). La TZ-1 a été injectée localement, en i.p., mode d'injection adapté à l'administration de sondes radioactives au moment de la chirurgie chez les patients et permettant de prévenir les risques potentiels d'hématotoxicité causés par le radioligand. Les biodistributions par imagerie et comptage des organes de la TZ-1 seule, sans injection préalable de conjugués 35A7-TCO, démontre une élimination hépatique, urinaire et fécale rapide du radioligand se produisant dans les 4 h p.i. (Fig. 2A). Des traces (≈ 1 %) de TZ-1 sont visibles au niveau hépatique au bout de 24 h. Dans les groupes ayant reçu 50 μg de conjugués 35A7-TCO nous avons observé une fixation spécifique rapide au niveau tumoral, visible en SPECT-CT à partir de 3 h p.i. avec également un fort signal au niveau urinaire. Les % d'Al/g de tumeurs atteignent un maximum de 4,2 % et 5,8 % lorsque les conjugués 35A7-TCO ont été injectés respectivement en i.v. ou en i.p., à 48 h post injection de la TZ-1 (Fig. 2B). Ces résultats montrent qu'aucune différence significative n'a été observée entre les deux modes d'injection utilisés.

Le mode d'injection i.p. des conjugués 35A7-TCO présentant une fixation aux tumeurs péritonéales légèrement supérieure au mode i.v., et permettant également de s'affranchir du risque d'hématotoxicité causé par une injection en systémique, celui-ci a été retenu pour l'étude de thérapie effectuée avec la TZ-1. Les souris ont été réparties aléatoirement dans les différents groupes de test (n=6 par groupe) : 3 groupes contrôles, injectés soit avec du NaCl, soit avec le conjugué 35A7-TCO soit avec 40 MBq de TZ-1 et 3 groupes traités avec des doses croissantes de TZ-1 (i.e. 10, 20 ou 40 MBq). Les injections et le suivi des animaux ont été réalisés en aveugle par le même opérateur. Le suivi par imagerie en bioluminescence n'a montré aucun ralentissement ni diminution de la croissance tumorale dans les groupes traités par rapport aux groupes contrôles (Supplementary Fig. S1). De plus, aucune différence significative n'a été observée dans les médianes de survie des animaux traités par rapport à ceux ayant reçu un placébo bien qu'une légère diminution soit observée pour le groupe traité avec 40 MBq de TZ-1 sans injection préalable d'AcM-TCO (Supplementary Fig. S2).

b. Biodistributions des TZ-1,3,4

La seconde expérience de biodistribution effectuée avec la TZ-1 a confirmé les résultats précédents, à savoir une élimination hépatique, rénale et urinaire rapide du radioligand. A l'inverse, les TZ-3,4 ont montré une élimination exclusivement urinaire (Fig. 3A-B). Le % d'Al/g dans le foie est significativement plus élevé pour la TZ-1 que pour les TZ-3,4 avec des valeurs respectives de 1,6 % vs 0,1 %. De plus, les quantifications sur les imageries SPECT effectuées sur l'ensemble de l'abdomen montrent un % d'Al/g significativement plus faible (de 4 à 5 fois) pour les TZ-3,4 que pour la TZ-1.

c. Comparaison des TZ-1-4

Les expériences de biodistribution des TZ-1-4 ont été évaluées par prélèvement des organes et des tumeurs à différents temps après injections i.p. A 24 h p.i. les TZ-1-4 présentent un profil d'élimination similaire, excepté pour la fixation hépatique de la TZ-1 qui se maintient à un niveau significativement plus élevé que les TZ-2-4 jusqu'à 144 h (Supplementary Fig. S3). De plus, à 48 h p.i. le % d'Al/g de la TZ-1 est significativement plus élevé dans le côlon et le caecum qu'avec les TZ-2-4 confirmant le profil d'élimination fécale de la TZ-1 observé précédemment en imagerie.

A 24 h p.i., le % d'Al/g dans les tumeurs est significativement plus faible pour la TZ-2 comparé aux TZ-1,3,4 avec une moyenne à 8,9 % pour la TZ-1 vs 4,0 %, 6,3 % et 3,5 % respectivement pour les TZ-1,3,4. Cette différence statistique n'est pas retrouvée au temps 48 h p.i. (Fig. 4). En revanche, à 144 h p.i., les TZ-2,3 ont un % d'Al/g de tumeurs significativement plus élevés que les TZ-1,4, avec des moyennes respectives à 5,6 % et 3,8 % vs 1,5 % pour les TZ-1,4. Aucune différence statistique n'a cependant été observée à 144 h p.i. entre les TZ-2 et TZ-3.

3. Discussion

La CP est traitée de façon standard par chirurgie, une thérapie dont l'efficacité peut être améliorée via l'administration de chimiothérapies chauffées à 42 °C, directement dans la cavité péritonéale et (*i.e.* chimio-hyperthermie intrapéritonéale, CHIP)[74]. Des études précliniques ont récemment été menées sur le traitement post chirurgical de la CP d'origine ovarienne avec de la RIT (avec un AcM 16F12 anti-MISRII) appliquée brièvement en intrapéritonéal (BIP-RIT) via un bain (non chauffé), de façon relativement similaire à la CHIP[270]. Plusieurs types d'émetteurs ont été utilisés dans cette étude, à savoir du β^- (*i.e.* 177 Lu) et de l' α (*i.e.* 213 Bi) afin de comparer leurs efficacités thérapeutiques dans ce modèle. En RIT classique, administrée par voie i.p., les auteurs ont démontré que le 16F12- 177 Lu était plus efficace que le même AcM 16F12 radiomarqué au Bismuth-213, avec un

ralentissement significatif de la croissance tumorale observé sur les 30 jours post traitement et une différence de masse tumorale moyenne de plus de dix fois entre les souris traitées et les souris contrôles NaCl[270]. En revanche, dans la stratégie de BIP-RIT c'est le 16F12-²¹³Bi qui s'est avéré le plus efficace dans le ralentissement de la progression tumorale. Ces résultats encourageants suggèrent que la PRIT par réaction IEDDA pourrait être intéressante dans ce type d'approche, notamment pour une application *per*-opératoire. En effet, l'administration des conjugués AcMs-TCO pouvant être effectuée 24 ou 48 h avant l'intervention chirurgicale cela permettrait de limiter de façon significative la quantité d'AcM dans la circulation au moment de l'injection du radioligand, réduisant ainsi les risques de toxicité.

Dans notre étude, nous avons démontré la faisabilité de l'imagerie SPECT de tumeurs péritonéales disséminées via la technique de préciblage par réaction IEDDA. Nous avons notamment obtenu un signal spécifique au niveau des nodules péritonéaux ainsi qu'une élimination rapide du radioligand. La clairance des sondes TZ-1-4 a été associée à de faibles % d'Al dans les organes non cibles, confortant l'intérêt d'une stratégie thérapeutique en deux temps dans ce type de pathologies. Les sondes TZ-1,3,4 ont cependant des profils pharmacocinétiques différents, à savoir : une clairance hépatique, rénale et fécale pour la TZ-1 alors que les TZ-3,4 sont uniquement éliminées par voie urinaire. Cette dichotomie pourrait ainsi expliquer les résultats déconcertants obtenus en thérapie avec la TZ-1, où l'on a notamment observé une inefficacité de la stratégie de PRIT, y compris à la plus forte activité injectée de 40 MBq. En effet, des études parues en 2017 ont démontré que la structure de la TZ influençait significativement sa distribution et in fine sa réactivité[254][253]. Les auteurs de ces études ont de plus conclu qu'une sonde TZ éliminée par voie hépatobiliaire et fécale était inadaptée dans le cas du ciblage de tumeurs coliques ou intestinales, ce qui s'applique ici à la TZ-1. Les biodistributions effectuées avec les TZ-2,3 tendent à appuyer ces observations, avec l'obtention de % d'Al/g dans les tumeurs, nettement supérieurs à ceux de la TZ-1. En revanche, l'obtention de % d'Al/g de tumeurs comparables entre la TZ-1 et la TZ-4, associé à l'élimination significativement plus rapide de cette dernière, suggère qu'un PEG trop long sur ce type de structure induit une élimination trop rapide, et est donc délétère pour l'interaction avec les TCO lorsqu'injectée en i.p.

Les structures TZ présentant les interactions les plus favorables avec les conjugués 35A7-TCO sont donc les TZ-2 et TZ-3. Nous avons utilisé la TZ-2, fournie par le P^r Zeglis[245], afin d'avoir une comparaison fiable avec un composé qui a montré des résultats spectaculaires en thérapie. Les TZ-2,3 possèdent ainsi un espaceur PEGylé du même ordre de grandeur (*i.e.* respectivement PEG₇ et PEG₈). Ainsi, la nature de l'espaceur PEGylé semble influencer la réactivité des TZ. De plus, bien que ces TZ aient des structures différentes, aucune différence significative n'a été observée dans les %

d'Al/g de tumeurs, suggérant ainsi que la structure de la TZ ne modifie pas ses capacités d'interaction avec les TCO.

4. Conclusion

L'imagerie de tumeurs disséminées *via* la stratégie de préciblage par chimie bioorthogonale est possible. De nombreux paramètres peuvent cependant influencer la réactivité entre les TCO et la TZ. Si les TCO peuvent être sujets à l'isomérisation, les rendant inactifs, la réactivité des sondes TZ est également un paramètre important à prendre en compte. Nous avons ainsi démontré que la nature de l'espaceur PEGylé influençait la pharmacocinétique de la TZ et *in fine* sa réactivité envers les TCO. Nous avons ainsi prévu d'effectuer la PRIT de la carcinose péritonéale avec la TZ-3, qui est celle présentant la meilleure réactivité dans notre modèle.

PUBLICATION 3

Pretargeted SPECT imaging of peritoneal carcinomatosis using bioorthogonal click chemistry: probe selection and first proof of concept

A. Rondon, S. Schmitt, A. Briat, N. Ty, M. Quintana, J-B. Bequignat, L. Maigne, B. Zeglis, R. Membreno, I. Navarro-Teulon, E. Moreau and F. Degoul

Soumis, 2018

Pretargeted SPECT imaging of peritoneal carcinomatosis using bioorthogonal click

chemistry: probe selection and first proof of concept

Aurélie Rondon^{1,2}, Sébastien Schmitt¹, Arnaud Briat¹, Nancy Ty¹, Mercedes Quintana¹, Jean-Baptiste

Bequignat¹, Lydia Maigne³, Brian Zeglis⁴, Rosemary Membreno⁴, Isabelle Navarro-Teulon², Emmanuel

¹ Clermont Université, Université d'Auvergne, Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, BP

184, F-63005 Clermont-Ferrand, France. Inserm, U 1240, F-63000 Clermont-Ferrand, France. Centre

Jean Perrin, F-63011 Clermont-Ferrand, France.

² Institut de Recherche en Cancérologie (IRCM), U1194 – Université Montpellier – ICM, Radiobiology

and Targeted Radiotherapy, 34298 Montpellier cedex 5.

³Université Clermont Auvergne, CNRS/IN2P3, Laboratoire de Physique de Clermont, UMR6533, 4

avenue Blaise Pascal TSA 60026 CS 60026 63178 Aubière cedex France

⁴ Department of Chemistry, Hunter College of the City University of New York, New York 10028

x s co-authors

*Corresponding author:

Françoise DEGOUL IMoST, UMR 1240, INSERM, UCA

58 Rue Montalembert

630005 Clermont-Ferrand

francoise.degoul@inserm.fr

Key words: Pretargeting, bioorthogonal chemistry, peritoneal carcinomatosis, therapy, SPECT-CT imaging

154

Abstract:

Inverse electron-demand Diels-Alder (IEDDA) cycloaddition fulfills attractive characteristics for pretargeted radioimmunotherapy with rapid in vivo ligation between trans-cyclooctene (TCO) and tetrazine (Tz) residues. However, the efficiency of this reaction may vary with the number, accessibility and functionality of TCO grafted on monoclonal antibody (mAb) and also according to Tz structure that should impact both its pharmacokinetics and affinity for TCO. We therefore previously showed with fluorescent Tz that mAb-TCO carrying no PEG linker would be more efficient for TCO/Tz interaction. In the present study, we focused on the Tz structure that should also impact the ligation efficiency in a disseminated peritoneal colorectal cancer model. We first successfully made the proof of concept of the SPECT imaging of peritoneal carcinomatosis using IEDDA bioorthogonal pretargeting strategy with 35A7-TCO and Tz-1. However, PRIT study made on orthotopic A431-CEA-Luc tumors with Tz-1 did not demonstrated any therapeutic efficacy, even at the higher injected activity (i.e. 40 MBq), leading us to reconsider the Tz structure. We thus synthesized and assessed two others Tz (i.e.Tz-3,4) in biodistributions experiments and compared those to both Tz-1 and Tz-2 which is a structure already published and demonstrated impressive results in PRIT. Biodistribution studies of Tz-1-4 demosntrated different pharmacokinetic profiles and allowed confirming that Tz-1 was not the most appropriate for PRIT as Tz-2,3 induced significant higher % of IA/g in tumors. Our results emphasize the need to select an efficient Tz probe for PRIT using bioorthogonal chemistry and demonstrated for the first time the possibility for SPECT imaging of disseminated tumors in peritoneal cavity using this approach.

Introduction:

Radioimmunotherapy (RIT) is an effective approach for the treatment of non-solid tumors such as non-Hodgkin lymphomas increasing overall survival in patients undergoing chemoresistance to tyrosine kinase inhibitors (*i.e.* ibritumomab tiuxetan, Zevalin®) [1]. However, clinical use of RIT still remains limited for solid tumors because of low penetrations of mAbs and hematotoxicity caused by the prolonged circulation time of radiolabelled monoclonal antibodies (mAbs) in blood [2]. To circumvent this critical drawback, pretargeted radioimmunotherapy (PRIT) strategies were further developed by delaying of the radiolabelled probe from the injection of mAbs in two distinct steps.

The oldest systems of PRIT approach, *i.e.* (strept)avidin-biotin [3] and bispecific antibodies (bsAbs) [4], are currently evaluated in clinical trials. Instead of (stretp)avidin-biotin system which demonstrated an important toxicity due (strept)avidin immunogenicity and its non-specific interaction with endogenous biotin [5], the bsAbs system reached successfully phase II/III [6]. Nonetheless, bsAbs structures are difficult to engineered, thus limiting their clinical exploitation. Then, the oligonucleotides systems, including phophorodiamidate morpholinos (MORFs) and peptide nucleic acids (PNAs) [7] demonstrated relevant interest for *in vivo* imaging [8],[9] but an important unspecific signal was reported in kidneys and liver, thus implying further optimizations before clinical translation.

The most recent PRIT system developed used bioorthogonal chemistry to obtain a specific binding between mAbs and radiolabelled probes through the interaction of two chemical entities. Among the different bioorthogonal reactions assessed, the inverse-electron demand Diels-Alder cycloaddition (IEDDA) is the most reactive, making it highly favorable for *in vivo* applications [10]. The IEDDA cycloaddition occurs between a dienophile such a *trans*-cycloactene (TCO) and a diene like 1,2,4,5-tetrazine (Tz) leading to a covalent binding directly *in vivo*, in physiological conditions (pH, temperature) and is highly specific due to the lack of reactivity of TCO and Tz towards biological macromolecules ensuring thus the safety of that procedure [10]. Preclinical applications of IEDDA are numerous for both PET/SPECT-CT imaging and PRIT on preclinical models bearing subcutaneous tumors [11]-[15]. However, to the best of our knowledge, no publication showed imaging or PRIT efficiency of IEDDA on disseminated tumors.

Peritoneal carcinomatosis (PC) consisted, through several dissemination mechanisms, in the progressive invasion of peritoneal cavity by tumors from various origin[59]. Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in the world with frequent metastasis occurring in liver, lungs and in peritoneal cavity[16],[17]. Metastatic CRC is also the predominant origin of PC, often associated with poor prognosis [18]. Regimen of PC from CRC origin consists in removing tumors by surgery and

could be associated with chemotherapy administrated either by systemic routes or directly intraperitoneally [18]. In addition, the effect of chemotherapy could be potentiated by heating at 42 °C, a hyperthermic method applied intra-operatively [19],[20]. Despite improvement of median and overall survivals was obtained by combining cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC), both direct morbidity and general mortality still remain high implying the therapeutic PC management needs to be optimized [21]. RIT on metastatic CRC has already demonstrated some effectiveness in preclinical models [22]-[25]. Furthermore, a recent protocol consisting to briefly administer RIT intraperitoneally [26],[27] suggests that PRIT approach with a local intraperitoneal injection of radiolabelled Tz could be suitable for the treatment of PC.

In this study we used an anti-CEA non-internalizing 35A7 mAb [28] and Tz-1-4 (Fig. 1) radiolabelled with lutetium-177 in mice bearing orthotopic A431-CEA-Luc tumors and we have made the first proof of concept of SPECT-CT imaging of peritoneal carcinomatosis from CRC origin using PRIT with IEDDA cycloaddition. We assessed the influence of the 35A7-TCO injection routes (intravenous (i.v.) or intraperitoneally (i.p.)) on the interaction with Tz-1 i.p. injected. Then, we blindly conducted a therapy study with 35A7-TCO and Tz-1 both i.p. injected by assessing doses escalations (10, 20 or 40 MBq). The disappointing results obtained in this PRIT study bring us to reconsider the structure of Tz-1 which was supposed to be eliminated too quickly. We then have evaluated three different Tz structures (i.e. TZ-1,3,4) in terms of both pharmacokinetics and activities measured in tumors to determine the most appropriated one for pretargeting on this model. Biodistributions of Tz-1,3,4 were finally compared to the Tz-2 one which has already demonstrated impressive efficiency on subcutaneous models [14],[15]. The most appropriate Tz will thus be selected in order to perform a new PRIT on disseminated model of peritoneal carcinomatosis from colorectal origin.

Results

Tz-1-4 radiolabelling with lutetium-177

We first radiolabelled TZ-1 using method B consisting to heat 20 min at 50 ° C with both high radiochemical purity (98 %)and high molar activity (>8 GBq/μmol) but it induced poor radiochemical yields (≈ 60 %) (Table. 1). This method was assessed for TZ-3 radiolabelling with both bad yields and purities (respectively 36 % and 24 %) but was unsuccessful for TZ-4 radiolabelling (data not shown). The radiolabelling method described by Zeglis et al.[241] (*i.e.* method A), performed at room temperature, was thus tested and led to an improvement of both radiochemical yields and purities and was associated with higher stability of the final compound. Using method A, Tz-1,3,4 were efficiently synthesized with 79-89 % overall yields and a radiochemical purity equal or superior to 90 % (Table. 1).

Pharmacokinetics of Tz-1 according to different injection routes for 35A7-TCO, therapy experiment

Mice SPECT imaging made after 1 h i.p. injection of Tz-1 without prior injection of 35A7-TCO showed a rapid hepatobiliary, intestinal and urinary elimination (**Fig.2.A**). At 24 h p.i. of Tz-1, the radioligand seemed completely cleared with few traces remaining into the liver. Biodistributions confirmed the elimination profile of Tz-1 with high percent of injected activities *per* gram of tissue (% IA/g) measured respectively in liver, caecum and colon at 3 h p.i. reaching 6.10 ± 0.016 %, 12.63 ± 0.024 % and 12.73 ± 0.019 % (**Fig2 A**). At 24 h p.i. of Tz-1, the % of IA in caecum, colon and kidneys were under 1 % while the higher activity remaining in mice was observed in liver (*i.e.* 1.51 ± 0.001 %) which is consistent with SPECT imaging. In addition, circulating signal measured in both blood and peritoneum rapidly decreased in less than three hours at residual levels (< 0.5 %). Both imaging and organ counting confirmed the lack of non-specific interaction of Tz-1 on peritoneal tumors.

Identical elimination profile of Tz-1 was obtained in mice which received 35A7-TCO and no statistical difference was observed between the two different injection modes (*i.e.* i.v. or i.p.). Furthermore, in those groups there was a specific recognition of peritoneal carcinomatosis observable using SPECT imaging which was maintained durably at least three days after Tz-1 injection (**Fig. 2B**). The % of IA reached a maximum in tumors 48 h after Tz-1 injection with values measured at 4.07 ± 0.027 % and 5.50 ± 0.020 % when 35A7-TCO was respectively injected i.v. or i.p. However, there was no statistical difference between the two 35A7-TCO injection routes.

A first study was conducted to assess Tz-1 efficiency pretargeted with 35A7-TCO on A431-CEA-Luc disseminated tumors using increasing activities (*i.e.* 10, 20 or 40 MBq) but this PRIT failed to be efficient (Supplementary Figure S1). These results suggest that Tz-1 was not optimal under these

conditions potentially due to its clearance. Therefore, other Tz structures, bearing different PEG lengths, were synthesized and radiolabelled to determine a most appropriate for PRIT (**Table 1**).

Comparison of different Tz biodistribution profiles

We first assessed biodistribution by SPECT imaging of Tz-3,4 at 2 h and 24 h p.i., without prior injection of 35A7-TCO, and compared it with the biodistribution profile of Tz-1 (Fig. 3A). In this study Tz-1,3,4 were all radiolabelled using method A. No significant difference between radiolabelling method A and B was observed using neither imaging nor organ counting for Tz-1. Results demonstrated that Tz-3,4 have different biodistributions profiles than Tz-1 (Supplementary Figure S2). Indeed, both imaging and organ counting showed renal clearance for Tz-3,4 instead of hepatic/fecal for Tz-1. In addition, Tz-3 possessed a significant longer circulation time in blood than the two others (Fig. 3B). Similarly to Tz-1, only residual activities were obtained in peritoneum after i.p. injection of Tz-3,4 thus ensuring that those new structures are inert towards unspecific targets.

Pretargeted imaging made with i.v. injection of 35A7-TCO followed 24 h later by an i.p. injection of Tz-1-4 demonstrated a specific ligation on peritoneal tumors thus confirming their reactivity towards TCO (Supplementary Figure S3). However, variations in the % IA /g of tumors were observed between the different structures with maximum means obtained at 144 h p.i. of Tz-2,3 (Fig4 .). Indeed, % of IA /g of tumors were significantly higher with Tz-2 at both 24 h and 144 h p.i. compared respectively to Tz-4 and Tz-1,4 while the % IA in tumors with Tz-3 were significantly higher at 144 h compared to both Tz-1 and Tz-4. However, at the three different times p.i. no significant difference in the % of IA in tumors was measured between Tz-2 and Tz-3.

Discussion

Pretargeted radiommunotherapy of peritoneal carcinomatosis has been challenged by bioorthogonal chemistry on CEA-expressing cells, 35A7-mAb grafted with TCO and different Tz structures radiolabeled with lutetium-177. Two protocols of radiolabeling were applied; one involving a heating step gave lower radiochemical yields and required a longer preparation time. In contrast the method described by Membreno et al.[15] allows a quick and efficient radiolabeling with molar activities 5-6 time higher than those found by Lapchen et al.[29]

In a first biodistribution experiment on orthotopic A431-CEA-Luc disseminated tumors, we used the Tz-1 radiolabeled with procedure A for selection of the best administration route of 35A7-TCO. Indeed, PC is a cancer mainly managed by surgical cytoreduction of tumor lesions [18] and we thus planned to take advantage of such intervention for intraperitoneal administration of Tz probes following a 24 h delay after mAb-TCO injection. We observed that similar % of IA/g in tumors between i.v. and i.p. injections of 35A7-TCO reaching about 5 % in both cases. The fast elimination of TZ allowed getting a very good SPECT imaging contrast and suggests the possibility to use fluorescent Tz in per-operatory process to guide the eye of the surgeon. However, Tz-1 displayed also high nonspecific background in elimination organs such liver and intestines which can be a drawback in this kind of pathology. We choose the i.p. injection for 35A7-TCO as it would allow a better penetration of mAbs in these small tumors due to local administration. Tz-1 was thus assessed for therapeutic purpose and was i.p. injected 24 h later than the i.p. injection of 35A7-CO with activities reaching 40 MBq. This protocol failed to show any significant effect neither on survival nor tumor growth slow down (Supplementary information). We therefore thought that dosimetry was not sufficient. A rapid calculation using S factors from similar colon xenograft tumors [30] and Tz-1 biodistribution allow estimating of 20 Gy deposit following the injection of 40 MBq. Indeed, previous studies on this model revealed efficient tumor growth control when the 35A7 mAb was directly radiolabelled with ¹²⁵I or ²¹²Pb leading to a dosimetry of 110 Gy (2*37 MBq injected) and 35.5 Gy (for 1.48 MBq injected) respectively [28],[31]. However, these results were obtained in smaller tumors as mice were treated three days after grafting compared to a 21 day delay in our experiments. To go further on this model, we tested two new Tz structures (i.e. Tz-3,4) and compared them to the Tz-2 previously characterized [15]. This latter differs from Tz-1-3-4 by the number of bonds occurring between DOTA cage and lutetium, Tz-2 harboring an octavalent compared to a hexavalent coordinence and by the absence of the phenyl at the edge of the molecule. Biodistribution of the 4 radiolabeled ligands by the method described by Zeglis and co-workers [15], confirmed the first experiment data on Tz-1 and highlighted a better performance for Tz-2 and Tz-3 in this model. Our study gives some insights on the Tz structures functionality with a better fixation with PEG₇₋₈ linkers. Notably we also demonstrated that Tz-1 was stalled in elimination organs, possibly due to a more hydrophobic behavior. Indeed, the hepatobiliary clearance of Tz-1 may not be compatible with a targeting of peritoneal tumors, as suggested by Läppchen and co-workers [29]. Pharmacokinetic profiles of Tz-2,3,4 thus could be more suitable. However, we failed to reveal any difference in log p for Tz-1,3,4. We also demonstrated that Tz-4 was eliminated to fast which decreased the interaction with 35A7-TCO.

Next experiments are ongoing to test the efficiency of Tz-3. The very low fixation rate in the non-targeted organs for Tz will support a multiple injection protocol of both 35A7-TCO and Tz-3, consistently previous RIT in this model has been performed with double administration of 100 μ g mAb 35A7 [31].

In conclusion, biodistribution studies of Tz-**2,3** bearing longer PEG linker than Tz-**1** showed a tumor activity encouraging for PRIT to target disseminated tumors in peritoneal cavity.

Methods:

Cell line and antibody.

A431-CEA-Luc epithelial colon carcinoma cell line, transfected with constructs encoding both CEA and luciferase and the non-internalizing murine anti-CEA mAb 35A7 (IgG1) were both provided by Dr. J-P. Pouget and Dr. I. Navarro-Teulon (IRCM, Inserm, Montpellier, France) [28]. The cell line was maintained at 37 °C with 5 % CO₂ in humidified environment in Dulbecco's Modified Eagle F12 Medium supplemented with 10 % foetal serum. Moreover, 1 % penicillin/streptomycin and 1 % geneticin, 1 % hygromycin added extemporaneously.

mAbs-TCO conjugation.

Both conjugation of TCO on 35A7 and MALDI-TOF MS quantification of the number of TCO moieties grafted *per* mAb were made as described[263].

Tz Syntheses.

Tz-2 was kindly provided by Dr. B. Zeglis and R. Membreno (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA) [14]. Syntheses of Tz-1,3,4 were detailed in supplementary information.

Radiolabelling.

Tz-2 and Tz-4 were radiolabelled with lutetium-177 as previously described [15]. For Tz-1 and Tz-3, two different radiolabelling methods were assessed (*i.e.* method A and method B). First biodistribution experiment on Tz-1 as well as therapy study were performed using method A radiolabelling while the second biodistribution comparing Tz-1-4 was performed using method B radiolabelling. Radiolabelling methods were detailed in supplementary information.

Animals. This investigation is conforms to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication n°85-236, revised 1996). In addition, all experiments were made in accordance with the relevant guidelines and regulations and were approved by both the local Ethic committee of Clermont-Ferrand (CEMEAA n°002) and French Ministry of Education and Research (approval n°5103-2016042010209100). A total of 138 female mice (Nude NMRI Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}) acquired from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isles, France) were used for the whole experiments. Mice (5 weeks old, median weight 22 g) were housed in standard

conditions (n=5 per cage), on ventilated racks, with a 21-24 °C temperature comprising 60 % humidity and a 12 h light / 12 h dark cycle with access to food and water *ad libitum*. All i.v. injections were made in lateral tail vein of vigil mice without any heating using infra-red lamp (veins were dilated using cotton dipped in hot water to avoid risks of TCO to CCO isomerization). All i.p. injections were made on vigil mice in the lower right quadrant of the abdomen. For in vivo imaging, mice were placed under general gas anesthesia using isoflurane at 2.5 *per* cent and 2:3 oxygen. Euthanasia was performed by cervical dislocation after isoflurane gas overdose.

Biodistributions studies. Prior to biodistributions experiments mice were xenografted i.p. with $1.10^6/250~\mu$ L A431-CEA-Luc cells. Tumor growth was followed one day after the graft and 3 days before experiments using bioluminescence imaging after 250 μ L i.p. injections of 15 mg/mL of luciferin (IVIS Spectrum, PerkinElmer, France). Twenty-one days after the graft, mice were randomly assigned to a protocol group.

Influence of the injection routes of 35A7-TCO. 30 mice were divided into three groups (n= 9 or 12 per group). An amount of 50 μg of 35A7-TCO (≈ 3-4 TCO per mAb) was either i.v. (group 1, n=9) or i.p. (group 2, n=9) injected followed 24 h later by i.p. injection of 10 MBq of Tz-1) In those groups mice were sacrificed at 24 h, 48 h and 144 h after Tz-1 injection. Control group (group 3, n=12) consisted in the i.p. injection of Tz-1. In this group mice were sacrificed at 5 min, 1 h, 3 h and 24 h after Tz-1 injection. After all mice sacrifice, peritoneal carcinomatosis tumors and principal tissues (i.e. blood, heart, liver, kidneys, caecum, colon, muscle and bone marrow) were harvested and counted in a gamma counter (1480 automatic gamma counter, Wallac Wizard 3", PerkinElmer, France).

Biodistribution of different structures of Tz probes. 9 mice were randomly divided into three groups (n=3 per group) and were then i.p. injected with 10 MBq of TZ-1, Tz-3 or Tz-4. At 2 h and 24 h after Tz-1-4 injections, mice were imaged using SPECT-CT followed by sacrifice and organs counting (at time 24 h).

Influence of Tz structure on pretargeting. 54 mice were divided into 4 groups (n=9 or 18 per group) and then i.p. injected with 50 μ g of 35A7-TCO (\approx 3-4 TCO per mAb) followed 24 h later by the injection of Tz-1, Tz-2, Tz-3 or Tz-4.

SPECT-CT imaging. Multimodal SPECT-CT imaging was performed using a NanoScan SPECT/CT camera (Mediso Ld) equipped with four detectors and multi pinhole collimation (APT62) and Nucline software (Mediso Ltd) for images acquisition and reconstruction (Nucline 3.00.018.000, TeraTomo 3D

normal dynamic range). CT parameters: helical scan with 480 projections (300 ms per projection), 50 kV, 590 uA, pitch 1.0, binning 1:4, field of view: max. SPECT parameters: SPECT images were acquired within the CT scan range, with a standard resolution. The time per projection was determined in accordance to the detected radioactivity (most frequently used: 30 seconds). Mice were placed in a Multicell Mouse L bed (Mediso Ltd) with temperature control (37°C).

SPECT-CT imaging was performed on representative mice (n=2 or 3) of each pretargeting group at different time points (*i.e.* 2 h, 24 h, 48 h and 72 h) after TZ-**1-4** injections.

Pretargeted radioimmunotherapy. After 21 days of tumor growth, 42 mice were blindly assigned to 6 groups (n= 6 or 12 per group). Mice were housed at 3 per cage in an armored enclosure with 12 h light and 12 h dark cycles and free access to food and water. Control non-radioactive mice were housed separately to avoid cross-irradiation. Mice were first i.p. injected with 50 μ g of 35A7-TCO (\approx 3-4 TCO per mAb) followed 24 h later by i.p. injection of 10, 20 or 40 MBq of TZ-1. Control groups received either 50 μ g of 35A7-TCO i.v. followed 24 h later by i.p. injection of saline, two injections (i.v. and 24 h later i.p.) of saline or i.v. injection of saline followed 24 h later by i.p. injection of 40 MBq of TZ-1.

Tumor growth assessment. Tumor growth was followed using bioluminescence imaging once a week.

Survival. Survival was assessed by monitoring lose of weight, observation of mice behavior and according to apparition of clinical signs such as anemia, pain, or palpable tumor mass. All observations were reported in a score grid (*i.e.* absence, moderate, severe annotations) and mice were thus sacrificed when maximal ethical disease activity index was reached. Survival and tumor growth were realized blindly three times a week by the same operator.

PCI determination. We performed the peritoneal carcinomatosis index (PCI) -a standard method allowing quantifying the number of peritoneal tumors through the attribution of a score ranging from 1 to 39, which correlates the severity of the disease- during necropsy. PCI was determined according to the score method described by Sugarbaker [19] and adapted for rodents by Klaver *et al.* [33].

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using XLSTAT 212 software. Continuous data were expressed as mean \pm standard deviation (SEM) and were compared using one-way, two-way ANOVA or Tukey test. Survival was compared using Kaplan-Meier test. We considered p < 0.05 as statistical significant.

Bibliography:

- [1] T. E. Witzig et al., "Phase I/II Trial of IDEC-Y2B8 Radioimmunotherapy for Treatment of Relapsed or Refractory CD20 + B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma," Journal of Clinical Oncology, vol. 17, no. 12, pp. 3793–3803, Dec. 1999.
- [2] I. Navarro-Teulon, C. Lozza, A. Pèlegrin, E. Vivès, and J.-P. Pouget, "General overview of radioimmunotherapy of solid tumors," Immunotherapy, vol. 5, no. 5, pp. 467–487, May 2013.
- [3] D. J. Hnatowich, F. Virzi, and M. Rusckowski, "Investigations of avidin and biotin for imaging applications," J. Nucl. Med., vol. 28, no. 8, pp. 1294–1302, Aug. 1987.
- [4] D. A. Goodwin, C. F. Meares, M. J. McCall, M. McTigue, and W. Chaovapong, "Pre-targeted immunoscintigraphy of murine tumors with indium-111-labeled bifunctional haptens," J. Nucl. Med., vol. 29, no. 2, pp. 226–234, Feb. 1988.
- [5] P. Magnani et al., "Diagnosis of persistent ovarian carcinoma with three-step immunoscintigraphy," British Journal of Cancer, vol. 82, no. 3, pp. 616–620, Feb. 2000.
- [6] F. Kraeber-Bodéré, J. Barbet, and J.-F. Chatal, "Radioimmunotherapy: From Current Clinical Success to Future Industrial Breakthrough?," Journal of Nuclear Medicine, vol. 57, no. 3, pp. 329–331, Mar. 2016.
- [7] J. Summerton, D. Stein, S. B. Huang, P. Matthews, D. Weller, and M. Partridge, "Morpholino and Phosphorothioate Antisense Oligomers Compared in Cell-Free and In-Cell Systems," Antisense and Nucleic Acid Drug Development, vol. 7, no. 2, pp. 63–70, Apr. 1997.
- [8] G. Liu, S. Dou, Y. Liu, Y. Wang, M. Rusckowski, and D. J. Hnatowich, "90 Y labeled Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer for Pretargeting Radiotherapy," Bioconjugate Chemistry, vol. 22, no. 12, pp. 2539–2545, Dec. 2011.
- [9] G. Mardirossian et al., "In vivo hybridization of technetium-99m-labeled peptide nucleic acid (PNA)," J. Nucl. Med., vol. 38, no. 6, pp. 907–913, Jun. 1997.
- [10] M. L. Blackman, M. Royzen, and J. M. Fox, "Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reactivity," Journal of the American Chemical Society, vol. 130, no. 41, pp. 13518–13519, Oct. 2008.
- [11] R. Rossin et al., "In Vivo Chemistry for Pretargeted Tumor Imaging in Live Mice," Angewandte Chemie International Edition, vol. 49, no. 19, pp. 3375–3378, Apr. 2010.
- [12] R. Rossin, S. M. J. van Duijnhoven, T. Läppchen, S. M. van den Bosch, and M. S. Robillard, "Trans -Cyclooctene Tag with Improved Properties for Tumor Pretargeting with the Diels–Alder Reaction," Molecular Pharmaceutics, vol. 11, no. 9, pp. 3090–3096, Sep. 2014.
- [13] J. L. Houghton, B. M. Zeglis, D. Abdel-Atti, R. Sawada, W. W. Scholz, and J. S. Lewis, "Pretargeted Immuno-PET of Pancreatic Cancer: Overcoming Circulating Antigen and Internalized Antibody to Reduce Radiation Doses," Journal of Nuclear Medicine, vol. 57, no. 3, pp. 453–459, Mar. 2016.

- [14] J. L. Houghton et al., "Establishment of the In Vivo Efficacy of Pretargeted Radioimmunotherapy Utilizing Inverse Electron Demand Diels-Alder Click Chemistry," Molecular Cancer Therapeutics, vol. 16, no. 1, pp. 124–133, Jan. 2017.
- [15] R. Membreno, B. E. Cook, K. Fung, J. S. Lewis, and B. M. Zeglis, "Click-Mediated Pretargeted Radioimmunotherapy of Colorectal Carcinoma," Molecular Pharmaceutics, vol. 15, no. 4, pp. 1729–1734, Apr. 2018.
- [16] F. Coccolini, "Peritoneal carcinomatosis," World Journal of Gastroenterology, vol. 19, no. 41, p. 6979, 2013.
- [17] E. J. Kuipers et al., "Colorectal cancer," Nature Reviews Disease Primers, p. 15065, Nov. 2015.
- [18] K. Murono, "Regimens of Intraperitoneal Chemotherapy for Peritoneal Carcinomatosis from Colorectal Cancer," Anticancer Research, vol. 38, no. 1, Jan. 2018.
- [19] P. H. Sugarbaker, "Intraperitoneal chemotherapy and cytoreductive surgery for the prevention and treatment of peritoneal carcinomatosis and sarcomatosis," Semin Surg Oncol, vol. 14, no. 3, pp. 254–261, May 1998.
- [20] V. J. Verwaal, S. Bruin, H. Boot, G. van Slooten, and H. van Tinteren, "8-Year Follow-up of Randomized Trial: Cytoreduction and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy Versus Systemic Chemotherapy in Patients with Peritoneal Carcinomatosis of Colorectal Cancer," Annals of Surgical Oncology, vol. 15, no. 9, pp. 2426–2432, Sep. 2008.
- [21] H. J. Braam et al., "Patterns of recurrence following complete cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer: Recurrence Following HIPEC," Journal of Surgical Oncology, vol. 109, no. 8, pp. 841–847, Jun. 2014.
- [22] M. Ychou et al., "Adjuvant Radioimmunotherapy Trial with Iodine-131-Labeled Anti-Carcinoembryonic Antigen Monoclonal Antibody F6 F(ab')2 after Resection of Liver Metastases from Colorectal Cancer," Clinical Cancer Research, vol. 14, no. 11, pp. 3487–3493, Jun. 2008.
- [23] H. Hanaoka et al., "Fractionated Radioimmunotherapy with 90 Y-Labeled Fully Human Anti-CEA Antibody," Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, vol. 29, no. 2, pp. 70–76, Mar. 2014.
- [24] F. Aarts, T. Hendriks, O. C. Boerman, M. J. Koppe, W. J. G. Oyen, and R. P. Bleichrodt, "A Comparison Between Radioimmunotherapy and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy for the Treatment of Peritoneal Carcinomatosis of Colonic Origin in Rats," Annals of Surgical Oncology, vol. 14, no. 11, pp. 3274–3282, Oct. 2007.
- [25] G. M. de Jong, R. P. Bleichrodt, A. Eek, W. J. G. Oyen, O. C. Boerman, and T. Hendriks, "Experimental study of radioimmunotherapy versus chemotherapy for colorectal cancer," British Journal of Surgery, vol. 98, no. 3, pp. 436–441, Mar. 2011.
- [26] V. Boudousq et al., "Brief Intraperitoneal Radioimmunotherapy of Small Peritoneal Carcinomatosis Using High Activities of Noninternalizing 125I-Labeled Monoclonal Antibodies," Journal of Nuclear Medicine, vol. 51, no. 11, pp. 1748–1755, Nov. 2010.

- [27] E. Deshayes et al., "Radiolabeled Antibodies Against Müllerian-Inhibiting Substance Receptor, Type II: New Tools for a Theranostic Approach in Ovarian Cancer," Journal of Nuclear Medicine, vol. 59, no. 8, pp. 1234–1242, Aug. 2018.
- [28] V. Boudousq et al., "Comparison between Internalizing Anti-HER2 mAbs and Non-Internalizing Anti-CEA mAbs in Alpha-Radioimmunotherapy of Small Volume Peritoneal Carcinomatosis Using 212Pb," PLoS ONE, vol. 8, no. 7, p. e69613, Jul. 2013.
- [29] T. Läppchen et al., "DOTA-tetrazine probes with modified linkers for tumor pretargeting," Nuclear Medicine and Biology, vol. 55, pp. 19–26, Dec. 2017.
- [30] A. Maisonial-Besset et al., "Tetraspanin 8 (TSPAN 8) as a potential target for radioimmunotherapy of colorectal cancer," Oncotarget, Feb. 2017.
- [31] L. Santoro et al., "Noninternalizing Monoclonal Antibodies Are Suitable Candidates for 1251 Radioimmunotherapy of Small-Volume Peritoneal Carcinomatosis," Journal of Nuclear Medicine, vol. 50, no. 12, pp. 2033–2041, Dec. 2009.
- [32] A. Rondon et al., "Antibody PEGylation in bioorthogonal pretargeting with transcyclooctene/tetrazine cycloaddition: in vitro and in vivo evaluation in colorectal cancer models," Scientific Reports, vol. 7, no. 1, Dec. 2017.
- [33] Y. L. B. Klaver, T. Hendriks, R. M. L. M. Lomme, H. J. T. Rutten, R. P. Bleichrodt, and I. H. J. T. de Hingh, "Intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy after cytoreductive surgery for peritoneal carcinomatosis in an experimental model," British Journal of Surgery, vol. 97, no. 12, pp. 1874–1880, Dec. 2010.

Legends for Figures:

Figure 1: Structures and radiochemical properties of Tz-1-4. Radiolabelling was performed in two different ways, method (A) or method (B). (A): 10 min at room temperature in AcONH4 250 mM. (B): 20 min at 50 °C in AcONa 20 mM.

Figure 2: SPECT imaging and biodistributions of Tz-1 in absence (A) or presence (B) of 35A7-TCO in mice bearing orthotopic A431-CEA-Luc tumors. A representative image is shown on the left side and biodistributions were represented at the right side by histograms (n=3 mice *per* time point). Two protocols of injection were tested (2B) with i.p. or i.v. injection of 35A7-TCO followed both by i.p. injection of Tz-1.

Figure 3: SPECT imaging (A), biodistribution (B) and image quantification (C) of Tz 1,3,4 in mice bearing orthotopic A431-CEA-Luc tumors. A representative image is shown on the left side and biodistributions were represented at the right side by histograms (n=3 mice *per* time point).*P<0.05.

Figure 4: Biodistribution of Tz-1,2,3,4 in mice bearing orthotopic A431-CEA-Luc tumors. Tumors were weighted and counted separately, when possible 5 for each mouse (n=3 mice *per* time point). Each point represents a tumor, red bar and cross corresponds to the median and mean values, respectively. *P<0.05, **P<0.01.

Supplementary Figure 1 & 2:

Pretargeted radioimmunotherapy of in mice xenografted with A431 cells in peritoneal cavity.

6 mice were used per condition, the experiment was performed in two step then 12 mice are present in the control group. All the experiments were made blindly. The bioluminescence (Sup 1) was assessed once a week and used as an indirect tumor growth measurement. Each curve represents a mouse. No statistical significance could be pointed out. A score grid was also taken into account for the euthanasia decision. The percent survival (Sup. 2) did not allow disciminating any group.

Supplementary Figure 3:

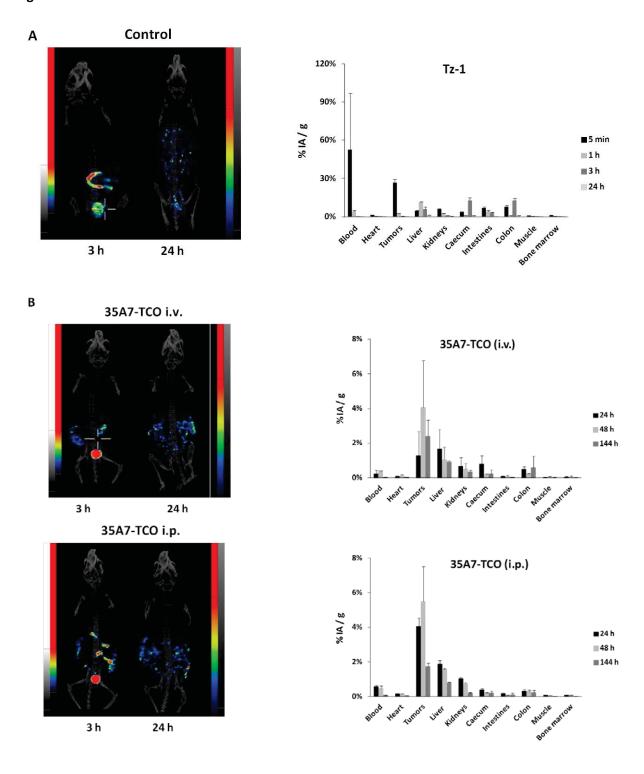
Biodistributions of Tz 1,2,3,4 in mice xenografted with A431 cells in peritoneal cavity. n = 3mice per point

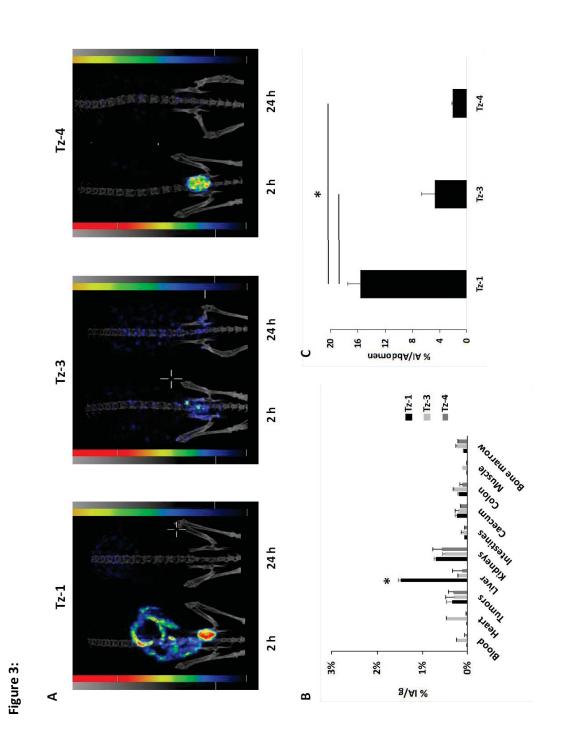
Figures

Figure 1:

| Compounds | Structures | Radiochemical yields | Radiochemical purities | Molar activities (GBq/μmol) |
|-----------|------------|----------------------|------------------------|-----------------------------------|
| Tz-1 | | 79 (A) 62 (B) | > 99 98 | 12,2 >8 |
| Tz-2 | | 93 (A) | >99 | 13,9 |
| Tz-3 | | 89 (A) | 95 | 9,3 |
| Tz-4 | | 88 (A) | 90 | 7,4 |

Figure 2:





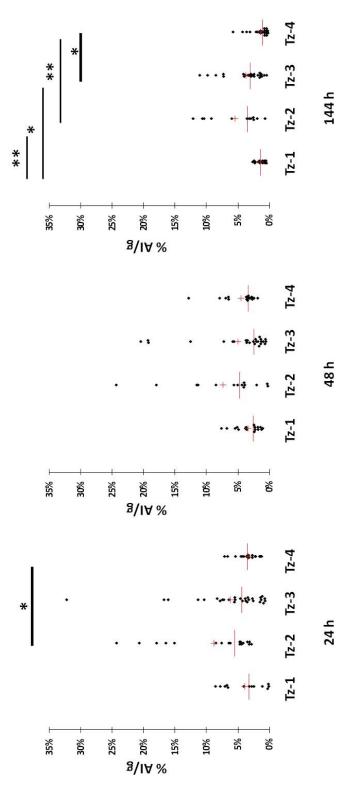
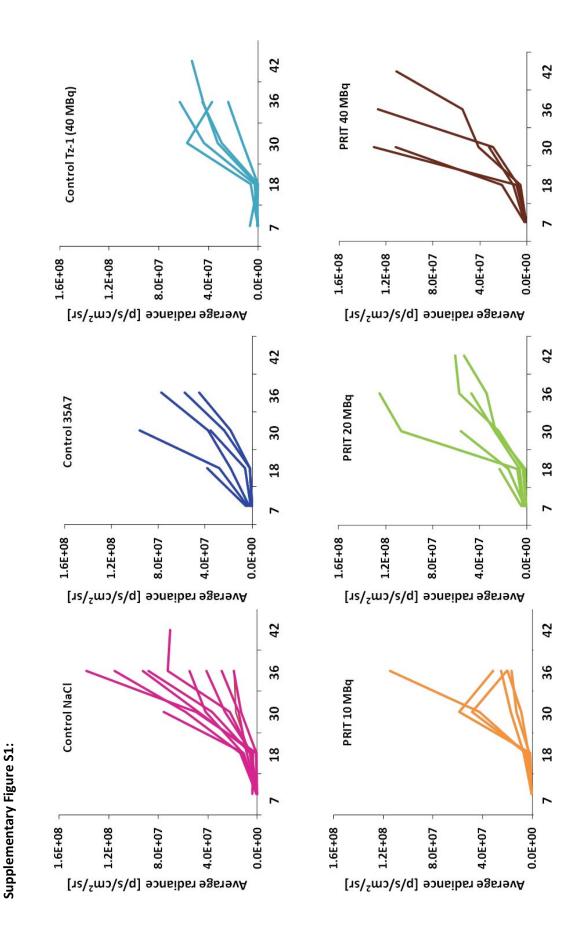
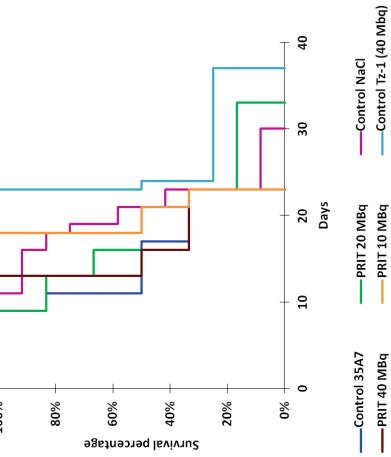


Figure 4:

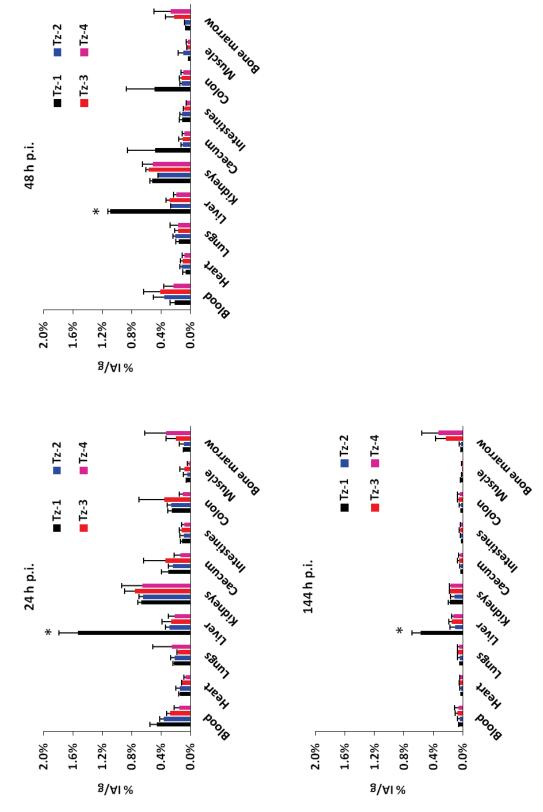






175

Supplementary Figure S3:



Partie 5 : Discussions et perspectives

La CP est un stade d'évolution au cours duquel les tumeurs sont disséminées dans l'ensemble de la cavité péritonéale, ce qui complique fortement la prise en charge thérapeutique, expliquant ainsi les faibles chances de survie associées à cette pathologie[63]. Bien que des traitements agressifs, tels que l'exérèse chirurgicale et la CHIP permettent d'augmenter significativement les chances de survie des patients ceux-ci restent sources d'importantes co-morbidités et mortalités [59]. En effet, la CHIP est une thérapie lourde, qui diffuse la chimiothérapie dans l'ensemble de la cavité péritonéale, ciblant de façon non-spécifique aussi bien les tumeurs que les tissus sains périphériques provoquant de fait d'importantes toxicités [77]. Quant-à la chirurgie, bien qu'indispensable, elle est très souvent associée à une rechute de la CP du fait que les plus petits nodules (< 2-3 mm) sont difficilement détectables à l'œil nu.

La RIT représente un intérêt grandissant dans le traitement des tumeurs solides et notamment dans le cas de foyers multi-métastatiques tels que la CP, du fait de la haute spécificité du ciblage AcM-Ag. La faible pénétration tumorale des AcMs ainsi que les risques d'hématotoxicité associés à la lente clairance des AcMs limitent cependant cette approche[163]. Les techniques de PRIT permettent ainsi de pallier ces inconvénients en conservant l'aspect thérapie ciblée *via* l'utilisation d'AcMs (ou de structures dérivées d'AcM) tout en réduisant la toxicité hématologique grâce à l'administration en seconde ligne des sondes radiomarquées[257]. La PRIT *via* la cycloaddition IEDDA entre les AcMs-TCO et la TZ radiomarquée se distingue des autres approches de par sa modularité, rendant ce système applicable à une multitude de vecteurs et donc de cibles [236]. Cependant, bien que la PRIT *via* la cycloaddition IEDDA ait récemment fait les preuves de son efficacité préclinique, de nombreuses questions demeurent quant-à la stabilité des groupements TCO, l'immunoréactivité des conjugués AcMs-TCO ou bien encore concernant la réactivité des sondes TZ radiomarquées.

I. Impact des modifications des AcMs

Au cours de cette thèse nous avons évalué à la fois les conséquences des modifications d'AcMs sur leur immunoréactivité, leur diffusion en 3D et leur réactivité envers des TZ fluorescentes ainsi que l'influence de la pharmacocinétique des sondes TZ radiomarquées sur leur réactivité vis-àvis des AcMs-TCO. Concernant les conjugués AcMs-TCO, l'ajout d'espaceurs PEGylés n'a pas entraîné de perte significative de reconnaissance antigénique bien qu'une diminution de 30 % ait été observée avec le PEG le plus long (i.e. PEG₁₂) suggérant que des modifications trop importantes pourraient être néfastes pour la stratégie de préciblage. L'effet des modifications d'AcMs-TCO sur

leur diffusion a par ailleurs été évalué dans un modèle cellulaire en 3D et tend à montrer que l'ajout d'un grand nombre de TCO (i.e. ≈ 10 par AcM) n'induit pas d'encombrement stérique susceptible d'empêcher leur pénétration à l'intérieur du sphéroïde. Ces résultats ayant néanmoins été effectués à faible profondeur du fait de limitations techniques nécessitent d'être confortés. L'impossibilité de déterminer sur quelles lysines ont été conjugués les TCO induit un important degré d'incertitude qui rend cette approche aléatoire. En effet, les TCO sont greffés de façon non-sélective aussi bien sur la partie variable que sur la partie constante des AcMs aboutissant à des lots randomisés de conjugués AcMs-TCO, qui diffèrent les uns des autres à la fois sur le nombre de TCO greffés et probablement sur leur localisation au sein de la structure. La détermination du nombre exact ainsi que la position de chacune des modifications apportées semblerait nécessaire pour améliorer l'efficacité de la PRIT. Ainsi, les THIOmAbs ont récemment été décris comme permettant de restreindre les modifications en greffant les TCO sur des résidus cystéines particuliers de façon à ne pas modifier la fraction immunoréactive de l'AcM[248]. Cette stratégie permet ainsi de pouvoir contrôler précisément la stœchiométrie de la réaction de chimie bioorthogonale et donc d'augmenter les chances que les tumeurs aient reçu une quantité suffisante de conjugués AcMs-TCO. De plus, la conjugaison aléatoire des TCO sur les lysines des AcMs représente un frein pour transférer cette stratégie de préciblage vers la clinique et donc l'utilisation de THIOmAbs semble une perspective pertinente pour pallier cet inconvénient majeur.

Les AcMs peuvent également être modifiés *via* une bioconjugaison chemo-enzymatique appelée endoS qui permet de créer deux sites spécifiques de liaison au niveau des glycanes des chaînes lourdes de part et d'autre des AcMs [271]. Deux structures dendrimériques portant 4 TCO à leurs extrémités sont alors greffées sur ces sites spécifiques, permettant ainsi de conjuguer 8 TCO en ne modifiant que deux zones spécifiques de l'AcM. Ce système permet ainsi de conjuguer une grande quantité de résidus TCO tout en induisant des modifications minimales et spécifiques sur les AcMs, limitant ainsi les risques de perte d'immunoréactivité.

II. Internalisation des AcMs et particules Alpha

La PRIT est généralement effectuée avec des AcMs non-internalisant à la fois pour éviter tout risque de dé-chélation du radionucléide lors du passage membranaire et pour permettre une meilleure accessibilité de l'AcMs modifié à la sonde radiomarquée. Pour cette raison nous avons utilisé dans nos études de biodistributions et de thérapie de la CP l'AcM non-internalisant 35A7. Une étude de RIT comparant l'efficacité de cet AcM avec celle d'un anti-Her2/neu internalisant (*i.e.* AcM trastuzumab), tout deux radiomarqués au Plomb-212, a montré un avantage quant-à l'utilisation du trastuzumab-²¹²Pb internalisant[184]. De plus, une récente étude a démontré la faisabilité de

l'imagerie TEP préciblée du CCR avec deux AcMs internalisant radiomarqués au Fluor-18 : le trastuzumab et le cetuximab[272]. Ces travaux montrent ainsi que l'internalisation de l'AcM n'empêche pas la TZ de réagir avec les résidus TCO.

Les émetteurs de particules α ont par ailleurs démontré leur efficacité préclinique dans la PRIT de tumeurs colorectales chez la souris (cellules LS174T, AcM CC49-TCO). Ainsi, l'injection de faibles activités de TZ radiomarquée (*i.e.* de 2,78 à 4,63 MBq) a permis une augmentation significative des médianes de survie par rapport aux groupes contrôles (*i.e.* jusqu'à 20 jours d'écart)[246]. Les particules α sont très énergétiques et induisent d'importantes ionisations sur de très courtes distances, une propriété qui revêt un intérêt certain pour le traitement de la CP car cela permettrait de détruire les métastases sans induire de toxicité hématologique importante. Ainsi, dans un modèle très invasif tel que les cellules A431-CEA-Luc, qui reproduisent la CP, l'utilisation d'émetteurs de particules α associée à des AcMs internalisant semblerait pertinente pour assurer l'efficacité thérapeutique de la PRIT.

III. Relation structure-activité des TZ

La réactivité des TZ est un autre point important qu'il est nécessaire de prendre en compte dans la stratégie de PRIT. En effet, la TZ est une petite molécule, qui possède une biodistribution rapide dans l'organisme. Des études ont montré que le profil pharmacocinétique de ces TZ était directement influencé par leur structure [253][273]. Les sondes TZ hydrophobes sont éliminées préférentiellement par voie hépatique et intestinale tandis que des sondes plus hydrophiles sont éliminées par voie rénale. Dans l'étude de Läppchen [253], qui compare les profils cinétiques d'une quinzaine de structures de TZ, les auteurs ont ainsi montré que les TZ hydrophobes s'avèrent inadaptées au ciblage de tumeurs intestinales, coliques et/ou péritonéales du fait de leur clairance majoritairement hépatique et fécale [253]. En effet, l'utilisation de sondes ayant ce type de profil entraine du signal non-spécifique dans les organes d'élimination, compliquant ainsi l'imagerie.

Nos travaux ont ainsi montré que la TZ-1 était éliminée par voie hépatique et fécale et bien qu'ayant permis de réaliser de l'imagerie SPECT de la carcinose péritonéale, celle-ci s'est néanmoins avérée inefficace en thérapie, ceci pouvant s'expliquer par le profil pharmacocinétique de la sonde. L'évaluation de nouvelles sondes TZ a donc été nécessaire pour trouver une structure plus favorable. Nous avons ainsi synthétisé et radiomarqué des TZ portant un espaceur PEGylé plus long afin d'étudier son influence sur la clairance des sondes radiomarquées (i.e. TZ-3,4). Ces nouvelles sondes TZ ont montré une clairance par voie rénale et aucune activité significative n'a été mesurée au niveau du foie ou des intestins. Ces résultats mettent ainsi en évidence que l'ajout d'un espaceur

PEGylé plus long influence directement la biodistribution du radioligand en induisant préférentiellement une élimination urinaire. L'étude de biodistribution des TZ-1,3,4 effectuée par imagerie SPECT a également montré que la vitesse d'élimination du radioligand était proportionnelle à la longueur de l'espaceur PEGylé, la sonde portant le PEG le plus long (i.e. TZ-4) étant la plus rapidement éliminée de l'abdomen. La longueur de l'espaceur PEGylé a également démontré une influence sur la réactivité TCO/TZ. En effet, la TZ-3 présente une interaction significativement plus élevée envers les TCO que les TZ-1,4 pouvant s'expliquer par sa pharmacocinétique différente de celle de la TZ-1. En revanche, avec le PEG le plus long (i.e. TZ-4) l'interaction TCO/TZ est similaire à celle obtenue avec la TZ-1, ce qui montre qu'une élimination trop rapide du radioligand induit également une perte d'interaction entre la TZ et les TCO.

Des études ont par ailleurs montré que la nature de la TZ influence non seulement sa biodistribution mais également sa réactivité [274][275]. En effet, la réaction IEDDA repose sur l'interaction entre les 4 électrons π de la TZ et les 2 électrons π du TCO. D'après les règles de chimie orbitalaire, la réaction IEDDA s'effectue donc grâce à la différence d'énergie entre la plus haute orbitale moléculaire occupée (Highest Occupied Molecular Orbital, HOMO) du diénophile et la plus basse orbitale moléculaire occupée (Lowest Unoccupied Molecular Orbital, LUMO) du diène. La HOMO_{diénophile} interagit ainsi avec la LUMO_{diène} pour former le réarrangement électronique conduisant in fine au cycle 1,4-dihydropyridazine [236]. En influençant les énergies d'interaction HOMO_{diénohpile} et LUMO_{diène} cela peut modifier la cinétique de réaction et donc altérer l'interaction TCO/TZ. Cependant, l'augmentation de la réactivité de la TZ vis-à-vis du diénophile induit une perte de stabilité in vivo, rendant les structures les pus réactives inadaptées aux applications biologiques [257]. Il est donc nécessaire de trouver le bon compromis entre réactivité et stabilité pour maximiser les interactions TCO/TZ et avoir un préciblage qui soit le plus efficace possible. L'encombrement stérique induit par la nature de la TZ peut donc influencer directement l'interaction TCO/TZ. Afin d'évaluer ce paramètre, nous avons comparé nos trois TZ-bipyridines (i.e. TZ-1,3,4) à la TZ-phényle du Pr Zeglis (i.e. TZ-2)[245] dans des études de biodistributions sur le modèle de CP. La réactivité de la TZ-2 avait été évaluée in vitro, par SPR, et comparée à d'autres TZ, dont la TZ-4 qui est la structure classiquement décrite par Rossin et ses collaborateurs [269]. Il en ressort que la TZ-2 était la plus réactive. Dans notre étude, la TZ-2 a montré une interaction avec les TCO significativement plus élevée que les TZ-1,4 à 24 h et 144 h post injection sans différence vis-à-vis de la TZ-3, suggérant ainsi que les sondes TZ-2,3 ont une réactivité comparable dans le modèle de CP.

IV. Choix du chélatant et des radionucléides

La nature du chélatant relié aux sondes TZ ainsi que le choix du radionucléide sont également des éléments qui peuvent influencer l'efficacité de la PRIT [254]. Une multitude de cages chélatantes (*i.e.* DOTA, NOTA, NODAGA, ...) peuvent ainsi être utilisées dans les radiopharmaceutiques. Ce qui les distinguent les unes des autres est à la fois leur taille et le nombre de ligands, les métaux ayant des rayons atomiques et des coordinences différents. L'impact de ces différentes cages sur les propriétés biologiques (biodistributions, stabilité *in vivo* et pharmacocinétique) est cependant significatif [276]. Dans nos études de biodistributions nous avons utilisé un DOTA avec une coordinence hexavalente du Lutécium-177. Les résultats impressionnants de PRIT sont obtenus par l'équipe de Zeglis avec la TZ-2 reliée à un macrocycle DOTA permettant une coordinence octavalente du Lutécium-177 [245]. Les coordinences supplémentaires permettent une meilleure stabilité du radiométal, limitant les risques de dé-chélation. Cependant, nous n'avons pas observé de différence significative de biodistributions au niveau des os ni du cartilage (ces sites étant connus pour fixer le lutécium libre) entre les TZ-2,3, ce qui suppose que celles-ci ont une stabilité similaire.

V. Chirurgie guidée par l'imagerie en fluorescence

L'imagerie des micro-tumeurs via l'utilisation de sondes fluorescentes est particulièrement intéressante dans le cas de la CP car elle peut être effectuée en per-opératoire afin de guider en temps réel l'œil du chirurgien, ce qui permet une résection plus complète des nodules tumoraux microscopiques [64]. Ainsi, de nombreux traceurs fluorescents ont été développés ces dernières années pour des applications en chirurgie guidée par fluorescence. Des appareils spécialisés sont utilisés pour détecter des sondes émettant dans le proche infra-rouge, des longueurs d'ondes adaptées pour l'imagerie dans les tissus mous profonds [277]. Le préciblage par chimie bioorthogonale semblerait ainsi indiqué dans ce type d'approches en permettant notamment l'administration des conjugués AcMs-TCO plusieurs jours avant l'opération, laissant le temps aux AcMs circulants d'être éliminés, ce qui améliorerait le contraste d'imagerie.

Des sondes TZ dites « intelligentes » ont récemment été développées. Ces structures contiennent des fluorophores qui s'activent, via le phénomène de Förster Resonance Energy Transfert (FRET) lorsque la TZ réagit avec les conjugués AcM-TCO [221]. Les fluorophores des sondes TZ circulantes étant inactifs, cette approche permettrait d'obtenir des imageries avec un fort contraste. L'étude in vivo de ces sondes n'a en revanche pas encore été réalisée mais démontre l'intérêt des approches d'imageries par fluorescence dans la détection précoce des lésions cancéreuses.

VI. Agents de clairance et protocoles fractionnés

Des agents de clairance, des sondes TZ couplées à de l'albumine, peuvent utilisées, en particulier pour les applications d'imagerie préciblée, permettant ainsi d'induire la clairance hépatique des AcMs-TCO circulants afin d'améliorer le contraste d'imagerie et permettre l'obtention de meilleurs ratios tumeur/sang [269]. Une étude réalisée par imagerie TEP, avec du Cuivre-64 a récemment démontrée que lors de la PRIT, tous les sites antigéniques ne sont pas occupés par les AcMs-TCO injectés et qu'il est donc possible d'administrer, plusieurs jours après, une seconde salve d'AcMs-TCO suivie 24 h après par les TZ radiomarquées. Ces protocoles, dits fractionnés, représentent une perspective intéressante dans la PRIT de la CP du fait qu'ils permettent d'administrer de fortes doses de radioactivité en plusieurs fois, avec l'obtention de toxicités limitées.

VII. Conclusion

Les applications de la chimie bioorthogonale sont nombreuses. Son utilisation est prédominante en cancérologie mais peut néanmoins être étendue dans d'autres domaines tels que le ciblage des glycoprotéines du virus de l'immunodéficience humaine [218], l'imagerie des processus de lignification des plantes [278], l'imagerie des thromboses artérielles [279] ou bien encore pour l'hypercalcémie et l'ostéoarthrite [280]. Malgré des résultats précliniques encourageants dans la PRIT des tumeurs solides, cette stratégie thérapeutique nécessite encore d'être optimisée avant de pouvoir envisager un transfert en clinique. En effet, la stabilité des composants, notamment l'isomérisation des TCO en CCO, ainsi que la réactivité des TZ, qui sont de plus assez difficiles à synthétiser, sont deux problèmes majeurs qui entravent son exploitation à plus grande échelle. Ainsi, son application la plus prometteuse pour la CP réside actuellement dans les possibilités d'imagerie, aussi bien en fluorescence qu'en scintigraphie. En effet, ce système démontre la possibilité de cibler spécifiquement les tumeurs disséminées, avec un très bon contraste d'imagerie. Cette approche représente donc un intérêt, à la fois pour un diagnostic précoce des lésions cancéreuses et également pour la chirurgie car elle permettrait la résection de nodules microscopiques difficilement visibles à l'œil nu. Des avancées récentes, telles que les THIOmabs ou la click-to-release ainsi que l'utilisation de protocoles fractionnés, d'agents de clairance ou de radionucléides plus ionisants (i.e. particules α), démontrent les multiples possibilités d'amélioration pour la PRIT des cancers.

Bibliographie:

- 1. Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A.: Cancer statistics, 2016: Cancer Statistics, 2016. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 66, 7–30 (2016). doi:10.3322/caac.21332
- 2. Kuipers, E.J., Grady, W.M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J.J., Boelens, P.G., van de Velde, C.J.H., Watanabe, T.: Colorectal cancer. Nature Reviews Disease Primers. 15065 (2015). doi:10.1038/nrdp.2015.65
- 3. Etzioni, R., Urban, N., Ramsey, S., McIntosh, M., Schwartz, S., Reid, B., Radich, J., Anderson, G., Hartwell, L.: Early detection: The case for early detection. Nature Reviews Cancer. 3, 243–252 (2003). doi:10.1038/nrc1041
- 4. Glynne-Jones, R., Wyrwicz, L., Tiret, E., Brown, G., Rödel, C., Cervantes, A., Arnold, D., on behalf of the ESMO Guidelines Committee: Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. Annals of Oncology. 28, iv22–iv40 (2017). doi:10.1093/annonc/mdx224
- 5. Fedirko, V., Tramacere, I., Bagnardi, V., Rota, M., Scotti, L., Islami, F., Negri, E., Straif, K., Romieu, I., La Vecchia, C., Boffetta, P., Jenab, M.: Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. Annals of Oncology. 22, 1958–1972 (2011). doi:10.1093/annonc/mdq653
- 6. Song, M., Garrett, W.S., Chan, A.T.: Nutrients, Foods, and Colorectal Cancer Prevention. Gastroenterology. 148, 1244-1260.e16 (2015). doi:10.1053/j.gastro.2014.12.035
- 7. Arem, H., Moore, S.C., Park, Y., Ballard-Barbash, R., Hollenbeck, A., Leitzmann, M., Matthews, C.E.: Physical activity and cancer-specific mortality in the NIH-AARP Diet and Health Study cohort: Physical activity and cancer mortality. International Journal of Cancer. 135, 423–431 (2014). doi:10.1002/ijc.28659
- 8. Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Smits, A.M.M., Bos, J.L.: Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. New England Journal of Medicine. 319, 525–532 (1988). doi:10.1056/NEJM198809013190901
- 9. Fearon, E.R., Vogelstein, B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell. 61, 759–767 (1990)
- 10. Bhalla, A., Zulfiqar, M., Bluth, M.H.: Molecular Diagnostics in Colorectal Carcinoma. Clinics in Laboratory Medicine. 38, 311–342 (2018). doi:10.1016/j.cll.2018.02.008
- 11. Perez-Cabornero, L., Sanz, M.I., Sampedro, E.V., Aras, E.L., Becares, A.A., Pino, C.M., Dominguez, M.D.: Frequency of Rearrangements in Lynch Syndrome Cases Associated with MSH2: Characterization of a New Deletion Involving both EPCAM and the 5' Part of MSH2. Cancer Prevention Research. 4, 1556–1562 (2011). doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0080
- 12. Lech, G.: Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. World Journal of Gastroenterology. 22, 1745 (2016). doi:10.3748/wjg.v22.i5.1745
- 13. Fearon, E.R.: Genetic alterations underlying colorectal tumorigenesis. Cancer Surv. 12, 119–136 (1992)
- 14. Bae, J.M., Kim, M.J., Kim, J.H., Koh, J.M., Cho, N.-Y., Kim, T.-Y., Kang, G.H.: Differential clinicopathological features in microsatellite instability-positive colorectal cancers depending on CIMP status. Virchows Archiv. 459, 55–63 (2011). doi:10.1007/s00428-011-1080-3
- 15. Valori, R., Rey, J.-F., Atkin, W., Bretthauer, M., Senore, C., Hoff, G., Kuipers, E., Altenhofen, L., Lambert, R., Minoli, G.: European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First Edition Quality assurance in endoscopy in colorectal cancer screening and diagnosis. Endoscopy. 44, SE88–SE105 (2012). doi:10.1055/s-0032-1309795
- 16. Smith, R.A., Manassaram-Baptiste, D., Brooks, D., Doroshenk, M., Fedewa, S., Saslow, D., Brawley, O.W., Wender, R.: Cancer screening in the United States, 2015: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening: Cancer Screening in the United States, 2015. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 65, 30–54 (2015). doi:10.3322/caac.21261

- 17. Kitajima, K., Nakajo, M., Kaida, H., Minamimoto, R., Hirata, K., Tsurusaki, M., Doi, H., Ueno, Y., Sofue, K., Tamaki, Y., Yamakado, K.: Present and future roles of FDG-PET/CT imaging in the management of gastrointestinal cancer: an update. Nagoya J Med Sci. 79, 527–543 (2017). doi:10.18999/nagjms.79.4.527
- 18. Greenwald, B.: A Review of the American Cancer Society's 2015 Colorectal Cancer Screening Recommendations: Gastroenterology Nursing. 38, 230–234 (2015). doi:10.1097/SGA.00000000000117
- 19. Smith, R.A., Andrews, K.S., Brooks, D., Fedewa, S.A., Manassaram-Baptiste, D., Saslow, D., Brawley, O.W., Wender, R.C.: Cancer screening in the United States, 2018: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening: Cancer Screening in the US, 2018. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 68, 297–316 (2018). doi:10.3322/caac.21446
- 20. Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., Rodriguez Yoldi, M.: Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. International Journal of Molecular Sciences. 18, 197 (2017). doi:10.3390/ijms18010197
- 21. van de Velde, C.J.H., Boelens, P.G., Tanis, P.J., Espin, E., Mroczkowski, P., Naredi, P., Pahlman, L., Ortiz, H., Rutten, H.J., Breugom, A.J., Smith, J.J., Wibe, A., Wiggers, T., Valentini, V.: Experts reviews of the multidisciplinary consensus conference colon and rectal cancer 2012. European Journal of Surgical Oncology (EJSO). 40, 454–468 (2014). doi:10.1016/j.ejso.2013.10.013
- 22. Veldkamp, R.: Laparoscopic surgery versus open surgery for colon cancer: short-term outcomes of a randomised trial. The Lancet Oncology. 6, 477–484 (2005). doi:10.1016/S1470-2045(05)70221-7
- 23. van Gijn, W., Marijnen, C.A., Nagtegaal, I.D., Kranenbarg, E.M.-K., Putter, H., Wiggers, T., Rutten, H.J., Påhlman, L., Glimelius, B., van de Velde, C.J.: Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. The Lancet Oncology. 12, 575–582 (2011). doi:10.1016/S1470-2045(11)70097-3
- 24. NIH consensus conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. JAMA. 264, 1444–1450 (1990)
- 25. Bosset, J.-F., Collette, L., Calais, G., Mineur, L., Maingon, P., Radosevic-Jelic, L., Daban, A., Bardet, E., Beny, A., Ollier, J.-C.: Chemotherapy with Preoperative Radiotherapy in Rectal Cancer. New England Journal of Medicine. 355, 1114–1123 (2006). doi:10.1056/NEJMoa060829
- 26. Velenik, V., Ocvirk, J., Music, M., Bracko, M., Anderluh, F., Oblak, I., Edhemovic, I., Brecelj, E., Kropivnik, M., Omejc, M.: Neoadjuvant capecitabine, radiotherapy, and bevacizumab (CRAB) in locally advanced rectal cancer: results of an open-label phase II study. Radiation Oncology. 6, 105 (2011). doi:10.1186/1748-717X-6-105
- 27. Liu, T., Duo, L., Duan, P.: Ginsenoside Rg3 Sensitizes Colorectal Cancer to Radiotherapy through Downregulation of Proliferative and Angiogenic Biomarkers. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2018, 1–8 (2018). doi:10.1155/2018/1580427
- 28. Papillon, J.: Intracavitary irradiation of early rectal cancer for cure. A series of 186 cases. Cancer. 36, 696–701 (1975)
- 29. Hershman, M.J., Myint, A.S., Makin, C.A.: Multi-modality approach in curative local treatment of early rectal carcinomas. Colorectal Dis. 5, 445–450 (2003)
- 30. Ortholan, C., Romestaing, P., Chapet, O., Gerard, J.P.: Correlation in Rectal Cancer Between Clinical Tumor Response After Neoadjuvant Radiotherapy and Sphincter or Organ Preservation: 10-Year Results of the Lyon R 96-02 Randomized Trial. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics. 83, e165–e171 (2012). doi:10.1016/j.ijrobp.2011.12.002
- 31. Dunstan, M.J.D., Rockall, T.A., Potter, K., Stewart, A.J.: Radiological and clinical findings following rectal contact X-ray brachytherapy (Papillon technique) how to assess response. Journal of Contemporary Brachytherapy. 10, 179–189 (2018). doi:10.5114/jcb.2018.75605

- 32. Gerard, J.-P., Chapet, O., Ramaioli, A., Romestaing, P.: Long-term control of T2-T3 rectal adenocarcinoma with radiotherapy alone. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 54, 142–149 (2002)
- 33. Coatmeur, O., Truc, G., Barillot, I., Horiot, J.-C., Maingon, P.: Treatment of T1–T2 rectal tumors by contact therapy and interstitial brachytherapy. Radiotherapy and Oncology. 70, 177–182 (2004). doi:10.1016/j.radonc.2004.01.016
- 34. Kennedy, A., Nag, S., Salem, R., Murthy, R., McEwan, A.J., Nutting, C., Benson, A., Espat, J., Bilbao, J.I., Sharma, R.A., Thomas, J.P., Coldwell, D.: Recommendations for Radioembolization of Hepatic Malignancies Using Yttrium-90 Microsphere Brachytherapy: A Consensus Panel Report from the Radioembolization Brachytherapy Oncology Consortium. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics. 68, 13–23 (2007). doi:10.1016/j.ijrobp.2006.11.060
- 35. Hendlisz, A., Eynde, M.V. den, Peeters, M., Maleux, G., Lambert, B., Vannoote, J., Keukeleire, K.D., Verslype, C., Defreyne, L., Cutsem, E.V., Delatte, P., Delaunoit, T., Personeni, N., Paesmans, M., Laethem, J.-L.V., Flamen, P.: Phase III Trial Comparing Protracted Intravenous Fluorouracil Infusion Alone or With Yttrium-90 Resin Microspheres Radioembolization for Liver-Limited Metastatic Colorectal Cancer Refractory to Standard Chemotherapy. Journal of Clinical Oncology. 28, 3687–3694 (2010). doi:10.1200/JCO.2010.28.5643
- 36. Goyle, S., Maraveyas, A.: Chemotherapy for Colorectal Cancer. Digestive Surgery. 22, 401–414 (2005). doi:10.1159/000091441
- 37. Lokich, J.J., Ahlgren, J.D., Gullo, J.J., Philips, J.A., Fryer, J.G.: A prospective randomized comparison of continuous infusion fluorouracil with a conventional bolus schedule in metastatic colorectal carcinoma: a Mid-Atlantic Oncology Program Study. Journal of Clinical Oncology. 7, 425–432 (1989). doi:10.1200/JCO.1989.7.4.425
- 38. Simmonds, P.C.: Palliative chemotherapy for advanced colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. Colorectal Cancer Collaborative Group. BMJ. 321, 531–535 (2000)
- 39. Cassidy, J., Twelves, C., Van Cutsem, E., Hoff, P., Bajetta, E., Boyer, M., Bugat, R., Burger, U., Garin, A., Graeven, U., McKendric, J., Maroun, J., Marshall, J., Osterwalder, B., Pérez-Manga, G., Rosso, R., Rougier, P., Schilsky, R.L., Capecitabine Colorectal Cancer Study Group: First-line oral capecitabine therapy in metastatic colorectal cancer: a favorable safety profile compared with intravenous 5-fluorouracil/leucovorin. Ann. Oncol. 13, 566–575 (2002)
- 40. Rawlins, M.D., Culyer, A.J.: National Institute for Clinical Excellence and its value judgments. BMJ. 329, 224–227 (2004). doi:10.1136/bmj.329.7459.224
- 41. Lévi, F., Misset, J.L., Brienza, S., Adam, R., Metzger, G., Itzakhi, M., Caussanel, J.P., Kunstlinger, F., Lecouturier, S., Descorps-Declère, A.: A chronopharmacologic phase II clinical trial with 5-fluorouracil, folinic acid, and oxaliplatin using an ambulatory multichannel programmable pump. High antitumor effectiveness against metastatic colorectal cancer. Cancer. 69, 893–900 (1992)
- 42. Garufi, C., Brienza, S., Pugliese, P., Aschelter, A.M., Bensmaine, M.A., Bertheault-Cvitkovic, F., Nisticò, C., Giunta, S., Caterino, M., Giannarelli, D., Cosimelli, M., Lévi, F., Terzoli, E.: Overcoming resistance to chronomodulated 5-fluorouracil and folinic acid by the addition of chronomodulated oxaliplatin in advanced colorectal cancer patients: Anti-Cancer Drugs. 11, 495–501 (2000). doi:10.1097/00001813-200007000-00011
- 43. Cunningham, D., Pyrhönen, S., James, R.D., Punt, C.J., Hickish, T.F., Heikkila, R., Johannesen, T.B., Starkhammar, H., Topham, C.A., Awad, L., Jacques, C., Herait, P.: Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. The Lancet. 352, 1413–1418 (1998). doi:10.1016/S0140-6736(98)02309-5
- 44. Chau, I., Cunningham, D.: Chemotherapy in colorectal cancer: new options and new challenges. Br. Med. Bull. 64, 159–180 (2002)
- 45. Van Cutsem, E., Cervantes, A., Nordlinger, B., Arnold, D., on behalf of the ESMO Guidelines Working Group: Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis,

- treatment and follow-up. Annals of Oncology. 25, iii1–iii9 (2014). doi:10.1093/annonc/mdu260
- 46. Falcone, A., Ricci, S., Brunetti, I., Pfanner, E., Allegrini, G., Barbara, C., Crinò, L., Benedetti, G., Evangelista, W., Fanchini, L., Cortesi, E., Picone, V., Vitello, S., Chiara, S., Granetto, C., Porcile, G., Fioretto, L., Orlandini, C., Andreuccetti, M., Masi, G.: Phase III Trial of Infusional Fluorouracil, Leucovorin, Oxaliplatin, and Irinotecan (FOLFOXIRI) Compared With Infusional Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan (FOLFIRI) As First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: The Gruppo Oncologico Nord Ovest. Journal of Clinical Oncology. 25, 1670–1676 (2007). doi:10.1200/JCO.2006.09.0928
- 47. Hopirtean, C., Nagy, V.: Optimizing the use of anti VEGF targeted therapies in patients with metastatic colorectal cancer: review of literature. Clujul Medical. 91, 12 (2018). doi:10.15386/cjmed-881
- 48. Presta, L.G., Chen, H., O'Connor, S.J., Chisholm, V., Meng, Y.G., Krummen, L., Winkler, M., Ferrara, N.: Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. Cancer Res. 57, 4593–4599 (1997)
- 49. Kubicka, S., Greil, R., André, T., Bennouna, J., Sastre, J., Van Cutsem, E., von Moos, R., Österlund, P., et al. Bevacizumab plus chemotherapy continued beyond first progression in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with bevacizumab plus chemotherapy: ML18147 study KRAS subgroup findings†. Annals of Oncology. 24, 2342–2349 (2013). doi:10.1093/annonc/mdt231
- 50. Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R., Kabbinavar, F.: Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. New England Journal of Medicine. 350, 2335–2342 (2004). doi:10.1056/NEJMoa032691
- Van Cutsem, E., Tabernero, J., Lakomy, R., Prenen, H., Prausová, J., Macarulla, T., Ruff, P., van Hazel, G.A., Moiseyenko, V., Ferry, D., McKendrick, J., Polikoff, J., Tellier, A., Castan, R., Allegra, C.: Addition of Aflibercept to Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Improves Survival in a Phase III Randomized Trial in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Previously Treated With an Oxaliplatin-Based Regimen. Journal of Clinical Oncology. 30, 3499–3506 (2012). doi:10.1200/JCO.2012.42.8201
- 52. Amado, R.G., Wolf, M., Peeters, M., Van Cutsem, E., Siena, S., Freeman, D.J., Juan, T., Sikorski, R., Suggs, S., Radinsky, R., Patterson, S.D., Chang, D.D.: Wild-Type *KRAS* Is Required for Panitumumab Efficacy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. Journal of Clinical Oncology. 26, 1626–1634 (2008). doi:10.1200/JCO.2007.14.7116
- 53. Douillard, J.-Y., Oliner, K.S., Siena, S., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., Humblet, Y., Bodoky, G., Cunningham, D., Jassem, J., Rivera, F., Kocákova, I., Ruff, P., Błasińska-Morawiec, M., Šmakal, M., Canon, J.L., Rother, M., Williams, R., Rong, A., Wiezorek, J., Sidhu, R., Patterson, S.D.: Panitumumab–FOLFOX4 Treatment and *RAS* Mutations in Colorectal Cancer. New England Journal of Medicine. 369, 1023–1034 (2013). doi:10.1056/NEJMoa1305275
- 54. Guo, Y., Xiong, B.-H., Zhang, T., Cheng, Y., Ma, L.: XELOX vs. FOLFOX in metastatic colorectal cancer: An updated meta-analysis. Cancer Investigation. 34, 94–104 (2016). doi:10.3109/07357907.2015.1104689
- 56. Wei, N., Zhang, B., Wang, Y., He, X.H., Xu, L.C., Li, G.D., Wang, Y.H., Wang, G.Z., Huang, H.Z., Li, W.T.: Transarterial chemoembolization with raltitrexed-based or floxuridine-based chemotherapy for unresectable colorectal cancer liver metastasis. Clinical and Translational Oncology. (2018). doi:10.1007/s12094-018-1942-0

- 57. Li, X.-X., Liang, L., Huang, L.-Y., Cai, S.-J.: Standard chemotherapy with cetuximab for treatment of colorectal cancer. World Journal of Gastroenterology. 21, 7022–7035 (2015). doi:10.3748/wjg.v21.i22.7022
- 58. Arole, V.C., Deshpande, K.A., Jadhav, D.B., Jogi, A.: Primary peritoneal psammocarcinoma: Primary peritoneal psammocarcinoma. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. 43, 1366–1372 (2017). doi:10.1111/jog.13355
- 59. Coccolini, F.: Peritoneal carcinomatosis. World Journal of Gastroenterology. 19, 6979 (2013). doi:10.3748/wjg.v19.i41.6979
- 60. Jin, K., Gao, W., Lu, Y., Lan, H., Teng, L., Cao, F.: Mechanisms regulating colorectal cancer cell metastasis into liver (Review). Oncology Letters. 3, 11–15 (2012). doi:10.3892/ol.2011.432
- 61. Hall, B., Padussis, J., Foster, J.M.: Cytoreduction and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in the Management of Colorectal Peritoneal Metastasis. Surgical Clinics of North America. 97, 671–682 (2017). doi:10.1016/j.suc.2017.01.013
- 62. Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A.: Cancer statistics, 2018: Cancer Statistics, 2018. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 68, 7–30 (2018). doi:10.3322/caac.21442
- 63. Murono, K.: Regimens of Intraperitoneal Chemotherapy for Peritoneal Carcinomatosis from Colorectal Cancer. Anticancer Research. 38, (2018). doi:10.21873/anticanres.12186
- 64. Hentzen, J.E.K.R., de Jongh, S.J., Hemmer, P.H.J., van der Plas, W.Y., van Dam, G.M., Kruijff, S.: Molecular fluorescence-guided surgery of peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: A narrative review. Journal of Surgical Oncology. (2018). doi:10.1002/jso.25106
- 65. Elias, D., Faron, M., Iuga, B.S., Honoré, C., Dumont, F., Bourgain, J.-L., Dartigues, P., Ducreux, M., Goéré, D.: Prognostic Similarities and Differences in Optimally Resected Liver Metastases and Peritoneal Metastases From Colorectal Cancers: Annals of Surgery. 261, 157–163 (2015). doi:10.1097/SLA.00000000000000582
- 66. Sugarbaker, P.H.: Intraperitoneal chemotherapy and cytoreductive surgery for the prevention and treatment of peritoneal carcinomatosis and sarcomatosis. Semin Surg Oncol. 14, 254–261 (1998)
- 67. Faron, M., Macovei, R., Goéré, D., Honoré, C., Benhaim, L., Elias, D.: Linear Relationship of Peritoneal Cancer Index and Survival in Patients with Peritoneal Metastases from Colorectal Cancer. Annals of Surgical Oncology. 23, 114–119 (2016). doi:10.1245/s10434-015-4627-8
- 68. Jacquet, P., Sugarbaker, P.H.: Clinical research methodologies in diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. In: Sugarbaker, P.H. (ed.) Peritoneal Carcinomatosis: Principles of Management. pp. 359–374. Springer US, Boston, MA (1996)
- 69. Pelz, J.O.W., Stojadinovic, A., Nissan, A., Hohenberger, W., Esquivel, J.: Evaluation of a peritoneal surface disease severity score in patients with colon cancer with peritoneal carcinomatosis. Journal of Surgical Oncology. 99, 9–15 (2009). doi:10.1002/jso.21169
- 70. Cashin, P.H., Graf, W., Nygren, P., Mahteme, H.: Comparison of Prognostic Scores for Patients with Colorectal Cancer Peritoneal Metastases Treated with Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy. Annals of Surgical Oncology. 20, 4183–4189 (2013). doi:10.1245/s10434-013-3204-2
- 71. Sugarbaker, P.H., Jablonski, K.A.: Prognostic features of 51 colorectal and 130 appendiceal cancer patients with peritoneal carcinomatosis treated by cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy. Ann. Surg. 221, 124–132 (1995)
- 72. Sugarbaker, P.H., Ryan, D.P.: Cytoreductive surgery plus hyperthermic perioperative chemotherapy to treat peritoneal metastases from colorectal cancer: standard of care or an experimental approach? The Lancet Oncology. 13, e362–e369 (2012). doi:10.1016/S1470-2045(12)70210-3
- 73. Glehen, O., Osinsky, D., Beaujard, A.C., Gilly, F.N.: Natural history of peritoneal carcinomatosis from nongynecologic malignancies. Surg. Oncol. Clin. N. Am. 12, 729–739, xiii (2003)
- 74. Glehen, O., Kwiatkowski, F., Sugarbaker, P.H., Elias, D., Levine, E.A., De Simone, M., Barone, R., Yonemura, Y., Cavaliere, F., Quenet, F., Gutman, M., Tentes, A.A.K., Lorimier, G., Bernard, J.L., Bereder, J.M., Porcheron, J., Gomez-Portilla, A., Shen, P., Deraco, M., Rat, P.: Cytoreductive

- Surgery Combined With Perioperative Intraperitoneal Chemotherapy for the Management of Peritoneal Carcinomatosis From Colorectal Cancer: A Multi-Institutional Study. Journal of Clinical Oncology. 22, 3284–3292 (2004). doi:10.1200/JCO.2004.10.012
- 75. Sugarbaker, P.H.: Peritonectomy procedures. Ann. Surg. 221, 29–42 (1995)
- 76. Verwaal, V.J., van Ruth, S., de Bree, E., van Slooten, G.W., van Tinteren, H., Boot, H., Zoetmulder, F.A.N.: Randomized Trial of Cytoreduction and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy Versus Systemic Chemotherapy and Palliative Surgery in Patients With Peritoneal Carcinomatosis of Colorectal Cancer. Journal of Clinical Oncology. 21, 3737–3743 (2003). doi:10.1200/JCO.2003.04.187
- 77. Verwaal, V.J., Bruin, S., Boot, H., van Slooten, G., van Tinteren, H.: 8-Year Follow-up of Randomized Trial: Cytoreduction and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy Versus Systemic Chemotherapy in Patients with Peritoneal Carcinomatosis of Colorectal Cancer. Annals of Surgical Oncology. 15, 2426–2432 (2008). doi:10.1245/s10434-008-9966-2
- 78. Braam, H.J., van Oudheusden, T.R., de Hingh, I.H.J.T., Nienhuijs, S.W., Boerma, D., Wiezer, M.J., van Ramshorst, B.: Patterns of recurrence following complete cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer: Recurrence Following HIPEC. Journal of Surgical Oncology. 109, 841–847 (2014). doi:10.1002/jso.23597
- 79. Stuart, O.A., Stephens, A.D., Welch, L., Sugarbaker, P.H.: Safety monitoring of the coliseum technique for heated intraoperative intraperitoneal chemotherapy with mitomycin C. Ann. Surg. Oncol. 9, 186–191 (2002)
- 80. Rodríguez Silva, C., Moreno Ruiz, F.J., Bellido Estévez, I., Carrasco Campos, J., Titos García, A., Ruiz López, M., González Poveda, I., Toval Mata, J.A., Mera Velasco, S., Santoyo Santoyo, J.: Are there intra-operative hemodynamic differences between the Coliseum and closed HIPEC techniques in the treatment of peritoneal metastasis? A retrospective cohort study. World Journal of Surgical Oncology. 15, (2017). doi:10.1186/s12957-017-1119-2
- 81. Prada-Villaverde, A., Esquivel, J., Lowy, A.M., Markman, M., Chua, T., Pelz, J., Baratti, D., Baumgartner, J.M., Berri, R., Bretcha-Boix, P., Deraco, M., Flores-Ayala, G., Glehen, O., Gomez-Portilla, A., González-Moreno, S., Goodman, M., Halkia, E., Kusamura, S., Moller, M., Passot, G., Pocard, M., Salti, G., Sardi, A., Senthil, M., Spiliotis, J., Torres-Melero, J., Turaga, K., Trout, R.: The American Society of Peritoneal Surface Malignancies evaluation of HIPEC with Mitomycin C versus Oxaliplatin in 539 patients with colon cancer undergoing a complete cytoreductive surgery: ASPSM comparison of HIPEC with MMC vs. Oxaliplatin. Journal of Surgical Oncology. 110, 779–785 (2014). doi:10.1002/jso.23728
- 82. Arjona-Sánchez, A., Barrios, P., Boldo-Roda, E., Camps, B., Carrasco-Campos, J., Concepción Martín, V., García-Fadrique, A., Gutiérrez-Calvo, A., Morales, R., Ortega-Pérez, G., Pérez-Viejo, E., Prada-Villaverde, A., Torres-Melero, J., Vicente, E., Villarejo-Campos, P., Sánchez-Hidalgo, J.M., Casado-Adam, A., García-Martin, R., Medina, M., Caro, T., Villar, C., Aranda, E., Cano-Osuna, M.T., Díaz-López, C., Torres-Tordera, E., Briceño-Delgado, F.J., Rufián-Peña, S.: HIPECT4: multicentre, randomized clinical trial to evaluate safety and efficacy of Hyperthermic intra-peritoneal chemotherapy (HIPEC) with Mitomycin C used during surgery for treatment of locally advanced colorectal carcinoma. BMC Cancer. 18, (2018). doi:10.1186/s12885-018-4096-0
- 83. Piché, N., Leblond, F.A., Sidéris, L., Pichette, V., Drolet, P., Fortier, L.-P., Mitchell, A., Dubé, P.: Rationale for Heating Oxaliplatin for the Intraperitoneal Treatment of Peritoneal Carcinomatosis: A Study of the Effect of Heat on Intraperitoneal Oxaliplatin Using a Murine Model. Annals of Surgery. 254, 138–144 (2011). doi:10.1097/SLA.0b013e3182193143
- 84. Alberts, D.S., Liu, P.Y., Hannigan, E.V., O'Toole, R., Williams, S.D., Young, J.A., Franklin, E.W., Clarke-Pearson, D.L., Malviya, V.K., DuBeshter, B., Adelson, M.D., Hoskins, W.J.: Intraperitoneal Cisplatin plus Intravenous Cyclophosphamide versus Intravenous Cisplatin plus Intravenous Cyclophosphamide for Stage III Ovarian Cancer. New England Journal of Medicine. 335, 1950–1955 (1996). doi:10.1056/NEJM199612263352603

- 85. Markman, M., Bundy, B.N., Alberts, D.S., Fowler, J.M., Clark-Pearson, D.L., Carson, L.F., Wadler, S., Sickel, J.: Phase III Trial of Standard-Dose Intravenous Cisplatin Plus Paclitaxel Versus Moderately High-Dose Carboplatin Followed by Intravenous Paclitaxel and Intraperitoneal Cisplatin in Small-Volume Stage III Ovarian Carcinoma: An Intergroup Study of the Gynecologic Oncology Group, Southwestern Oncology Group, and Eastern Cooperative Oncology Group. Journal of Clinical Oncology. 19, 1001–1007 (2001). doi:10.1200/JCO.2001.19.4.1001
- 86. Coleman, R.L., Monk, B.J., Sood, A.K., Herzog, T.J.: Latest research and treatment of advanced-stage epithelial ovarian cancer. Nature Reviews Clinical Oncology. 10, 211–224 (2013). doi:10.1038/nrclinonc.2013.5
- 87. Spiliotis, J., Halkia, E., Lianos, E., Kalantzi, N., Grivas, A., Efstathiou, E., Giassas, S.: Cytoreductive Surgery and HIPEC in Recurrent Epithelial Ovarian Cancer: A Prospective Randomized Phase III Study. Annals of Surgical Oncology. 22, 1570–1575 (2015). doi:10.1245/s10434-014-4157-9
- 88. Halkia, E., Kopanakis, N., Nikolaou, G., Spiliotis, J.: Cytoreductive surgery and HIPEC for peritoneal carcinomatosis. A review on morbidity and mortality. J BUON. 20 Suppl 1, S80-87 (2015)
- 89. Solaß, W., Hetzel, A., Nadiradze, G., Sagynaliev, E., Reymond, M.A.: Description of a novel approach for intraperitoneal drug delivery and the related device. Surgical Endoscopy. 26, 1849–1855 (2012). doi:10.1007/s00464-012-2148-0
- 90. Solass, W., Kerb, R., Mürdter, T., Giger-Pabst, U., Strumberg, D., Tempfer, C., Zieren, J., Schwab, M., Reymond, M.A.: Intraperitoneal Chemotherapy of Peritoneal Carcinomatosis Using Pressurized Aerosol as an Alternative to Liquid Solution: First Evidence for Efficacy. Annals of Surgical Oncology. 21, 553–559 (2014). doi:10.1245/s10434-013-3213-1
- 91. Jung, D.H., Son, S.Y., Oo, A.M., Park, Y.S., Shin, D.J., Ahn, S.-H., Park, D.J., Kim, H.-H.: Feasibility of hyperthermic pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy in a porcine model. Surgical Endoscopy. 30, 4258–4264 (2016). doi:10.1007/s00464-015-4738-0
- 92. Almerie, M.Q., Gossedge, G., Wright, K.E., Jayne, D.G.: Treatment of peritoneal carcinomatosis with photodynamic therapy: Systematic review of current evidence. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 20, 276–286 (2017). doi:10.1016/j.pdpdt.2017.10.021
- 93. Tochner, Z., Mitchell, J.B., Smith, P., Harrington, F., Glatstein, E., Russo, D., Russo, A.: Photodynamic therapy of ascites tumours within the peritoneal cavity. Br. J. Cancer. 53, 733–736 (1986)
- 94. Cengel, K.A., Glatstein, E., Hahn, S.M.: Intraperitoneal photodynamic therapy. Cancer Treat. Res. 134, 493–514 (2007)
- 95. Therasse, P., Arbuck, S.G., Eisenhauer, E.A., Wanders, J., Kaplan, R.S., Rubinstein, L., Verweij, J., Van Glabbeke, M., van Oosterom, A.T., Christian, M.C., Gwyther, S.G.: New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. J. Natl. Cancer Inst. 92, 205–216 (2000)
- 96. Eisenhauer, E.A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L.H., Sargent, D., Ford, R., Dancey, J., Arbuck, S., Gwyther, S., Mooney, M., Rubinstein, L., Shankar, L., Dodd, L., Kaplan, R., Lacombe, D., Verweij, J.: New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). European Journal of Cancer. 45, 228–247 (2009). doi:10.1016/j.ejca.2008.10.026
- 97. Wahl, R.L., Jacene, H., Kasamon, Y., Lodge, M.A.: From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET Response Criteria in Solid Tumors. Journal of Nuclear Medicine. 50, 122S-150S (2009). doi:10.2967/jnumed.108.057307
- 98. Hyun, J.O., Lodge, M.A., Wahl, R.L.: Practical PERCIST: A Simplified Guide to PET Response Criteria in Solid Tumors 1.0. Radiology. 280, 576–584 (2016). doi:10.1148/radiol.2016142043
- 99. Tsai, W.-T.K., Wu, A.M.: Aligning physics and physiology: Engineering antibodies for radionuclide delivery. Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals. 61, 693–714 (2018). doi:10.1002/jlcr.3622

- Forero, I., Okada, H., Topalian, S.L., Gajewski, T.F., Korman, A.J., Melero, I.: Workshop on immunotherapy combinations. Society for immunotherapy of cancer annual meeting Bethesda, November 3, 2011. Journal of Translational Medicine. 10, 108 (2012). doi:10.1186/1479-5876-10-108
- 101. Köhler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 256, 495–497 (1975)
- 102. Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H., Winter, G.: Reshaping human antibodies for therapy. Nature. 332, 323–327 (1988). doi:10.1038/332323a0
- 103. Kaplon, H., Reichert, J.M.: Antibodies to watch in 2018. mAbs. 10, 183–203 (2018). doi:10.1080/19420862.2018.1415671
- 104. Kavousipour, S., Khademi, F., Zamani, M., Vakili, B., Mokarram, P.: Novel biotechnology approaches in colorectal cancer diagnosis and therapy. Biotechnology Letters. (2017). doi:10.1007/s10529-017-2303-8
- 105. Warnders, F.-J., Lub-de Hooge, M.N., de Vries, E.G.E., Kosterink, J.G.W.: Influence of protein properties and protein modification on biodistribution and tumor uptake of anticancer antibodies, antibody derivatives, and non-lg scaffolds. Medicinal Research Reviews. (2018). doi:10.1002/med.21498
- 106. Greish, K., Nehoff, H., Parayath, N., Domanovitch, L., Taurin, S.: Nanomedicine for drug targeting: strategies beyond the enhanced permeability and retention effect. International Journal of Nanomedicine. 2539 (2014). doi:10.2147/IJN.S47129
- 107. Schellenberger, V., Wang, C., Geething, N.C., Spink, B.J., Campbell, A., To, W., Scholle, M.D., Yin, Y., Yao, Y., Bogin, O., Cleland, J.L., Silverman, J., Stemmer, W.P.C.: A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner. Nature Biotechnology. 27, 1186–1190 (2009). doi:10.1038/nbt.1588
- 108. Schlapschy, M., Binder, U., Borger, C., Theobald, I., Wachinger, K., Kisling, S., Haller, D., Skerra, A.: PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. Protein Engineering Design and Selection. 26, 489–501 (2013). doi:10.1093/protein/gzt023
- 109. Carreau, N.A., Pavlick, A.C.: Nivolumab and ipilimumab: immunotherapy for treatment of malignant melanoma. Future Oncology. (2018). doi:10.2217/fon-2018-0607
- 110. Hu, B., Jacobs, R., Ghosh, N.: Checkpoint Inhibitors Hodgkin Lymphoma and Non-Hodgkin Lymphoma. Current Hematologic Malignancy Reports. (2018). doi:10.1007/s11899-018-0484-4
- 111. Kowanetz, M., Zou, W., Gettinger, S.N., Koeppen, H., Kockx, M., Schmid, P., Kadel, E.E., Wistuba, I., Chaft, J., Rizvi, N.A., Spigel, D.R., Spira, A., Hirsch, F.R., Cohen, V., Smith, D., Boyd, Z., Miley, N., Flynn, S., Leveque, V., Shames, D.S., Ballinger, M., Mocci, S., Shankar, G., Funke, R., Hampton, G., Sandler, A., Amler, L., Mellman, I., Chen, D.S., Hegde, P.S.: Differential regulation of PD-L1 expression by immune and tumor cells in NSCLC and the response to treatment with atezolizumab (anti–PD-L1). Proceedings of the National Academy of Sciences. 201802166 (2018). doi:10.1073/pnas.1802166115
- 112. Pathak, S., S, S., Banerjee, A., Marotta, F., Gopinath, M., Murugesan, R., Zhang, H., B, B., Girigoswami, A., Sollano, J., Sun, X.-F.: Review on comparative efficacy of bevacizumab, panitumumab and cetuximab antibody therapy with combination of FOLFOX-4 in *KRAS*-mutated colorectal cancer patients. Oncotarget. 9, (2018). doi:10.18632/oncotarget.22471
- 113. Milenic, D.E., Kim, Y.-S., Baidoo, K.E., Wong, K.J., Barkley, R., Delgado, J., Brechbiel, M.W.: Exploration of a F(ab') $_2$ Fragment as the Targeting Agent of α -Radiation Therapy: A Comparison of the Therapeutic Benefit of Intraperitoneal and Intravenous Administered Radioimmunotherapy. Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals. 33, 182–193 (2018). doi:10.1089/cbr.2018.2434
- 114. Olafsen, T., Tan, G.J., Cheung, C. -w., Yazaki, P.J., Park, J.M., Shively, J.E., Williams, L.E., Raubitschek, A.A., Press, M.F., Wu, A.M.: Characterization of engineered anti-p185HER-2

- (scFv-CH3)2 antibody fragments (minibodies) for tumor targeting. Protein Engineering Design and Selection. 17, 315–323 (2004). doi:10.1093/protein/gzh040
- 115. Press, M.F., Slamon, D.J., Flom, K.J., Park, J., Zhou, J.-Y., Bernstein, L.: Evaluation of HER-2/ neu Gene Amplification and Overexpression: Comparison of Frequently Used Assay Methods in a Molecularly Characterized Cohort of Breast Cancer Specimens. Journal of Clinical Oncology. 20, 3095–3105 (2002). doi:10.1200/JCO.2002.09.094
- 116. Cheng, K.T.: 99mTc-Arcitumomab. In: Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD). National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD) (2004)
- 117. Ton, N.C., Parker, G.J.M., Jackson, A., Mullamitha, S., Buonaccorsi, G.A., Roberts, C., Watson, Y., Davies, K., Cheung, S., Hope, L., Power, F., Lawrance, J., Valle, J., Saunders, M., Felix, R., Soranson, J.A., Rolfe, L., Zinkewich-Peotti, K., Jayson, G.C.: Phase I Evaluation of CDP791, a PEGylated Di-Fab' Conjugate that Binds Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2. Clinical Cancer Research. 13, 7113–7118 (2007). doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1550
- 118. Repp, R., van Ojik, H.H., Valerius, T., Groenewegen, G., Wieland, G., Oetzel, C., Stockmeyer, B., Becker, W., Eisenhut, M., Steininger, H., Deo, Y.M., Blijham, G.H., Kalden, J.R., van de Winkel, J.G.J., Gramatzki, M.: Phase I clinical trial of the bispecific antibody MDX-H210 (anti-FcγRI × anti-HER-2/neu) in combination with Filgrastim (G-CSF) for treatment of advanced breast cancer. British Journal of Cancer. 89, 2234–2243 (2003). doi:10.1038/sj.bjc.6601367
- 119. Leung, K.: Radioiodinated T84.66 minibody. In: Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD). National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD) (2004)
- 120. Wong, J.Y.C.: Pilot Trial Evaluating an 123I-Labeled 80-Kilodalton Engineered Anticarcinoembryonic Antigen Antibody Fragment (cT84.66 Minibody) in Patients with Colorectal Cancer. Clinical Cancer Research. 10, 5014–5021 (2004). doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0576
- 121. Adams, G.P., Shaller, C.C., Dadachova, E., Simmons, H.H., Horak, E.M., Tesfaye, A., Klein-Szanto, A.J.P., Marks, J.D., Brechbiel, M.W., Weiner, L.M.: A Single Treatment of Yttrium-90-labeled CHX-A"—C6.5 Diabody Inhibits the Growth of Established Human Tumor Xenografts in Immunodeficient Mice. Cancer Research. 64, 6200—6206 (2004). doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2382
- 122. McDonagh, C.F., Beam, K.S., Wu, G.J.S., Chen, J.H., Chace, D.F., Senter, P.D., Francisco, J.A.: Improved Yield and Stability of L49-sFv–β-Lactamase, a Single-Chain Antibody Fusion Protein for Anticancer Prodrug Activation, by Protein Engineering. Bioconjugate Chemistry. 14, 860–869 (2003). doi:10.1021/bc0340316
- 123. Shen, S., Forero, A., LoBuglio, A.F., Breitz, H., Khazaeli, M.B., Fisher, D.R., Wang, W., Meredith, R.F.: Patient-specific dosimetry of pretargeted radioimmunotherapy using CC49 fusion protein in patients with gastrointestinal malignancies. J. Nucl. Med. 46, 642–651 (2005)
- 124. Nellis, D.F., Giardina, S.L., Janini, G.M., Shenoy, S.R., Marks, J.D., Tsai, R., Drummond, D.C., Hong, K., Park, J.W., Ouellette, T.F., Perkins, S.C., Kirpotin, D.B.: Preclinical Manufacture of Anti-HER2 Liposome-Inserting, scFv-PEG-Lipid Conjugate. 2. Conjugate Micelle Identity, Purity, Stability, and Potency Analysis. Biotechnology Progress. 21, 221–232 (2008). doi:10.1021/bp049839z
- 125. Cortez-Retamozo, V., Backmann, N., Senter, P.D., Wernery, U., De Baetselier, P., Muyldermans, S., Revets, H.: Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. Cancer Res. 64, 2853–2857 (2004)
- 126. Honarvar, H., Westerlund, K., Altai, M., Sandström, M., Orlova, A., Tolmachev, V., Karlström, A.E.: Feasibility of Affibody Molecule-Based PNA-Mediated Radionuclide Pretargeting of Malignant Tumors. Theranostics. 6, 93–103 (2016). doi:10.7150/thno.12766
- 127. Holliger, P., Hudson, P.J.: Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nature Biotechnology. 23, 1126–1136 (2005). doi:10.1038/nbt1142
- 128. Perez, H.L., Cardarelli, P.M., Deshpande, S., Gangwar, S., Schroeder, G.M., Vite, G.D., Borzilleri, R.M.: Antibody—drug conjugates: current status and future directions. Drug Discovery Today. 19, 869–881 (2014). doi:10.1016/j.drudis.2013.11.004

- 129. Lambert, J.M., Berkenblit, A.: Antibody–Drug Conjugates for Cancer Treatment. Annual Review of Medicine. 69, 191–207 (2018). doi:10.1146/annurev-med-061516-121357
- 130. Pietersz, G., Krauer, K.: Antibody-Targeted Drugs for the Therapy of Cancer. Journal of Drug Targeting. 2, 183–215 (1994). doi:10.3109/10611869408996804
- 131. Martin, C., Kizlik-Masson, C., Pèlegrin, A., Watier, H., Viaud-Massuard, M.-C., Joubert, N.: Antibody-drug conjugates: Design and development for therapy and imaging in and beyond cancer, LabEx MAbImprove industrial workshop, July 27–28, 2017, Tours, France. mAbs. 10, 210–221 (2018). doi:10.1080/19420862.2017.1412130
- 132. Hills, R.K., Castaigne, S., Appelbaum, F.R., Delaunay, J., Petersdorf, S., Othus, M., Estey, E.H., Dombret, H., Chevret, S., Ifrah, N., Cahn, J.-Y., Récher, C., Chilton, L., Moorman, A.V., Burnett, A.K.: Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. The Lancet Oncology. 15, 986–996 (2014). doi:10.1016/S1470-2045(14)70281-5
- 133. Kantarjian, H.M., DeAngelo, D.J., Stelljes, M., Martinelli, G., Liedtke, M., Stock, W., Gökbuget, N., O'Brien, S., Wang, K., Wang, T., Paccagnella, M.L., Sleight, B., Vandendries, E., Advani, A.S.: Inotuzumab Ozogamicin versus Standard Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. New England Journal of Medicine. 375, 740–753 (2016). doi:10.1056/NEJMoa1509277
- 134. Lambert, J.M., Chari, R.V.J.: Ado-trastuzumab Emtansine (T-DM1): An Antibody–Drug Conjugate (ADC) for HER2-Positive Breast Cancer. Journal of Medicinal Chemistry. 57, 6949–6964 (2014). doi:10.1021/jm500766w
- 135. Senter, P.D., Sievers, E.L.: The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. Nature Biotechnology. 30, 631–637 (2012). doi:10.1038/nbt.2289
- 136. Huwyler, J., Cerletti, A., Fricker, G., Eberle, A.N., Drewe, J.: By-passing of P-glycoprotein Using Immunoliposomes. Journal of Drug Targeting. 10, 73–79 (2002). doi:10.1080/10611860290007559
- 137. Maruyama, K.: [PEG-liposome in DDS and clinical studies]. Nippon Rinsho. 56, 632–637 (1998)
- 138. Maclean, A., Symonds, G., Ward, R.: Immunoliposomes as targeted delivery vehicles for cancer therapeutics (Review). International Journal of Oncology. (1997). doi:10.3892/ijo.11.2.325
- 139. Kreitman, R.J.: Immunotoxins for targeted cancer therapy. The AAPS Journal. 8, E532–E551 (2006). doi:10.1208/aapsj080363
- 140. Bagshawe, K.D.: Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) for cancer. Expert Review of Anticancer Therapy. 6, 1421–1431 (2006). doi:10.1586/14737140.6.10.1421
- 141. Dahlén, E., Veitonmäki, N., Norlén, P.: Bispecific antibodies in cancer immunotherapy. Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy. 6, 3–17 (2018). doi:10.1177/2515135518763280
- 142. Hoffman, L.M., Gore, L.: Blinatumomab, a Bi-Specific Anti-CD19/CD3 BiTE® Antibody for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia: Perspectives and Current Pediatric Applications. Frontiers in Oncology. 4, (2014). doi:10.3389/fonc.2014.00063
- 143. Heiss, M.M., Murawa, P., Koralewski, P., Kutarska, E., Kolesnik, O.O., Ivanchenko, V.V., Dudnichenko, A.S., Aleknaviciene, B., Razbadauskas, A., Gore, M., Ganea-Motan, E., Ciuleanu, T., Wimberger, P., Schmittel, A., Schmalfeldt, B., Burges, A., Bokemeyer, C., Lindhofer, H., Lahr, A., Parsons, S.L.: The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial. International Journal of Cancer. 127, 2209–2221 (2010). doi:10.1002/ijc.25423
- 144. Shen, J., Zhu, Z.: Catumaxomab, a rat/murine hybrid trifunctional bispecific monoclonal antibody for the treatment of cancer. Curr. Opin. Mol. Ther. 10, 273–284 (2008)
- 145. Kiewe, P.: Phase I Trial of the Trifunctional Anti-HER2 x Anti-CD3 Antibody Ertumaxomab in Metastatic Breast Cancer. Clinical Cancer Research. 12, 3085–3091 (2006). doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2436

- 146. Kiewe, P., Thiel, E.: Ertumaxomab: a trifunctional antibody for breast cancer treatment. Expert Opinion on Investigational Drugs. 17, 1553–1558 (2008). doi:10.1517/13543784.17.10.1553
- 147. Fury, M.G., Lipton, A., Smith, K.M., Winston, C.B., Pfister, D.G.: A phase-I trial of the epidermal growth factor receptor directed bispecific antibody MDX-447 without and with recombinant human granulocyte-colony stimulating factor in patients with advanced solid tumors. Cancer Immunology, Immunotherapy. 57, 155–163 (2007). doi:10.1007/s00262-007-0357-5
- 148. Hidalgo, M., Martinez-Garcia, M., Le Tourneau, C., Massard, C., Garralda, E., Boni, V., Taus, A., Albanell, J., Sablin, M.-P., Alt, M., Bahleda, R., Varga, A., Boetsch, C., Franjkovic, I., Heil, F., Lahr, A., Lechner, K., Morel, A., Nayak, T., Rossomanno, S., Smart, K., Stubenrauch, K., Krieter, O.: First-in-Human Phase I Study of Single-agent Vanucizumab, A First-in-Class Bispecific Anti-Angiopoietin-2/Anti-VEGF-A Antibody, in Adult Patients with Advanced Solid Tumors. Clinical Cancer Research. 24, 1536–1545 (2018). doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-1588
- 149. Boersma, Y.L., Chao, G., Steiner, D., Wittrup, K.D., Plückthun, A.: Bispecific Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPins) Targeting Epidermal Growth Factor Receptor Inhibit A431 Cell Proliferation and Receptor Recycling. Journal of Biological Chemistry. 286, 41273–41285 (2011). doi:10.1074/jbc.M111.293266
- 150. Kipriyanov, S.M., Moldenhauer, G., Schuhmacher, J., Cochlovius, B., Von der Lieth, C.-W., Matys, E.R., Little, M.: Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics. Journal of Molecular Biology. 293, 41–56 (1999). doi:10.1006/jmbi.1999.3156
- 151. Lutje, S., Rijpkema, M., Goldenberg, D.M., van Rij, C.M., Sharkey, R.M., McBride, W.J., Franssen, G.M., Frielink, C., Helfrich, W., Oyen, W.J.G., Boerman, O.C.: Pretargeted Dual-Modality Immuno-SPECT and Near-Infrared Fluorescence Imaging for Image-Guided Surgery of Prostate Cancer. Cancer Research. 74, 6216–6223 (2014). doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0594
- 152. Heskamp, S., Hernandez, R., Molkenboer-Kuenen, J.D.M., Essler, M., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., Steenbergen, E., Cai, W., Seidl, C., McBride, W., Goldenberg, D., Boerman, O.: Alpha- versus beta-emitting radionuclides for pretargeted radioimmunotherapy of CEA-expressing human colon cancer xenografts. Journal of Nuclear Medicine. jnumed.116.187021 (2017). doi:10.2967/jnumed.116.187021
- 153. Fanny, F., Sébastien, G., Catherine, M., Michel, C., Alain, F.-C., Goldenberg, D.M., Jacques, B., Clément, B., Caroline, B.-M., Thomas, C., Françoise, K.-B., Yann, T., Eric, F.: Sensitivity of pretargeted immunoPET using ⁶⁸Ga-peptide to detect colonic carcinoma liver metastases in a murine xenograft model: Comparison with ¹⁸FDG PET-CT. Oncotarget. 9, (2018). doi:10.18632/oncotarget.25514
- 154. Hollander, N.: Bispecific antibodies for cancer therapy. Immunotherapy. 1, 211–222 (2009). doi:10.2217/1750743X.1.2.211
- 155. Godar, M., de Haard, H., Blanchetot, C., Rasser, J.: Therapeutic bispecific antibody formats: a patent applications review (1994-2017). Expert Opinion on Therapeutic Patents. 28, 251–276 (2018). doi:10.1080/13543776.2018.1428307
- 156. Chatal, J.-F., Hoefnagel, C.A.: Radionuclide therapy. The Lancet. 354, 931–935 (1999). doi:10.1016/S0140-6736(99)06002-X
- 157. Welch, M.J., Redvanly, C.S. eds: Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK (2002)
- 158. Kassis, A.I.: Therapeutic Radionuclides: Biophysical and Radiobiologic Principles. Seminars in Nuclear Medicine. 38, 358–366 (2008). doi:10.1053/j.semnuclmed.2008.05.002
- 159. Kassis, A.I., Adelstein, S.J.: Radiobiologic principles in radionuclide therapy. J. Nucl. Med. 46 Suppl 1, 4S-12S (2005)
- 160. Larson, S.M., Carrasquillo, J.A., Cheung, N.-K.V., Press, O.W.: Radioimmunotherapy of human tumours. Nature Reviews Cancer. 15, 347–360 (2015). doi:10.1038/nrc3925

- 161. Mansi, L., Kitson, S., Cuccurullo, V., Ciarmiello, A.: Basic Premises to Molecular Imaging and Radionuclide Therapy Part 1. Journal of Diagnostic Imaging in Therapy. 1, 137–156 (2014). doi:10.17229/jdit.2014-1125-010
- 162. Brindle, K.: New approaches for imaging tumour responses to treatment. Nature Reviews Cancer. 8, 94–107 (2008). doi:10.1038/nrc2289
- 163. Navarro-Teulon, I., Lozza, C., Pèlegrin, A., Vivès, E., Pouget, J.-P.: General overview of radioimmunotherapy of solid tumors. Immunotherapy. 5, 467–487 (2013). doi:10.2217/imt.13.34
- 164. Witzig, T.E., White, C.A., Wiseman, G.A., Gordon, L.I., Emmanouilides, C., Raubitschek, A., Janakiraman, N., Gutheil, J., Schilder, R.J., Spies, S., Silverman, D.H.S., Parker, E., Grillo-López, A.J.: Phase I/II Trial of IDEC-Y2B8 Radioimmunotherapy for Treatment of Relapsed or Refractory CD20 ⁺ B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. Journal of Clinical Oncology. 17, 3793–3803 (1999). doi:10.1200/JCO.1999.17.12.3793
- 165. Witzig, T.E., Gordon, L.I., Cabanillas, F., Czuczman, M.S., Emmanouilides, C., Joyce, R., Pohlman, B.L., Bartlett, N.L., Wiseman, G.A., Padre, N., Grillo-López, A.J., Multani, P., White, C.A.: Randomized Controlled Trial of Yttrium-90–Labeled Ibritumomab Tiuxetan Radioimmunotherapy Versus Rituximab Immunotherapy for Patients With Relapsed or Refractory Low-Grade, Follicular, or Transformed B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. Journal of Clinical Oncology. 20, 2453–2463 (2002). doi:10.1200/JCO.2002.11.076
- 166. Witzig, T.E., Molina, A., Gordon, L.I., Emmanouilides, C., Schilder, R.J., Flinn, I.W., Darif, M., Macklis, R., Vo, K., Wiseman, G.A.: Long-term responses in patients with recurring or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma treated with yttrium 90 ibritumomab tiuxetan. Cancer. 109, 1804–1810 (2007). doi:10.1002/cncr.22617
- 167. Vose, J.M.: Bexxar: novel radioimmunotherapy for the treatment of low-grade and transformed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. Oncologist. 9, 160–172 (2004)
- 168. Friedberg, J.W., Fisher, R.I.: Iodine-131 tositumomab (Bexxar®): radioimmunoconjugate therapy for indolent and transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. Expert Review of Anticancer Therapy. 4, 18–26 (2004). doi:10.1586/14737140.4.1.18
- 169. Pouget, J.-P., Lozza, C., Deshayes, E., Boudousq, V., Navarro-Teulon, I.: Introduction to Radiobiology of Targeted Radionuclide Therapy. Frontiers in Medicine. 2, (2015). doi:10.3389/fmed.2015.00012
- 170. Emami, B., Lyman, J., Brown, A., Coia, L., Goitein, M., Munzenrider, J.E., Shank, B., Solin, L.J., Wesson, M.: Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 21, 109–122 (1991)
- 171. Perrot, Y., Degoul, F., Auzeloux, P., Bonnet, M., Cachin, F., Chezal, J.M., Donnarieix, D., Labarre, P., Moins, N., Papon, J., Rbah-Vidal, L., Vidal, A., Miot-Noirault, E., Maigne, L.: Internal dosimetry through GATE simulations of preclinical radiotherapy using a melanin-targeting ligand. Physics in Medicine and Biology. 59, 2183–2198 (2014). doi:10.1088/0031-9155/59/9/2183
- 172. Boucheix, C., Rubinstein, E.: Tetraspanins. Cell. Mol. Life Sci. 58, 1189–1205 (2001)
- 173. Zöller, M.: Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. Nature Reviews Cancer. 9, 40–55 (2009). doi:10.1038/nrc2543
- 174. Hemler, M.E.: Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. Nature Reviews Cancer. 14, 49–60 (2013). doi:10.1038/nrc3640
- 175. Szala, S., Kasai, Y., Steplewski, Z., Rodeck, U., Koprowski, H., Linnenbach, A.J.: Molecular cloning of cDNA for the human tumor-associated antigen CO-029 and identification of related transmembrane antigens. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 6833–6837 (1990)
- 176. Wei, L., Li, Y., Suo, Z.: TSPAN8 promotes gastric cancer growth and metastasis via ERK MAPK pathway. Int J Clin Exp Med. 8, 8599–8607 (2015)
- 177. Kanetaka, K., Sakamoto, M., Yamamoto, Y., Takamura, M., Kanematsu, T., Hirohashi, S.: Possible involvement of tetraspanin CO-029 in hematogenous intrahepatic metastasis of liver cancer cells. J. Gastroenterol. Hepatol. 18, 1309–1314 (2003)

- 178. Ailane, N., Greco, C., Zhu, Y., Sala-Valdés, M., Billard, M., Casal, I., Bawa, O., Opolon, P., Rubinstein, E., Boucheix, C.: Effect of an anti-human Co-029/tspan8 mouse monoclonal antibody on tumor growth in a nude mouse model. Frontiers in Physiology. 5, (2014). doi:10.3389/fphys.2014.00364
- 179. Maisonial-Besset, A., Witkowski, T., Navarro-Teulon, I., Berthier-Vergnes, O., Fois, G., Zhu, Y., Besse, S., Bawa, O., Briat, A., Quintana, M., Pichard, A., Bonnet, M., Rubinstein, E., Pouget, J.-P., Opolon, P., Maigne, L., Miot-Noirault, E., Chezal, J.-M., Boucheix, C., Degoul, F.: Tetraspanin 8 (TSPAN 8) as a potential target for radio-immunotherapy of colorectal cancer. Oncotarget. (2017). doi:10.18632/oncotarget.15787
- 180. Park, C.S., Kim, T.-K., Kim, H.G., Kim, Y.-J., Jeoung, M.H., Lee, W.R., Go, N.K., Heo, K., Lee, S.: Therapeutic targeting of tetraspanin8 in epithelial ovarian cancer invasion and metastasis. Oncogene. 35, 4540–4548 (2016). doi:10.1038/onc.2015.520
- 181. Létourneau, S., Beauchemin, N.: Rôles des antigènes carcino-embryonnaires dans la cancérisation et la progression tumorale. médecine/sciences. 13, 483 (1997). doi:10.4267/10608/403
- 182. Shinmi, D., Nakano, R., Mitamura, K., Suzuki-Imaizumi, M., Iwano, J., Isoda, Y., Enokizono, J., Shiraishi, Y., Arakawa, E., Tomizuka, K., Masuda, K.: Novel anticarcinoembryonic antigen antibody-drug conjugate has antitumor activity in the existence of soluble antigen. Cancer Medicine. 6, 798–808 (2017). doi:10.1002/cam4.1003
- 183. Santoro, L., Boutaleb, S., Garambois, V., Bascoul-Mollevi, C., Boudousq, V., Kotzki, P.-O., Pelegrin, M., Navarro-Teulon, I., Pelegrin, A., Pouget, J.-P.: Noninternalizing Monoclonal Antibodies Are Suitable Candidates for 125I Radioimmunotherapy of Small-Volume Peritoneal Carcinomatosis. Journal of Nuclear Medicine. 50, 2033–2041 (2009). doi:10.2967/jnumed.109.066993
- 184. Boudousq, V., Bobyk, L., Busson, M., Garambois, V., Jarlier, M., Charalambatou, P., Pèlegrin, A., Paillas, S., Chouin, N., Quenet, F., Maquaire, P., Torgue, J., Navarro-Teulon, I., Pouget, J.-P.: Comparison between Internalizing Anti-HER2 mAbs and Non-Internalizing Anti-CEA mAbs in Alpha-Radioimmunotherapy of Small Volume Peritoneal Carcinomatosis Using 212Pb. PLoS ONE. 8, e69613 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0069613
- 185. Hnatowich, D.J., Virzi, F., Rusckowski, M.: Investigations of avidin and biotin for imaging applications. J. Nucl. Med. 28, 1294–1302 (1987)
- 186. Lesch, H.P., Kaikkonen, M.U., Pikkarainen, J.T., Ylä-Herttuala, S.: Avidin-biotin technology in targeted therapy. Expert Opinion on Drug Delivery. 7, 551–564 (2010). doi:10.1517/17425241003677749
- 187. Sharkey, R.M.: Improving the Delivery of Radionuclides for Imaging and Therapy of Cancer Using Pretargeting Methods. Clinical Cancer Research. 11, 7109s-7121s (2005). doi:10.1158/1078-0432.CCR-1004-0009
- 188. Yao, Z., Zhang, M., Sakahara, H., Saga, T., Arano, Y., Konishi, J.: Avidin targeting of intraperitoneal tumor xenografts. J. Natl. Cancer Inst. 90, 25–29 (1998)
- 189. Dong, C., Yang, S., Shi, J., Zhao, H., Zhong, L., Liu, Z., Jia, B., Wang, F.: SPECT/NIRF Dual Modality Imaging for Detection of Intraperitoneal Colon Tumor with an Avidin/Biotin Pretargeting System. Scientific Reports. 6, 18905 (2016). doi:10.1038/srep18905
- 190. Pagel, J.M., Kenoyer, A.L., Back, T., Hamlin, D.K., Wilbur, D.S., Fisher, D.R., Park, S.I., Frayo, S., Axtman, A., Orgun, N., Orozco, J., Shenoi, J., Lin, Y., Gopal, A.K., Green, D.J., Appelbaum, F.R., Press, O.W.: Anti-CD45 pretargeted radioimmunotherapy using bismuth-213: high rates of complete remission and long-term survival in a mouse myeloid leukemia xenograft model. Blood. 118, 703–711 (2011). doi:10.1182/blood-2011-04-347039
- 191. Park, S.I., Shenoi, J., Frayo, S.M., Hamlin, D.K., Lin, Y., Wilbur, D.S., Stayton, P.S., Orgun, N., Hylarides, M., Buchegger, F., Kenoyer, A.L., Axtman, A., Gopal, A.K., Green, D.J., Pagel, J.M., Press, O.W.: Pretargeted Radioimmunotherapy Using Genetically Engineered Antibody-Streptavidin Fusion Proteins for Treatment of Non-Hodgkin Lymphoma. Clinical Cancer Research. 17, 7373–7382 (2011). doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1204

- 192. Magnani, P., Fazio, F., Grana, C., Songini, C., Frigerio, L., Pecorelli, S., Mangili, G., Colombo, N., Mariani, C.D.A., Paganelli, G.: Diagnosis of persistent ovarian carcinoma with three-step immunoscintigraphy. British Journal of Cancer. 82, 616–620 (2000). doi:10.1054/bjoc.1999.0972
- 193. Goodwin, D.A., Meares, C.F., McCall, M.J., McTigue, M., Chaovapong, W.: Pre-targeted immunoscintigraphy of murine tumors with indium-111-labeled bifunctional haptens. J. Nucl. Med. 29, 226–234 (1988)
- 194. Orcutt, K.D., Slusarczyk, A.L., Cieslewicz, M., Ruiz-Yi, B., Bhushan, K.R., Frangioni, J.V., Wittrup, K.D.: Engineering an antibody with picomolar affinity to DOTA chelates of multiple radionuclides for pretargeted radioimmunotherapy and imaging. Nuclear Medicine and Biology. 38, 223–233 (2011). doi:10.1016/j.nucmedbio.2010.08.013
- 195. Janevik-Ivanovska, E., Gautherot, E., Hillairet de Boisferon, M., Cohen, M., Milhaud, G., Tartar, A., Rostene, W., Barbet, J., Gruaz-Guyon, A.: Bivalent Hapten-Bearing Peptides Designed for Iodine-131 Pretargeted Radioimmunotherapy. Bioconjugate Chemistry. 8, 526–533 (1997). doi:10.1021/bc970083h
- 196. Boerman, O.C., Kranenborg, M.H., Oosterwijk, E., Griffiths, G.L., McBride, W.J., Oyen, W.J., de Weijert, M., Oosterwijk-Wakka, J., Hansen, H.J., Corstens, F.H.: Pretargeting of renal cell carcinoma: improved tumor targeting with a bivalent chelate. Cancer Res. 59, 4400–4405 (1999)
- 197. Gautherot, E., Rouvier, E., Daniel, L., Loucif, E., Bouhou, J., Manetti, C., Martin, M., Le Doussal, J.M., Barbet, J.: Pretargeted radioimmunotherapy of human colorectal xenografts with bispecific antibody and 131I-labeled bivalent hapten. J. Nucl. Med. 41, 480–487 (2000)
- 198. Kraeber-Bodéré, F., Rousseau, C., Bodet-Milin, C., Ferrer, L., Faivre-Chauvet, A., Campion, L., Vuillez, J.-P., Devillers, A., Chang, C.-H., Goldenberg, D.M., Chatal, J.-F., Barbet, J.: Targeting, toxicity, and efficacy of 2-step, pretargeted radioimmunotherapy using a chimeric bispecific antibody and 131I-labeled bivalent hapten in a phase I optimization clinical trial. J. Nucl. Med. 47, 247–255 (2006)
- 199. Rossi, E.A., Goldenberg, D.M., Cardillo, T.M., McBride, W.J., Sharkey, R.M., Chang, C.-H.: Stably tethered multifunctional structures of defined composition made by the dock and lock method for use in cancer targeting. Proceedings of the National Academy of Sciences. 103, 6841–6846 (2006). doi:10.1073/pnas.0600982103
- 200. Sharkey, R.M., Rossi, E.A., McBride, W.J., Chang, C.-H., Goldenberg, D.M.: Recombinant Bispecific Monoclonal Antibodies Prepared by the Dock-and-Lock Strategy for Pretargeted Radioimmunotherapy. Seminars in Nuclear Medicine. 40, 190–203 (2010). doi:10.1053/j.semnuclmed.2009.12.002
- 201. Sharkey, R.M., van Rij, C.M., Karacay, H., Rossi, E.A., Frielink, C., Regino, C., Cardillo, T.M., McBride, W.J., Chang, C.-H., Boerman, O.C., Goldenberg, D.M.: A New Tri-Fab Bispecific Antibody for Pretargeting Trop-2-Expressing Epithelial Cancers. Journal of Nuclear Medicine. 53, 1625–1632 (2012). doi:10.2967/jnumed.112.104364
- 202. van Rij, C.M., Frielink, C., Goldenberg, D.M., Sharkey, R.M., Lütje, S., McBride, W.J., Oyen, W.J.G., Boerman, O.C.: Pretargeted Radioimmunotherapy of Prostate Cancer with an Anti-TROP-2×Anti-HSG Bispecific Antibody and a ¹⁷⁷ Lu-Labeled Peptide. Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals. 29, 323–329 (2014). doi:10.1089/cbr.2014.1660
- 203. Schoffelen, R., Boerman, O.C., Goldenberg, D.M., Sharkey, R.M., van Herpen, C.M.L., Franssen, G.M., McBride, W.J., Chang, C.-H., Rossi, E.A., van der Graaf, W.T.A., Oyen, W.J.G.: Development of an imaging-guided CEA-pretargeted radionuclide treatment of advanced colorectal cancer: first clinical results. British Journal of Cancer. 109, 934–942 (2013). doi:10.1038/bjc.2013.376
- 204. Bodet-Milin, C., Ferrer, L., Rauscher, A., Masson, D., Rbah-Vidal, L., Faivre-Chauvet, A., Cerato, E., Rousseau, C., Hureaux, J., Couturier, O., Salaün, P.-Y., Goldenberg, D.M., Sharkey, R.M., Kraeber-Bodéré, F., Barbet, J.: Pharmacokinetics and Dosimetry Studies for Optimization of

- Pretargeted Radioimmunotherapy in CEA-Expressing Advanced Lung Cancer Patients. Frontiers in Medicine. 2, (2015). doi:10.3389/fmed.2015.00084
- 205. Bodet-Milin, C., Faivre-Chauvet, A., Carlier, T., Rauscher, A., Bourgeois, M., Cerato, E., Rohmer, V., Couturier, O., Drui, D., Goldenberg, D.M., Sharkey, R.M., Barbet, J., Kraeber-Bodere, F.: Immuno-PET Using Anticarcinoembryonic Antigen Bispecific Antibody and 68Ga-Labeled Peptide in Metastatic Medullary Thyroid Carcinoma: Clinical Optimization of the Pretargeting Parameters in a First-in-Human Trial. Journal of Nuclear Medicine. 57, 1505–1511 (2016). doi:10.2967/jnumed.116.172221
- 206. Kraeber-Bodéré, F., Rousseau, C., Bodet-Milin, C., Frampas, E., Faivre-Chauvet, A., Rauscher, A., Sharkey, R.M., Goldenberg, D.M., Chatal, J.-F., Barbet, J.: A pretargeting system for tumor PET imaging and radioimmunotherapy. Frontiers in Pharmacology. 6, (2015). doi:10.3389/fphar.2015.00054
- 207. Summerton, J., Stein, D., Huang, S.B., Matthews, P., Weller, D., Partridge, M.: Morpholino and Phosphorothioate Antisense Oligomers Compared in Cell-Free and In-Cell Systems. Antisense and Nucleic Acid Drug Development. 7, 63–70 (1997). doi:10.1089/oli.1.1997.7.63
- 208. Altai, M., Membreno, R., Cook, B., Tolmachev, V., Zeglis, B.: Pretargeted Imaging and Therapy. Journal of Nuclear Medicine. jnumed.117.189944 (2017). doi:10.2967/jnumed.117.189944
- 209. Liu, G., Mang'era, K., Liu, N., Gupta, S., Rusckowski, M., Hnatowich, D.J.: Tumor pretargeting in mice using (99m)Tc-labeled morpholino, a DNA analog. J. Nucl. Med. 43, 384–391 (2002)
- 210. He, J., Wang, Y., Dou, S., Liu, X., Zhang, S., Liu, G., Hnatowich, D.: Affinity Enhancement Pretargeting: Synthesis and Testing of a ^{99m} Tc-Labeled Bivalent MORF. Molecular Pharmaceutics. 7, 1118–1124 (2010). doi:10.1021/mp9002909
- 211. Liu, G., Dou, S., Liu, Y., Wang, Y., Rusckowski, M., Hnatowich, D.J.: ⁹⁰ Y labeled Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer for Pretargeting Radiotherapy. Bioconjugate Chemistry. 22, 2539–2545 (2011). doi:10.1021/bc200366t
- 212. Liu, G., Hnatowich, D.J.: A Semiempirical Model of Tumor Pretargeting. Bioconjugate Chemistry. 19, 2095–2104 (2008). doi:10.1021/bc8002748
- 213. Mardirossian, G., Lei, K., Rusckowski, M., Chang, F., Qu, T., Egholm, M., Hnatowich, D.J.: In vivo hybridization of technetium-99m-labeled peptide nucleic acid (PNA). J. Nucl. Med. 38, 907–913 (1997)
- 214. Leonidova, A., Foerster, C., Zarschler, K., Schubert, M., Pietzsch, H.-J., Steinbach, J., Bergmann, R., Metzler-Nolte, N., Stephan, H., Gasser, G.: In vivo demonstration of an active tumor pretargeting approach with peptide nucleic acid bioconjugates as complementary system. Chemical Science. 6, 5601–5616 (2015). doi:10.1039/C5SC00951K
- 215. Kolb, H.C., Finn, M.G., Sharpless, K.B.: Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 40, 2004–2021 (2001)
- 216. Sletten, E.M., Bertozzi, C.R.: Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. Angewandte Chemie International Edition. 48, 6974–6998 (2009). doi:10.1002/anie.200900942
- 217. Mongis, A., Piller, F., Piller, V.: Coupling of Immunostimulants to Live Cells through Metabolic Glycoengineering and Bioorthogonal Click Chemistry. Bioconjugate Chemistry. 28, 1151–1165 (2017). doi:10.1021/acs.bioconjchem.7b00042
- 218. Fernandez, M.V., Freed, E.O.: "Expand and Click": A New Method for Labeling HIV-1 Envelope Glycoproteins. Cell Chemical Biology. 24, 548–550 (2017). doi:10.1016/j.chembiol.2017.05.006
- 219. Staudinger, H., Meyer, J.: Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylenderivate und Phosphinimine. Helvetica Chimica Acta. 2, 635–646 (1919). doi:10.1002/hlca.19190020164
- 220. Schilling, C.I., Jung, N., Biskup, M., Schepers, U., Bräse, S.: Bioconjugation via azide–Staudinger ligation: an overview. Chemical Society Reviews. 40, 4840 (2011). doi:10.1039/c0cs00123f
- 221. Shieh, P., Bertozzi, C.R.: Design strategies for bioorthogonal smart probes. Org. Biomol. Chem. 12, 9307–9320 (2014). doi:10.1039/C4OB01632G

- 222. Saxon, E., Bertozzi, C.R.: Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. Science. 287, 2007–2010 (2000)
- 223. Hang, H.C., Loureiro, J., Spooner, E., van der Velden, A.W.M., Kim, Y.-M., Pollington, A.M., Maehr, R., Starnbach, M.N., Ploegh, H.L.: Mechanism-Based Probe for the Analysis of Cathepsin Cysteine Proteases in Living Cells. ACS Chemical Biology. 1, 713–723 (2006). doi:10.1021/cb600431a
- 224. Sundhoro, M., Jeon, S., Park, J., Ramström, O., Yan, M.: Perfluoroaryl Azide Staudinger Reaction: A Fast and Bioorthogonal Reaction. Angewandte Chemie International Edition. 56, 12117–12121 (2017). doi:10.1002/anie.201705346
- 225. Chang, P.V., Prescher, J.A., Hangauer, M.J., Bertozzi, C.R.: Imaging Cell Surface Glycans with Bioorthogonal Chemical Reporters. Journal of the American Chemical Society. 129, 8400–8401 (2007). doi:10.1021/ja0702380
- 226. Saxon, E., Armstrong, J.I., Bertozzi, C.R.: A "Traceless" Staudinger Ligation for the Chemoselective Synthesis of Amide Bonds. Organic Letters. 2, 2141–2143 (2000). doi:10.1021/ol006054v
- 227. Huisgen, R.: Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolr Cycloadditions. Angewandte Chemie International Edition in English. 2, 633–645 (1963). doi:10.1002/anie.196306331
- 228. Rostovtsev, V.V., Green, L.G., Fokin, V.V., Sharpless, K.B.: A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. Angewandte Chemie International Edition. 41, 2596–2599 (2002). doi:10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4
- 229. Tornøe, C.W., Christensen, C., Meldal, M.: Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. The Journal of Organic Chemistry. 67, 3057–3064 (2002). doi:10.1021/j0011148j
- 230. Presolski, S.I., Hong, V., Cho, S.-H., Finn, M.G.: Tailored Ligand Acceleration of the Cu-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition Reaction: Practical and Mechanistic Implications. Journal of the American Chemical Society. 132, 14570–14576 (2010). doi:10.1021/ja105743g
- 231. Soriano del Amo, D., Wang, W., Jiang, H., Besanceney, C., Yan, A.C., Levy, M., Liu, Y., Marlow, F.L., Wu, P.: Biocompatible Copper(I) Catalysts for in Vivo Imaging of Glycans. Journal of the American Chemical Society. 132, 16893–16899 (2010). doi:10.1021/ja106553e
- 232. Agard, N.J., Prescher, J.A., Bertozzi, C.R.: A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. Journal of the American Chemical Society. 126, 15046–15047 (2004). doi:10.1021/ja044996f
- 233. Lee, D.-E., Na, J.H., Lee, S., Kang, C.M., Kim, H.N., Han, S.J., Kim, H., Choe, Y.S., Jung, K.-H., Lee, K.C., Choi, K., Kwon, I.C., Jeong, S.Y., Lee, K.-H., Kim, K.: Facile Method To Radiolabel Glycol Chitosan Nanoparticles with ⁶⁴ Cu via Copper-Free Click Chemistry for MicroPET Imaging. Molecular Pharmaceutics. 10, 2190–2198 (2013). doi:10.1021/mp300601r
- 234. van den Bosch, S.M., Rossin, R., Renart Verkerk, P., ten Hoeve, W., Janssen, H.M., Lub, J., Robillard, M.S.: Evaluation of strained alkynes for Cu-free click reaction in live mice. Nuclear Medicine and Biology. 40, 415–423 (2013). doi:10.1016/j.nucmedbio.2012.12.006
- 235. Au, K.M., Tripathy, A., Lin, C.P.-I., Wagner, K., Hong, S., Wang, A.Z., Park, S.I.: Bespoke Pretargeted Nanoradioimmunotherapy for the Treatment of Non-Hodgkin Lymphoma. ACS Nano. 12, 1544–1563 (2018). doi:10.1021/acsnano.7b08122
- 236. Blackman, M.L., Royzen, M., Fox, J.M.: Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reactivity. Journal of the American Chemical Society. 130, 13518–13519 (2008). doi:10.1021/ja8053805
- 237. Oliveira, B.L., Guo, Z., Bernardes, G.J.L.: Inverse electron demand Diels–Alder reactions in chemical biology. Chem. Soc. Rev. 46, 4895–4950 (2017). doi:10.1039/C7CS00184C
- 238. Rossin, R., Renart Verkerk, P., van den Bosch, S.M., Vulders, R.C.M., Verel, I., Lub, J., Robillard, M.S.: In Vivo Chemistry for Pretargeted Tumor Imaging in Live Mice. Angewandte Chemie International Edition. 49, 3375–3378 (2010). doi:10.1002/anie.200906294

- 239. Rossin, R., van den Bosch, S.M., ten Hoeve, W., Carvelli, M., Versteegen, R.M., Lub, J., Robillard, M.S.: Highly Reactive *trans* -Cyclooctene Tags with Improved Stability for Diels—Alder Chemistry in Living Systems. Bioconjugate Chemistry. 24, 1210–1217 (2013). doi:10.1021/bc400153y
- 240. Zeglis, B.M., Brand, C., Abdel-Atti, D., Carnazza, K.E., Cook, B.E., Carlin, S., Reiner, T., Lewis, J.S.: Optimization of a Pretargeted Strategy for the PET Imaging of Colorectal Carcinoma via the Modulation of Radioligand Pharmacokinetics. Molecular Pharmaceutics. 12, 3575–3587 (2015). doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00294
- 241. Houghton, J.L., Zeglis, B.M., Abdel-Atti, D., Sawada, R., Scholz, W.W., Lewis, J.S.: Pretargeted Immuno-PET of Pancreatic Cancer: Overcoming Circulating Antigen and Internalized Antibody to Reduce Radiation Doses. Journal of Nuclear Medicine. 57, 453–459 (2016). doi:10.2967/jnumed.115.163824
- 242. Maggi, A., Ruivo, E., Fissers, J., Vangestel, C., Chatterjee, S., Joossens, J., Sobott, F., Staelens, S., Stroobants, S., Van Der Veken, P., wyffels, L., Augustyns, K.: Development of a novel antibody–tetrazine conjugate for bioorthogonal pretargeting. Org. Biomol. Chem. 14, 7544–7551 (2016). doi:10.1039/C6OB01411A
- 243. Billaud, E.M.F., Shahbazali, E., Ahamed, M., Cleeren, F., Noël, T., Koole, M., Verbruggen, A., Hessel, V., Bormans, G.: Micro-flow photosynthesis of new dienophiles for inverse-electron-demand Diels–Alder reactions. Potential applications for pretargeted in vivo PET imaging. Chem. Sci. 8, 1251–1258 (2017). doi:10.1039/C6SC02933G
- 244. Houghton, J.L., Membreno, R., Abdel-Atti, D., Cunanan, K.M., Carlin, S., Scholz, W.W., Zanzonico, P.B., Lewis, J.S., Zeglis, B.M.: Establishment of the *In Vivo* Efficacy of Pretargeted Radioimmunotherapy Utilizing Inverse Electron Demand Diels-Alder Click Chemistry. Molecular Cancer Therapeutics. 16, 124–133 (2017). doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0503
- 245. Membreno, R., Cook, B.E., Fung, K., Lewis, J.S., Zeglis, B.M.: Click-Mediated Pretargeted Radioimmunotherapy of Colorectal Carcinoma. Molecular Pharmaceutics. 15, 1729–1734 (2018). doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00093
- 246. Shah, M.A., Zhang, X., Rossin, R., Robillard, M.S., Fisher, D.R., Bueltmann, T., Hoeben, F.J.M., Quinn, T.P.: Metal-Free Cycloaddition Chemistry Driven Pretargeted Radioimmunotherapy Using α-Particle Radiation. Bioconjugate Chemistry. 28, 3007–3015 (2017). doi:10.1021/acs.bioconjchem.7b00612
- 247. Junutula, J.R., Raab, H., Clark, S., Bhakta, S., Leipold, D.D., Weir, S., Chen, Y., Simpson, M., Tsai, S.P., Dennis, M.S., Lu, Y., Meng, Y.G., Ng, C., Yang, J., Lee, C.C., Duenas, E., Gorrell, J., Katta, V., Kim, A., McDorman, K., Flagella, K., Venook, R., Ross, S., Spencer, S.D., Lee Wong, W., Lowman, H.B., Vandlen, R., Sliwkowski, M.X., Scheller, R.H., Polakis, P., Mallet, W.: Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. Nature Biotechnology. 26, 925–932 (2008). doi:10.1038/nbt.1480
- 248. Mandikian, D., Rafidi, H., Adhikari, P., Venkatraman, P., Nazarova, L., Fung, G., Figueroa, I., Ferl, G.Z., Ulufatu, S., Ho, J., McCaughey, C., Lau, J., Yu, S.-F., Prabhu, S., Sadowsky, J., Boswell, C.A.: Site-specific conjugation allows modulation of click reaction stoichiometry for pretargeted SPECT imaging. mAbs. (2018). doi:10.1080/19420862.2018.1521132
- 249. Royzen, M., Yap, G.P.A., Fox, J.M.: A Photochemical Synthesis of Functionalized *trans* Cyclooctenes Driven by Metal Complexation. Journal of the American Chemical Society. 130, 3760–3761 (2008). doi:10.1021/ja8001919
- 250. Rahim, M.K., Kota, R., Haun, J.B.: Enhancing Reactivity for Bioorthogonal Pretargeting by Unmasking Antibody-Conjugated *trans* -Cyclooctenes. Bioconjugate Chemistry. 26, 352–360 (2015). doi:10.1021/bc500605g
- 251. Chapman, A.P.: PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 531–545 (2002)
- 252. Wang, L., Shi, J., Kim, Y.-S., Zhai, S., Jia, B., Zhao, H., Liu, Z., Wang, F., Chen, X., Liu, S.: Improving Tumor-Targeting Capability and Pharmacokinetics of ^{99m} Tc-Labeled Cyclic RGD

- Dimers with PEG $_4$ Linkers. Molecular Pharmaceutics. 6, 231–245 (2009). doi:10.1021/mp800150r
- 253. Läppchen, T., Rossin, R., van Mourik, T.R., Gruntz, G., Hoeben, F.J.M., Versteegen, R.M., Janssen, H.M., Lub, J., Robillard, M.S.: DOTA-tetrazine probes with modified linkers for tumor pretargeting. Nuclear Medicine and Biology. 55, 19–26 (2017). doi:10.1016/j.nucmedbio.2017.09.001
- 254. Meyer, J.-P., Kozlowski, P., Jackson, J., Cunanan, K.M., Adumeau, P., Dilling, T.R., Zeglis, B.M., Lewis, J.S.: Exploring Structural Parameters for Pretargeting Radioligand Optimization. Journal of Medicinal Chemistry. 60, 8201–8217 (2017). doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01108
- 255. Liu, F., Liang, Y., Houk, K.N.: Bioorthogonal Cycloadditions: Computational Analysis with the Distortion/Interaction Model and Predictions of Reactivities. Accounts of Chemical Research. 50, 2297–2308 (2017). doi:10.1021/acs.accounts.7b00265
- 256. Taylor, M.T., Blackman, M.L., Dmitrenko, O., Fox, J.M.: Design and Synthesis of Highly Reactive Dienophiles for the Tetrazine– *trans* Cyclooctene Ligation. Journal of the American Chemical Society. 133, 9646–9649 (2011). doi:10.1021/ja201844c
- 257. Stéen, E.J.L., Edem, P.E., Nørregaard, K., Jørgensen, J.T., Shalgunov, V., Kjaer, A., Herth, M.M.: Pretargeting in nuclear imaging and radionuclide therapy: Improving efficacy of theranostics and nanomedicines. Biomaterials. 179, 209–245 (2018). doi:10.1016/j.biomaterials.2018.06.021
- 258. Mamat, C., Gott, M., Steinbach, J.: Recent Progress using the Staudinger Ligation for Radiolabeling Applications. Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals. (2017). doi:10.1002/jlcr.3562
- 259. Rossin, R., Robillard, M.S.: Pretargeted imaging using bioorthogonal chemistry in mice. Current Opinion in Chemical Biology. 21, 161–169 (2014). doi:10.1016/j.cbpa.2014.07.023
- 260. Rossin, R., van Duijnhoven, S.M.J., ten Hoeve, W., Janssen, H.M., Kleijn, L.H.J., Hoeben, F.J.M., Versteegen, R.M., Robillard, M.S.: Triggered Drug Release from an Antibody–Drug Conjugate Using Fast "Click-to-Release" Chemistry in Mice. Bioconjugate Chemistry. 27, 1697–1706 (2016). doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00231
- 261. Boutin, M.E., Hoffman-Kim, D.: Application and Assessment of Optical Clearing Methods for Imaging of Tissue-Engineered Neural Stem Cell Spheres. Tissue Engineering Part C: Methods. 21, 292–302 (2015). doi:10.1089/ten.tec.2014.0296
- 262. Klaver, Y.L.B., Hendriks, T., Lomme, R.M.L.M., Rutten, H.J.T., Bleichrodt, R.P., de Hingh, I.H.J.T.: Intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy after cytoreductive surgery for peritoneal carcinomatosis in an experimental model. British Journal of Surgery. 97, 1874–1880 (2010). doi:10.1002/bjs.7249
- 263. Rondon, A., Ty, N., Bequignat, J.-B., Quintana, M., Briat, A., Witkowski, T., Bouchon, B., Boucheix, C., Miot-Noirault, E., Pouget, J.-P., Chezal, J.-M., Navarro-Teulon, I., Moreau, E., Degoul, F.: Antibody PEGylation in bioorthogonal pretargeting with transcyclooctene/tetrazine cycloaddition: in vitro and in vivo evaluation in colorectal cancer models. Scientific Reports. 7, (2017). doi:10.1038/s41598-017-15051-y
- 264. Lv, D., Hu, Z., Lu, L., Lu, H., Xu, X.: Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery (Review). Oncology Letters. (2017). doi:10.3892/ol.2017.7134
- 265. van den Brand, D., Massuger, L.F., Brock, R., Verdurmen, W.P.R.: Mimicking Tumors: Toward More Predictive *In Vitro* Models for Peptide- and Protein-Conjugated Drugs. Bioconjugate Chemistry. 28, 846–856 (2017). doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00699
- 266. Edmondson, R., Broglie, J.J., Adcock, A.F., Yang, L.: Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. ASSAY and Drug Development Technologies. 12, 207–218 (2014). doi:10.1089/adt.2014.573
- 267. Hoarau-Véchot, J., Rafii, A., Touboul, C., Pasquier, J.: Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? International Journal of Molecular Sciences. 19, 181 (2018). doi:10.3390/ijms19010181

- 268. Nath, S., Devi, G.R.: Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. Pharmacology & Therapeutics. 163, 94–108 (2016). doi:10.1016/j.pharmthera.2016.03.013
- 269. Rossin, R., van Duijnhoven, S.M.J., Läppchen, T., van den Bosch, S.M., Robillard, M.S.: *Trans* Cyclooctene Tag with Improved Properties for Tumor Pretargeting with the Diels–Alder Reaction. Molecular Pharmaceutics. 11, 3090–3096 (2014). doi:10.1021/mp500275a
- 270. Deshayes, E., Ladjohounlou, R., Le Fur, P., Pichard, A., Lozza, C., Boudousq, V., Sevestre, S., Jarlier, M., Kashani, R., Koch, J., Sosabowski, J., Foster, J., Chouin, N., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., Kotzki, P.-O., Navarro-Teulon, I., Pouget, J.-P.: Radiolabeled Antibodies Against Müllerian-Inhibiting Substance Receptor, Type II: New Tools for a Theranostic Approach in Ovarian Cancer. Journal of Nuclear Medicine. 59, 1234–1242 (2018). doi:10.2967/jnumed.118.208611
- 271. Cook, B.E., Membreno, R., Zeglis, B.M.: Dendrimer Scaffold for the Amplification of In Vivo Pretargeting Ligations. Bioconjugate Chemistry. 29, 2734–2740 (2018). doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00385
- 272. Keinänen, O., Fung, K., Pourat, J., Jallinoja, V., Vivier, D., Pillarsetty, N.K., Airaksinen, A.J., Lewis, J.S., Zeglis, B.M., Sarparanta, M.: Pretargeting of internalizing trastuzumab and cetuximab with a 18F-tetrazine tracer in xenograft models. EJNMMI Research. 7, (2017). doi:10.1186/s13550-017-0344-6
- 273. Svatunek, D., Denk, C., Rosecker, V., Sohr, B., Hametner, C., Allmaier, G., Fröhlich, J., Mikula, H.: Efficient low-cost preparation of trans-cyclooctenes using a simplified flow setup for photoisomerization. Monatshefte für Chemie Chemical Monthly. 147, 579–585 (2016). doi:10.1007/s00706-016-1668-z
- 274. Sauer, J., Heldmann, D.K., Hetzenegger, J., Krauthan, J., Sichert, H., Schuster, J.: 1,2,4,5-Tetrazine: Synthesis and Reactivity in [4+2] Cycloadditions. European Journal of Organic Chemistry. 1998, 2885–2896 (1998). doi:10.1002/(SICI)1099-0690(199812)1998:12<2885::AID-EJOC2885>3.0.CO;2-L
- 275. Liang, Y., Mackey, J.L., Lopez, S.A., Liu, F., Houk, K.N.: Control and Design of Mutual Orthogonality in Bioorthogonal Cycloadditions. Journal of the American Chemical Society. 134, 17904–17907 (2012). doi:10.1021/ja309241e
- 276. Bhattacharyya, S., Dixit, M.: Metallic radionuclides in the development of diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals. Dalton Transactions. 40, 6112 (2011). doi:10.1039/c1dt10379b
- 277. de Boer, E., Harlaar, N.J., Taruttis, A., Nagengast, W.B., Rosenthal, E.L., Ntziachristos, V., van Dam, G.M.: Optical innovations in surgery: Optical innovations in surgery. British Journal of Surgery. 102, e56–e72 (2015). doi:10.1002/bjs.9713
- 278. Lion, C., Simon, C., Huss, B., Blervacq, A.-S., Tirot, L., Toybou, D., Spriet, C., Slomianny, C., Guerardel, Y., Hawkins, S., Biot, C.: BLISS: A Bioorthogonal Dual-Labeling Strategy to Unravel Lignification Dynamics in Plants. Cell Chemical Biology. 24, 326–338 (2017). doi:10.1016/j.chembiol.2017.02.009
- 279. Wang, T., Yuan, C., Dai, B., Liu, Y., Li, M., Feng, Z., Jiang, Q., Xu, Z., Zhao, N., Gu, N., Yang, F.: Click chemistry-mediated rapid microbubble catching for acute thrombus ultrasound molecular imaging. ChemBioChem. (2017). doi:10.1002/cbic.201700068
- 280. Yazdani, A., Bilton, H., Vito, A., Genady, A.R., Rathmann, S.M., Ahmad, Z., Janzen, N., Czorny, S., Zeglis, B.M., Francesconi, L.C., Valliant, J.F.: A Bone-Seeking trans -Cyclooctene for Pretargeting and Bioorthogonal Chemistry: A Proof of Concept Study Using ^{99m} Tc- and ¹⁷⁷ Lu-Labeled Tetrazines. Journal of Medicinal Chemistry. 59, 9381–9389 (2016). doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00938

Partie 6: Annexes

Supplementary Information

Antibody PEGylation in bioorthogonal pretargeting with trans-cyclooctene/tetrazine

cycloaddition: in vitro and in vivo evaluation in colorectal cancer models.

Aurélie Rondon^{1,3¤}, Nancy Ty^{1¤}, Jean-Baptiste Bequignat¹, Mercedes Quintana¹, Arnaud

Briat¹, Tiffany Witkowski¹, Bernadette Bouchon¹, Claude Boucheix², Elisabeth Miot-Noirault¹,

Jean-Pierre Pouget³, Jean-Michel Chezal¹, Isabelle Navarro-Teulon³, Emmanuel Moreau¹,

Françoise Degoul^{1¤}*

x Co-authors

*Corresponding author

1: Université Clermont Auvergne, INSERM U1240, Imagerie Moléculaire et Stratégies

Théranostiques, F-63000 Clermont Ferrand, France.

2: Université Paris Sud, INSERM U935, Bâtiment Lavoisier, 14 Avenue Paul-Vaillant-Couturier,

F-94800 Villejuif.

3: Institut de Recherche en Cancérologie (IRCM), INSERM U1194 – Université Montpellier –

ICM, Radiobiology and Targeted Radiotherapy, F-34298 Montpellier cedex 5.

*Corresponding author: D Françoise DEGOUL, PhD UMR 1240 INSERM UCA, 58 Rue Montalembert,

63005 Clermont-Ferrand cedex; Tel: (+33)4 73 15 08 14; Fax: (+33)4 73 15 08 01;

E-mail: <u>francoise.degoul@inserm.fr</u>

202

Supplementary methods

Syntheses of pretargeting components. TCO and TCO1b 1 (Fig.1a) were synthesized as reported by Rossin and co-workers in 2010^1 . TCOPEG_nNHS derivatives **2-3** (Fig.1a) were synthesized according to the following general procedure. TCO 1b **1** (24 mg, 0.062 mmol) was first dissolved in anhydrous CH₂Cl₂ (1 mL). Then triethylamine (87 μ L, 0.62 mmol) and a solution of PEGylated amino acids (PEG₄ amino acid (15-Amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoic acid (CAS 663921-15-1), 35 mg, 0.093 mmol, 1.5 eq) — or PEG₁₂ amino acid (37-Amino-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37-dodecaoxanonatriacontanoic acid (CAS 1415408-69-3), 113 mg, 2.5 eq) in anhydrous CH₂Cl₂ (1.5 mL) were successively added. An amount of 0.5 eq of PEGylated amino acid (PEG₄: 12 mg, 0,031 mmol; and PEG₁₂: 23 mg, 0,031 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (1 mL) were added 16 h later and the reaction mixtures were stirred at RT for respectively 1 and 6 more days. Then bis(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonate (50 mg, 0.186 mmol), triethylamine (26 μ L, 0.186 mmol) and catalytic *N*,*N*-dimethylaminopyridine (1,5 mg, 0.012 mmol) were successively added and the reaction mixtures were stirred at RT for 1 h. The mixtures were successively washed with 0.5 N aqueous HCl (2.5 mL), H₂O (3 x 3 mL) and brine (6 mL) and the organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure.

Compound **2**: Crude product containing TCOPEG₄NHS **2** was purified by column chromatography on C-18 reversed phase silica gel (H₂O/CH₃CN 55/45) and furnished the desired compound as a mixture of TCO- and CCOPEG₄NHS (91/9; 17 mg, 43%). TCOPEG₄NHS **2**: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.75 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.85 (bs, 2H), 5.65-5.47 (m, 2H), 4.45 (m, 1H), 3.79 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.66-3.59 (m, 16 H), 2.84 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.81 (s, 4H), 2.40-1.56 (m, 10H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 169.0 (q), 166.9 (q), 166.7 (q), 152.8 (q), 141.1 (q), 134.9, 133.1, 129.0 (q), 128.2, 117.7, 81.5, 70.7, 70.6 x 2, 70.5 x 2, 70.3, 69.8, 65.7, 41.1, 39.8, 38.6, 34.2, 32.5, 32.2, 31.0, 25.6; HRMS (ESI+): m/z 634.2980 [M+H]⁺, Calcd for C₃₁H₄₄O₁₁N₃ 634.2970.

CCOPEG₄NHS: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.74 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.98 (bs, 1H), 6.92 (bs, 1H), 5.71-5.55 (m, 2H), 4.83 (m, 1H), 3.78 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.64-3.58 (m, 16 H), 2.83 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.79 (s, 4H), 2.40-1.57 (m, 10H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 169.1 (q), 167.0 (q), 166.8 (q), 152.9 (q), 141.2 (q), 129.8, 129.5, 128.9 (q), 128.2, 117.7, 116.3, 77.0, 70.7, 70.6, 70.5 x 2, 70.4, 70.2, 69.9, 65.7, 39.8, 33.9, 33.8, 32.1, 25.6, 24.8, 22.3; HRMS (ESI+): m/z 634.2966 [M+H]⁺, Calcd for C₃₁H₄₄O₁₁N₃ 634.2970.

Compound **3**: Several attempts to purify crude product containing TCOPEG₁₂NHS **3** (TCO/CCO 96/4, quantitative) by normal and C18-reversed-phase chromatography were undertaken and failed to provide the desired activated NHS esters which tend to massively isomerize and/or hydrolyze.

Spectroscopic data were consistent with previously reported data for this compound². Crude product **3** was then coupled to mAbs as such without purification for preliminary studies.

mAb modifications. Both Ts29.2 and 35A7 mAbs were functionalized by addition of different amounts of TCO in the reaction, namely 0, 5, 10, 15, 20 or 30 equivalents of TCO for 1 equivalent of mAb. The distance between mAb and TCO was also modulated by insertion of PEGylated spacers of various lengths, i.e. mAb-1, mAb-2 and mAb-3 (Fig1b).

An amount of 100 μg of Ts29.2 or 35A7 mAb concentrated in DPBS was buffered with 1 M aqueous NaHCO₃ to adjust the pH to 9. Then, a solution of TCO1b 1 or TCO-PEG_n-NHS esters 2,3 (0, 5, 10, 15, 20 and 30 eq) dissolved in DMSO was added to the mixture (5 % DMSO final concentration). Reactions were stirred for 30 min in the dark at 4 °C and then purified on Zeba desalting columns (40 kDa MW cut-off, 0.5 mL) (Pierce ZebaTM desalting columns, Thermo Scientific). mAbs-1-3 conjugates were kept in the dark either at -20 °C or 4 °C. All reactions were performed at least in triplicates. Stability studies were made *in vitro*, following the procedure described in supplementary methods. For *in vivo* experiments, the same grafting protocol was applied on 500 μg of mAb. Final concentration of mAbs-1-3 conjugates was measured using a Multiskan GO microplate spectrophotometer (Fisher Scientific, France). We determined a yield of mAb recovery taking into account the starting quantity of mAb and the final one after desalting columns.

Determination of the number of 1,2 and 3 moieties per mAb. Assessments were made using MALDI-TOF MS analyzes (Voyager DE-Pro mass spectrometer, Sciex, USA). Sinapinic acid (Sigma, France) was diluted in acetonitrile/water (30/70, v/v) with 0.1 % TFA at 10 mg/mL to obtain the matrix solution. A set of three serial dilutions from 1 mg/mL of mAb-1-3 in PBS was prepared by mixing those with the matrix solution (2/1, v/v). Acquisitions were performed in a positive linear mode and 600 shots were averaged for each spectrum. The average mAb-1-3 molecular weight was obtained from the mass of the [M+H]⁺ peak for the dilution set. Calibration settings corresponded to a close external mode using IgG1 (AB Sciex, USA). The number of 1-3 grafted per mAb was quantified using the molecular weight difference between the mAbs-1-3 and the unmodified mAbs, net masses added depending on the modification (about 272, 520 and 872 Dalton for 1, 2 and 3 respectively).

mAbs-1-3 stability. Stability of both Ts29.2-**1-3** and 35A7-**1-3** was assessed *in vitro* with TZ-5-FAM. After grafting TCO and PEG-TCO moieties mAbs were aliquoted and either frozen at -20 °C or keep at 4 °C. TCO/TZ interaction was assessed 7, 14 and 28 days after storage. 5 μ g of mAbs-**1-3** was added to Laemli 4X and heated to 95 °C for 5 min.

Samples were then loaded on SDS-PAGE acrylamide gels 4-15 % (Biorad, France). After migration, gels were entirely incubated 5 min in a solution containing 0.02 mM of TZ-5-FAM (10-14 equivalents with respect to TCO) and then rinsed under gentle shaking 15-20 min in deionized water before being imaging (G:Box, Ozyme, France). Gels were finally colored with Simplyblue™ SafeStain following the manufacturer's instructions (Thermofisher Scientific, France) and imaged with Chemidoc imager (Biorad, France). Quantification was made using both ImageJ and ImageLab software. A ratio between the fluorescence intensity and the amount of protein was made for the main mAb form to assess the reactivity of TCOs. In parallel, aliquots were analyzed by MALDI-TOF MS to determine the mean number of TCO grafted.

In vivo imaging settings

Optical images were acquired using a small animal imaging system (IVIS spectrum, Perkin Elmer, USA) and a dedicated software (Living Image 4.5 software, Perkin Elmer, USA). Acquisitions were performed using the following parameters. Bioluminescence: automatic exposure time; binning: medium; F/stop: 1; excitation filter: blocked; emission filter: open. NIR fluorescence for cyanine 5 imaging: automatic exposure time; binning: medium; F/stop: 2; excitation filter: 640 nm; emission filter: 680 nm. Images were analyzed using Living Image. Regions of interest (ROI) were drawn manually, and light was quantified as photons/seconds/cm²/steradian. Signal was represented using inverse rainbow color. Images were processed minimally as no smoothing was applied. All comparative images were threshold at the same MAX and MIN intensities.

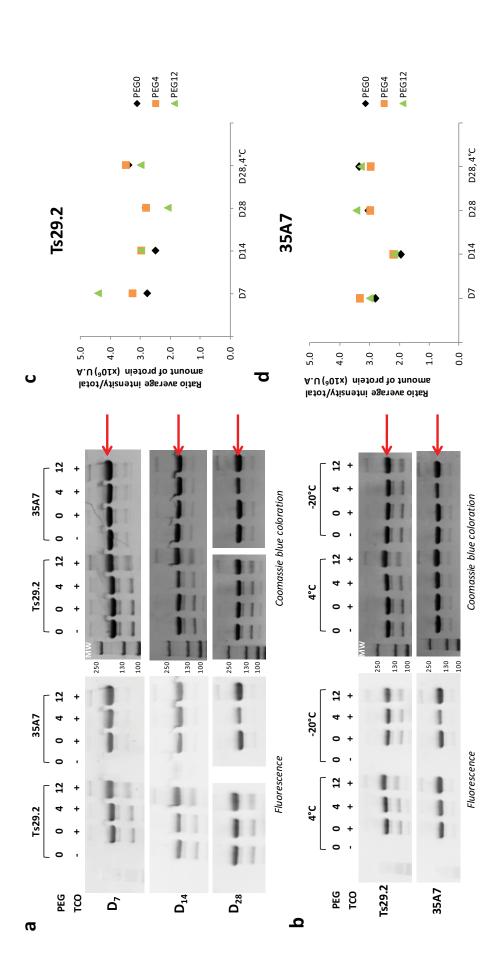
Confocal imaging settings

The same settings were applied for acquisitions of all quantified images. We used three lasers: 405 nm for DAPI imaging, 488 nm for FITC and 532 nm for Cyanine3. The same laser intensity was applied for all images in order to compare each mAb. Imaging resolution were 1024 x 1024 pixels. We applied a zoom = 1. An exception was made for co-localization images which are not quantified, images were in 520 x 520 pixels with a zoom of 2. An offset of -0.5 was applied for removing background noise with a gain of 950. Phase correction was equal to -36.92. Bidirectional imaging with Z-steps every 2 μ m were made on the whole cell layer. Three random fields per well were imaged and quantified in three or four independent experiments.

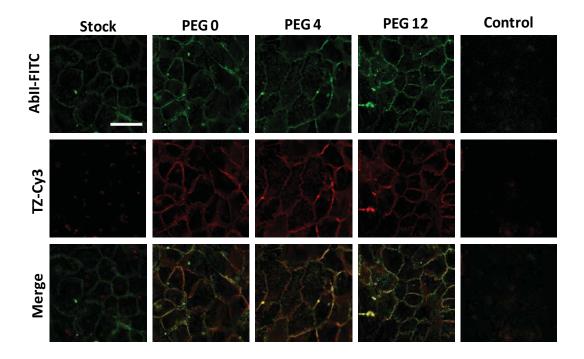
Supplementary Figures

| Number of equivalent of TCO added in the reaction | | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 30 | |
|---|---|---------|---------------|---------------|-----------|-----------|--------------|--|
| 35A7 PEG ₀ TCO | Mean yield (%) | 95 | 89 | 94 | 95 | 90 | 91 | |
| | Mean number of grafted TCO | 0 [0-0] | 0.6 [0-1] | 1.6 [1-2] | 2.2 [1-3] | 3.0 [2-4] | 3.7 [3-4] | |
| | IF imaging | 5.46 | 12.01 | 21.23 | 27.78 | 27.85 | 27.00 | |
| | Mean yield (%) | 95 | 95 | 100 | 94 | 98 | 93 | |
| 35A7 PEG ₄ TCO | Mean number of engrafted PEG ₄ -TCO | 0 [0-0] | 1.7 [1-2] | 3.7 [3-4] | 5.7 [5-7] | 7.6 [6-9] | 11.6 [10-13] | |
| | IF imaging | 3.53 | 26.45 | 41.07 | 30.04 | 27.29 | 20.15 | |
| | Mean yield (%) | 95 | 100 | 96 | 97 | 92 | 100 | |
| 35A7 PEG ₁₂ TCO | Mean number of engrafted PEG ₁₂ -TCO | 0 [0-0] | 1.2 [1.1-1.3] | 2.8 [2.5-3.1] | 6.3 [6-7] | 8.8 [8-9] | 13.0 [12-14] | |
| | IF imaging | 2.79 | 12.12 | 14.42 | 17.32 | 15.57 | 17.50 | |

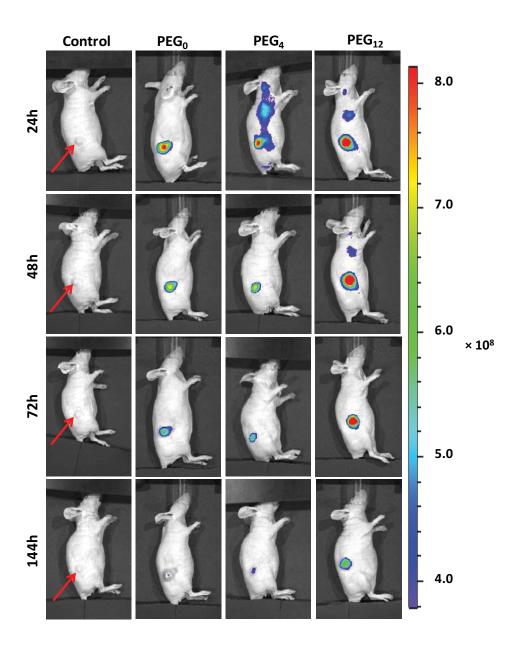
Supplementary Figure S1: Relation between the number of TCO grafted on 35A7mAbs and their functionality. Number of TCO grafted was determined by MALDI-TOF MS and is expressed as mean values [min-max], n=3 independent experiments. All IF imaging were made with the same settings. Yields correspond to the mAb recovery after grafting process. White numbers are mean fluorescence intensity quantified on the corresponding IF imaging. Scale bar: 50 μ m.



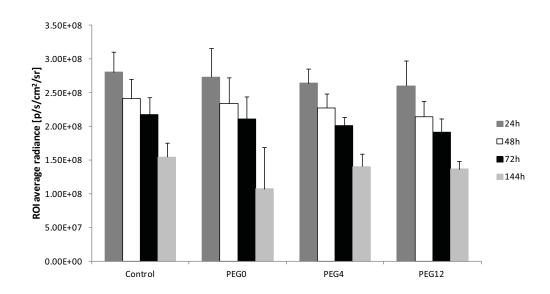
Supplementary Figure S2: Characterization of mAb-1-3 and assessment of their stability. (a) Gels' imaging in fluorescence and after Coomassie blue coloration of mAbs-1-3 after TZ-5-FAM labeling. Samples were stored at -20°C. Stability was assessed 7, 14 and 28 days after grafting. D28 are parts from two different gels. Full gels are provided in Supplementary Figure S11. (b) Comparison at day 28, between samples stored at -20°C and 4°C. Molecular weight (MW) expressed in kDa. (c-d) Quantification of the average intensity of fluorescence reported on the total amount of protein. Quantification was made on the major band only (red arrows).



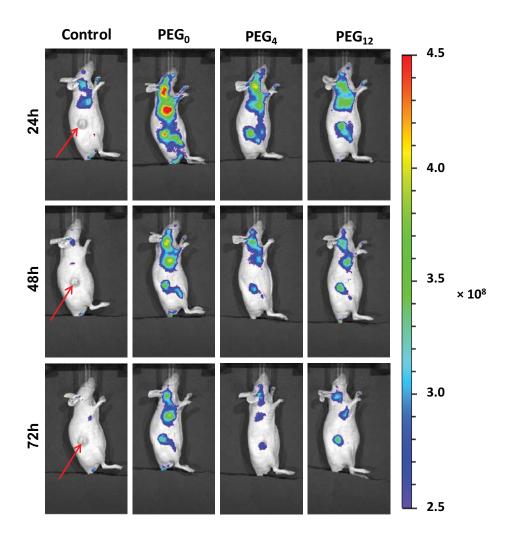
Supplementary Figure S3: Reliability of 35A7-1-3 to recognize their target and assessment of their interaction with TZ-Cy3 using confocal microscopy. A431-CEA-Luc cells first incubated with $10 \mu g/mL$ of 35A7 Stock (without TCO), 35A7-1, 35A7-2 or 35A7-3 and then incubated with both 1/500 AbII-FITC_(495-519nm) and 0.02 mM TZ-Cy3_(550-570 nm). Control condition corresponds to incubation without 35A7. Green signal correspond to AbII-FITC labeling and red signal to TZ-Cy3 labeling. Green and red images were merged to show signal co-localization. Scale bar: 30 μm .



Supplementary Figure S4: *In vivo* direct targeting of Ts29.2-1-3 after fluorescent TZ-Cy5 labeling on mice bearing HT29 colon xenograft. TZ-Cy5 was injected simultaneously with modified Ts29.2 after a preliminary incubation of 30 min in tube. Figure represents *in vivo* imaging 24 h, 48 h, 72 h and 144 h after TZ-Cy5 injection. The red arrows show the location of the tumor.



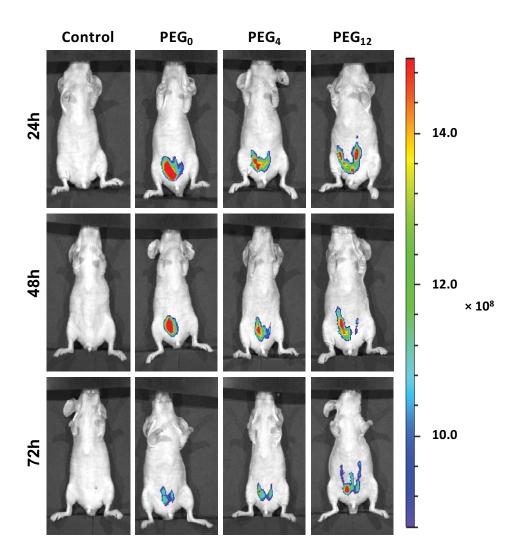
Supplementary Figure S5: *In vivo* quantification of signal located in lymph nodes in pretargeting groups in HT29 xenograft model. Graph represents ROI average radiance ± SEM (n=3). Quantification made on *in vivo* imaging at 24 h, 48 h, 72 h and 144 h post TZ-Cy5 injection.



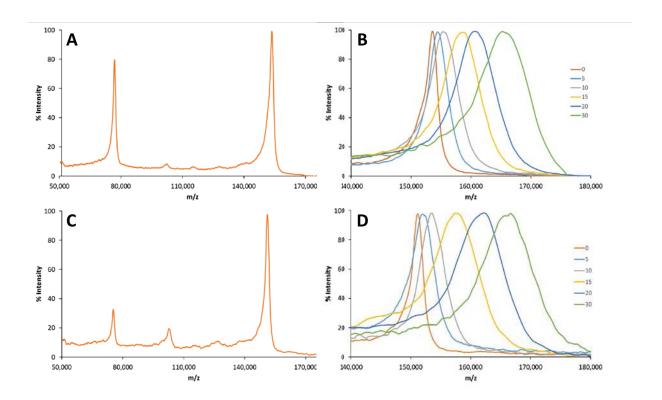
Supplementary Figure S6: *In vivo* pretargeting of Ts29.2-1-3 after fluorescent TZ-Cy5 labeling on mice bearing HT29 colon xenograft. TZ-Cy5 was injected 24 h after modified Ts29.2. Pretargeting with Ts29.2 without TCO (Control) Ts29.2-1 (PEG₀) Ts29.2-2 (PEG₄) or Ts29.2-3 (PEG₁₂). Figure represents *in vivo* imaging 24 h, 48 h and 72 h after TZ-Cy5 injection. Imaging at 144 h post TZ-Cy5 injection were not shown here as signal was quantifiable but not visible when all images were treated at the same threshold. Red arrows show the location of the tumor.

| Condition | Mouse - | Region number | | | | | | | | | | | | | T-1-I DCI |
|-------------------|---------|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|-------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | - Total PCI |
| TCO 0 | Mouse 1 | 3 | 0 | 1 | 3 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 |
| | Mouse 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 |
| | Mouse 3 | 0 | 0 | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 |
| | Mouse 1 | 1 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| PEG ₀ | Mouse 2 | 2 | 0 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| | Mouse 3 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| | Mouse 1 | 1 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| PEG ₄ | Mouse 2 | 3 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| | Mouse 3 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| | Mouse 1 | 0 | 0 | 4 | 1 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 |
| PEG ₁₂ | Mouse 2 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| | Mouse 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 |

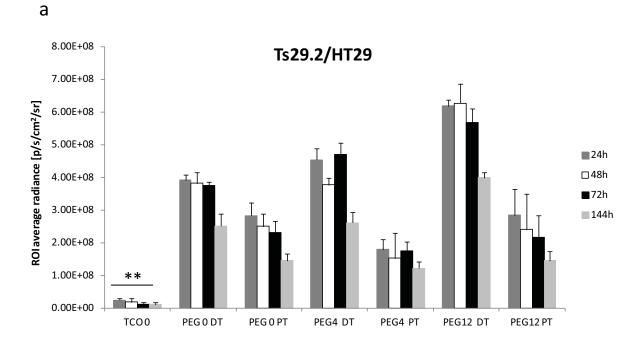
Supplementary Figure S7: Peritoneal carcinomatosis index (PCI). PCI was determined during mice necropsy, 17 days after engraftment. Each peritoneal region was attributed a score from 0 to 3. Scores were determined according to the method of Sugarbaker³ adapted on rodent by Klaver et al. ⁴.

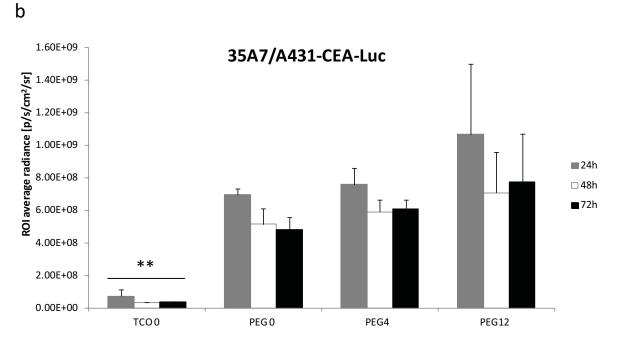


Supplementary Figure S8: Assessment of 35A7-1-3 pretargeted PC tumors after TZ-Cy5 labeling. Pretargeting with 35A7 without TCO (Control), 35A7-1 (PEG₀), 35A7-2 (PEG₄) or 35A7-3 (PEG₁₂). Figure represents fluorescent *in vivo* imaging 24 h, 48 h and 72 h after IP injection of TZ-Cy5.

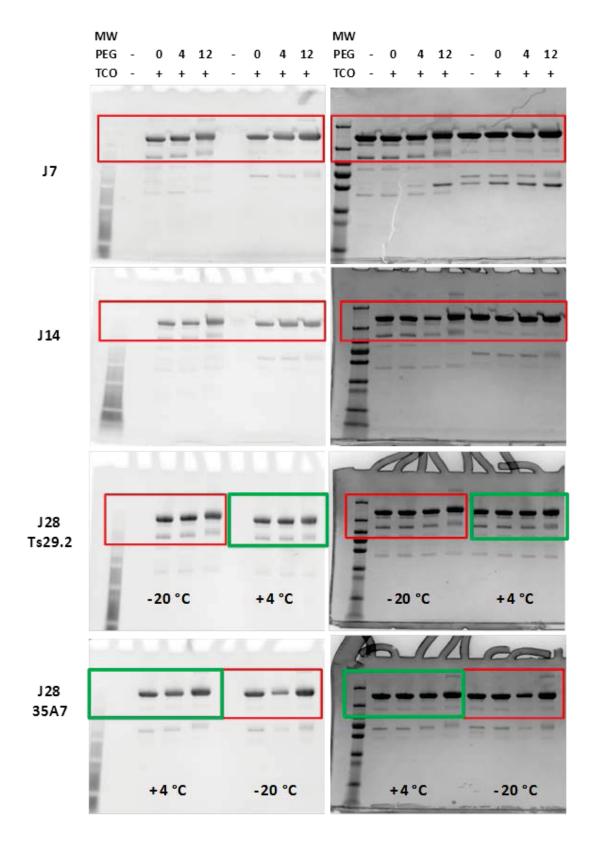


Supplementary Figure S9: MALDI-TOF mass spectrometry of 35A7 and Ts29.2 mAbs modified using different ratios of **3**. (a) Representative spectrum of the unmodified 35A7 mAb. Single protonated $[M+H]^+$ peak at $\approx 153,000$ Dalton, double charged peak at $\approx 76,500$ Dalton. (b) Merged representative spectra of 35A7-**3** after addition of 0 to 30 equivalents of **3**. (c) Representative spectrum of the unmodified Ts29.2 mAb. Single protonated $[M+H]^+$ peak at $\approx 151,000$ Dalton, double charged peak at $\approx 75,500$ Dalton. (d) Merged representative spectra of Ts29.2-**3** after addition of 0 to 30 equivalents of **3**. The number of **3** moieties bound to mAbs was determined using the shift of mass (about 872 Dalton for each **3** added).





Supplementary Figure S10: *In vivo* **pretargeting assessments.** Graphs presenting ROI average radiance of (a) Ts29.2-**1-3** and (b) 35A7-**1-3**. DT = Direct targeting; PT = pretargeting; TCO 0 = processed control mAb containing 0 TCO. Values are expressed as mean \pm SEM (n=3). Statistical analysis was made using one-way ANOVA. ** P < 0.0001: TCO 0 (all times) vs all groups.



Supplementary Figure S11: **Characterization of mAbs-1-3**. Full gels from Supplementary Figure S2. Refer to Supplementary Figure S2 legend. Red (- 20 °C) and green (+ 4 °C) squares represent the cropped regions.

References:

- 1. Rossin, R. et al. *In vivo* chemistry for pretargeted tumor imaging in live mice. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 3375–3378 (2010).
- 2. Rossin, R. et al. Highly reactive *trans*-cyclooctene tags with improved stability for Diels–Alder chemistry in living systems. *Bioconjugate Chemistry* **24**, 1210–1217 (2013).
- 3. Jacquet, P. & Sugarbaker, P. H. *Peritoneal carcinomatosis: principles of management* (ed. Sugarbaker, P. H.) **82**, 359–374 (Springer US, 1996).
- 4. Klaver, Y. L. B. et al. Intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy after cytoreductive surgery for peritoneal carcinomatosis in an experimental model. *British Journal of Surgery* **97**, 1874–1880 (2010).