



HAL
open science

De l'ifosfamide au géranyloxy-ifosfamide : pharmacomodulation pour cibler et moduler l'immunité

Julia Delahousse

► To cite this version:

Julia Delahousse. De l'ifosfamide au géranyloxy-ifosfamide : pharmacomodulation pour cibler et moduler l'immunité. Sciences pharmaceutiques. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS535 . tel-03934617

HAL Id: tel-03934617

<https://theses.hal.science/tel-03934617v1>

Submitted on 11 Jan 2023

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.

De l'ifosfamide au géranyloxy-ifosfamide : pharmacomodulation pour cibler et moduler l'immunité

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université PARIS-SUD 11
UMR8203 Vectorologie et thérapeutiques anticancéreuses

École doctorale n°569
Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué (ITFA)
Pôle : Pharmacotechnie et Biopharmacie

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le lundi 9 décembre 2019, par

Julia Delahousse

Composition du Jury :

Marc Pallardy Doyen Faculté de Pharmacie de l'Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay	Président
Joseph Ciccolini Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
Magali Terme Maître de Conférences des Universités, Université Paris-Descartes	Rapporteur
Elise Lepeltier Maître de Conférences des Universités, Université d'Angers	Examineur
Nathalie Chaput Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay	Examineur
Jean-Luc Perfettini Directeur de recherche,INSERM	Examineur
Joël Vacus Docteur, DrugAbilis®	Examineur
Angelo Paci Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Le premier remerciement s'adresse à toi Angelo. Angelo, ton projet « Nano Immuno X-Oxaza » m'a tout de suite captivée, malgré les hauts et les bas de la recherche, ce sujet est passionnant et mérite d'être encore plus approfondi pour – je l'espère – mener à un nouveau médicament anticancéreux.

Je remercie le Pr Pallardy pour son accompagnement tout au long de mon cursus d'internat en tant que tuteur pédagogique et d'avoir accepté d'être le Président de mon jury de thèse (la boucle est bouclée !).

Je remercie grandement le Dr Terme et le Pr Ciccolini d'avoir accepté ce lourd travail que représente la relecture et critique de mon travail de thèse. Joseph, je suis ravie de notre collaboration qu'elle soit dans un contexte de recherche, de pharmacologie, de modélisation busulfan mais également autour d'un verre au Mama Shelter de Marseille.

Je remercie le Pr Chaput, Dr Perfettini, le Dr Lepeltier et le Dr Vacus d'avoir accepté de participer au jury de ma thèse. Nathalie, je te remercie pour ton aide très précieuse tout au long de ces manip immuno et de ta disponibilité. Merci Jean-Luc d'avoir apporté une nouvelle vision sur le potentiel immuno des X-Oxaza et de tes conseils avisés. Joël, un merci chaleureux tant pour ton apport galénique sur ce projet que pour tes conseils en général.

Je remercie l'équipe de chimie, Dr Martens, Dr Rivard et Patrice pour leur contribution indispensable à l'avancement de ce projet de thèse.

Un grand merci à mes collègues du service de pharmacologie, Sophie, Atmane, Lionel, Clémence, David, Louis qui m'ont accompagnée, pour certains, tout au long de ce travail de thèse et facilité la double vie « pharmacologue-doctorante ».

Un énorme merci à Charles, qui m'a énormément appris (je ne sais pas ce que j'aurai fait sans toi...!), et à Constance, toujours là pour m'aider ou pour sauver mes cellules d'une mort certaine !

Merci à Audrey. Merci à Léa et Clotilde, collègues et amies IPR, qui connaissent cette double casquette et avec qui nous avons pu partager nos réussites et nos déboires.

Maintenant, quelques remerciements dirigés vers les personnes extérieures à Gustave Roussy qui m'ont entourée pendant ces années de thèse :

Un énorme merci pour, mon futur mari, Martin, qui est venu me chercher en voiture jusqu'à tard le soir à Gustave Roussy ou qui m'a accompagné les jours fériés et weekend. Merci d'avoir supporté mes coups de stress et d'avoir réussi à me les faire surmonter.

Merci à mes proches, toujours présents, papa, maman, Fanny et aux copines, Loulou, Anaïs, Karine, LN.

Et le dernier remerciement est bien évidemment pour toi Daphné. Commencer la journée avec toi par une tartine (des tartines) de beurre (avec ajout de sel parce que sinon ce n'est pas bon) accompagnée(s) du café filtre made in salle de garde, est incontestablement l'assurance de bien commencer la journée. Nous avons discuté, débattu, rigolé, sur nos amours, nos envies, nos emmerdes, nous avons partagé nos réussites et nos échecs tant scientifiques qu'émotionnels. Un grand merci pour ces moments.

*« Le bonheur n'est pas au sommet de la montagne mais dans la façon de la gravir. »
Confucius*

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES.....	12
LISTE DES TABLES.....	14
EQUATION	14
ABREVIATIONS.....	16
PARTIE I : INTRODUCTION ET OBJECTIFS.....	20
1. Les Oxazaphosphorines.....	22
1.1. Historique et mécanismes d'action.....	22
1.2. Indications et posologies.....	27
1.3. Pharmacocinétique et Métabolisme.....	28
1.4. Toxicités.....	32
1.5. Nécessité d'optimiser le traitement par l'ifosfamide.....	37
2. Optimisation de l'index thérapeutique : Pharmacomodulation et Immunomodulation.....	39
2.1. Pharmacomodulation : pré-activation et nanomédecine.....	39
2.1.1 Application aux Oxazaphosphorines.....	39
2.1.1.1. Modulations pharmacologiques.....	39
2.1.1.1.1. Modulation de l'activité des cytochromes P450.....	39
2.1.1.1.2. Modulations des voies de détoxification.....	40
2.1.1.2. Pharmacomodulation chimique.....	41
2.1.1.2.1. Historique.....	41
2.1.1.2.2. Les dérivés pré-activés X-IFO.....	43
2.1.2. Revue de la littérature « Prodrugs as drug delivery system in oncology ».....	45
2.2. Immunomodulation.....	46
2.2.1. Immunologie : acteurs et polarisation.....	46
2.2.2. L'immunologie en oncologie.....	47
2.2.2.1. Immunoediting.....	47
2.2.2.2. Immunogénicité de la tumeur.....	49

2.2.2.3. Immunothérapie	50
2.2.3. Chimiothérapie : agent cytotoxique et immunomodulateur	52
2.2.3.1. Rationnel	52
2.2.3.2. Agents cytotoxiques immunomodulateurs autres que les Oxazaphosphorines... 53	
2.2.3.3. Les Oxazaphosphorines : agents immunomodulateurs	56
3. Objectifs de la thèse	60
Partie II : Pharmacomodulation de l'ifosfamide.....	64
1. Publication 1 "Poly-isoprenylated ifosfamide analogs: Preactivated antitumor agents as free formulation or nanoassemblies"	66
2. Mise en perspective	69
2.1. Choix du géraniole	69
2.2. Profil pharmacocinétique et biodistribution tissulaire	70
2.3. Efficacité <i>in vivo</i> du G-IFO.....	74
3. Optimisation galénique	77
3.1. Optimisation de la formulation des nano-assemblages.....	77
3.1.1. Matériels et Méthodes.....	77
3.1.2. Facteurs fixés et facteurs variables de la formulation par nano-précipitation.....	80
3.1.3. Nano-émulsions ?.....	87
3.2. Optimisation de la formulation du G-IFO sous forme libre.....	88
3.2.1. Nouvelle formulation	88
3.2.2. Etude de stabilité de la nouvelle formulation galénique	93
3.2.3. Comparaison de la tolérance veineuse entre les deux formulations.....	94
3.2.4. Etude de l'efficacité antitumorale avec le véhicule DrugAbilis®	95
4. Discussion et conclusion de la partie II « Pharmacomodulation de l'IFO »	97
PARTIE III : IMMUNOMODULATION	101
1. Introduction de la publication 2	103
2. Publication 2 "The two sides of Oxazaphosphorines: Dose-dependent tuning between immune and cytotoxic effects, a gate for immune checkpoint blockers synergy"	106

3. Compléments et discussion de l'article.....	130
3.1. Compléments de l'expérimentation I : Preuve de concept d'immunomodulation	130
3.2. Compléments de l'expérimentation II : Efficacité antitumorale et détermination de la dose immunomodulatrice de l'IFO et G-IFO	134
3.2.1. Compartiment lymphoïde	135
3.2.2. Compartiment myéloïde	138
4. Discussion et conclusion de la partie III « Immunomodulation »	144
Conclusion générale	150
BIBLIOGRAPHIE.....	153
ANNEXE	167
Liste des publications	167
Liste des brevets.....	167
Liste des communications affichées.....	167
Liste des communications orales	167

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure chimique du sulfure de bis-2-chloroéthyle	22
Figure 2. Structure chimique de la méchloréthamine	23
Figure 3. Structure chimique du chlorambucil	24
Figure 4. Structure chimique de la bendamustine	24
Figure 5. Structure chimique du melphalan	25
Figure 6. Structure chimique des Oxazaphosphorines.....	26
Figure 7. Mécanisme d'action des moutardes azotées.....	27
Figure 8. Métabolisme et détoxification de l'IFO.....	31
Figure 9. Principales caractéristiques différenciant le CPM et l'IFO	37
Figure 10. Structure chimique du 4-hydropéroxy-ifosfamide.....	41
Figure 11. Structure chimique du mafosfamide.....	42
Figure 12. Exemples de substitutions en position 5 ou 6.....	42
Figure 13. Structure chimique du 7,9-diméthyle-ifosfamide	43
Figure 14. Structure chimique des X-Oxaza	44
Figure 15. Stratégies de pharmacomodulation des Oxaza.....	45
Figure 16. Immunoediting	48
Figure 17. Distribution des différents acteurs immunitaires intratumoraux selon les cancers.....	51
Figure 18. Comparaison entre CPM et IFO sur leur activité en fonction de la dose	61
Figure 19. Objectifs de la thèse	62
Figure 20. Protocole de l'étude PK et biodistribution.....	71
Figure 21. Exposition plasmatique de l'IFO, G-IFO et F-IFO et de leurs métabolites.....	72
Figure 22. Biodistribution tissulaire de l'IFO, G-IFO et F-IFO et de leurs métabolites	73
Figure 23. Protocole de l'étude d'efficacité après injections répétées de G-IFO	74
Figure 24. Efficacité antitumorale du G-IFO après administration IV	75
Figure 25. Efficacité antitumorale du G-IFO après administration IP	76
Figure 26. Protocole de nanoprécipitation	77
Figure 27. Appareil de mesure Brookhaven® et principe de la DDL	78
Figure 28. Corrélacion entre le mouvement brownien et la fluctuation d'intensité	78
Figure 29. Structure chimique du A) Tween80 ou Polysorbate 80 et B) Pluronic® F-68 (poloxamère 188) et F-127 (poloxamère 407).....	81
Figure 30. Exemple d'images MET de NA de G-IFO à 4 mg/mL avec un surfactant.....	82
Figure 31. A) NanoAssemblr™. B) Principe de la microfluidique.....	83
Figure 32. Exemple d'images MET de NA de G-IFO à 4 mg/mL.....	84

Figure 33. Synthèse du G-PEG2000.....	86
Figure 34. Emulsion spontanée.	88
Figure 35. A) Analyse macroscopique et B) microscopique de solutions glucosées Tween 80 2,5% (m/v) de G-IFO.....	90
Figure 36. A) Analyse macroscopique et B) microscopique de solutions glucosées Cremophor EL à 2,5% (m/v), Solutol HS15 à 2,5% (m/v) et HPBCD à 10%(m/v) de G-IFO.	91
Figure 37. Structure de la β -cyclodextrine (n = 1 : HPBCD) et principe de l'interaction avec le médicament lipophile.....	92
Figure 38. Taux de recouvrement en G-IFO lors de l'étude de stabilité en solution HPBCD 14% à température ambiante.....	93
Figure 39. Comparaison de la tolérance veineuse entre A) l'ancien (véhicule DMSO/Tween80/NaCl0,9%) et B) le nouveau (HPBCD 14%) véhicule du G-IFO.....	94
Figure 40. Efficacité antitumorale du G-IFO formulé avec le véhicule HPBCD	97
Figure 41. Avancement du projet : objectif 1 et 2	99
Figure 42. Planification du protocole démontrant les propriétés immunomodulatrices de l'IFO et de son analogue pré-activé, le G-IFO	103
Figure 43. Détail de l'expérimentation n° I	104
Figure 44. Méthodes d'étude pour démontrer le potentiel immunomodulateur de l'IFO et du G-IFO	104
Figure 45. Complément de l'expérimentation II	105
Figure 46. Effet dose-dépendant de l'IFO sur le nombre de LB et LT chez des souris naïves de tumeur.	131
Figure 47. Effet dose-dépendant de l'IFO sur la proportion de LB et LT chez des souris naïves de tumeur.....	132
Figure 48. Profil cytokinique après une injection de CPM ou IFO.....	133
Figure 49. Effet des Oxaza et du G-IFO sur le nombre de cellules lymphoïdes intratumorales.....	136
Figure 50. Effet des Oxaza et du G-IFO sur la proportion des populations de cellules lymphoïdes intratumorales.....	137
Figure 51. Stratégie de <i>gating</i> panel myéloïde.	139
Figure 52. Effet des Oxaza et du G-IFO sur le nombre de cellules myéloïdes spléniques.....	140
Figure 53. Effet des Oxaza et du G-IFO sur la proportion de cellules myéloïdes spléniques.....	141
Figure 54. Effet des Oxaza et du G-IFO sur le nombre de cellules myéloïdes intratumorales.....	142
Figure 55. Effet des Oxaza et du G-IFO sur la proportion de cellules myéloïdes intratumorales.....	143
Figure 56. Avancement du projet : Objectif 3.....	148
Figure 57. Ifosfamide et X-Ifosfamide : double agent.....	151

LISTE DES TABLES

Tableau 1. Indications des Oxazaphosphorines.	27
Tableau 2. Posologies conventionnelles des Oxazaphosphorines.	28
Tableau 3. Principaux paramètres pharmacocinétiques des Oxazaphosphorines.....	31
Tableau 4. Toxicités induites par l'ifosfamide	35
Tableau 5. Toxicités induites par le cyclophosphamide.....	36
Tableau 6. Tableau récapitulatif des principales chimiothérapies immunomodulatrices.	55
Tableau 7. Confirmation du profil pharmacocinétique du G-IFO et de ses métabolites suite une administration unique en IV à la dose eq. 25 mg/kg	71
Tableau 8. Description des anticorps des panels lymphoïde et myéloïde déterminés par cytométrie en flux.....	135

EQUATION

Équation 1. Equation de Stokes-Einstein.....	79
--	----

ABREVIATIONS

5-FU : 5-Fluorouracile

ACR : Acroléine

ADH : Alcool déshydrogénase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALDH : Aldéhyde déshydrogénase

AMM : Autorisation de mise sur le marché

AUC : *Area under the curve* (Aire sous la courbe)

CAA : Chloroacétaldéhyde

CD : *Cluster of differentiation*

CPNPC : Cancer du poumon non à petites cellules

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellule présentatrice de l'antigène

CPM : Cyclophosphamide

CSF1R : *Colony stimulating factor 1 receptor*

CTLA-4 : *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4*

CYP : Cytochrome P450

DC : *Dendritic cell* (cellule dendritique)

DDL : Diffusion dynamique de la lumière

DDR : *DNA damage response* (réponse aux dommages de l'ADN)

DDS : *Drug delivery systems*

DiMe-IFO : Diméthyl-ifosfamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EMA : *European medicine agency*

EPR : *Enhanced permeability retention*

eq. X mg/kg : équivalent à X mg/kg d'ifosfamide

SEM : *Standard error of the mean* (erreur standard de la moyenne)

FDA : *Food and drug administration*

F-IFO : Farnésyloxy-ifosfamide

GDEPT : *Gene directed-enzyme prodrug therapy*

G-IFO : Géranyloxy-ifosfamide

GSH : Glutathion

HO-CPM : 4-hydroxy-cyclophosphamide

HO-IFO : 4-hydroxy-ifosfamide

HOO-IFO : 4-hydroxyperoxy-ifosfamide
HPBCD: *Hydroxypropyl beta cyclodextrin*
IC : Immunocompétente
ICB : *Immune checkpoint blocker* (inhibiteur des points de contrôle immunitaires)
IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%
ID : Immunodéprimé
IFN γ : Interféron γ
IFO : Ifosfamide
IL : Interleukine
IM : Intramusculaire
iNOS : *inducible nitric oxide synthase*
IM : Intramusculaire
IP : Intrapéritonéal
IV : Intraveineux
IPM : Moutarde isophosphoramidée
Kcps : *kilocounts per second* (coups par seconde * 10³)
LB : Lymphocyte B
LCR : Liquide céphalo-rachidien
LLC : Leucémie lymphoïde chronique
Lpp : Liaisons aux protéines plasmatiques
LT : Lymphocyte T
MDSC: *Myeloid-derived suppressor cell*
M-MDSC: *Monocyte myeloid-derived suppressor cell*
MeO-IFO : Méthoxy-ifosfamide
MET : Microscopie électronique à transmission
NA : Nano-assemblage
N^x-DCE-CPM : N^x-dechloroéthyl-cyclophosphamide
N^x-DCE-IFO : N^x-dechloroéthyl-ifosfamide
NK : *Natural killer*
NO : *Nitric oxide* (Oxyde nitrique ou monoxide d'azote)
OCT2 : *Organic cation transporter 2*
Oxaza : Oxazaphosphorines
PD1 : *Programmed cell death-1*
PDI : *Polydispersity index* (Indice de polydispersité)
PD-Lx : *Programmed death-ligand x*

PEG : Polyéthylène glycol

PK : Pharmacocinétique

PMN-MDSC: *Polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cell*

RCP : Résumé caractéristique d'un produit

SAXS : *Small angle X-rays scattering*

SI : Système immunitaire

STAT : *Signal transducer and activator of transcription*

SQ-IFO : Squalénoxy-ifosfamide

T_{1/2} : Demi-vie d'élimination

TAM : *tumor-associated macrophages*

Th : Lymphocyte T *helper* ou auxiliaire

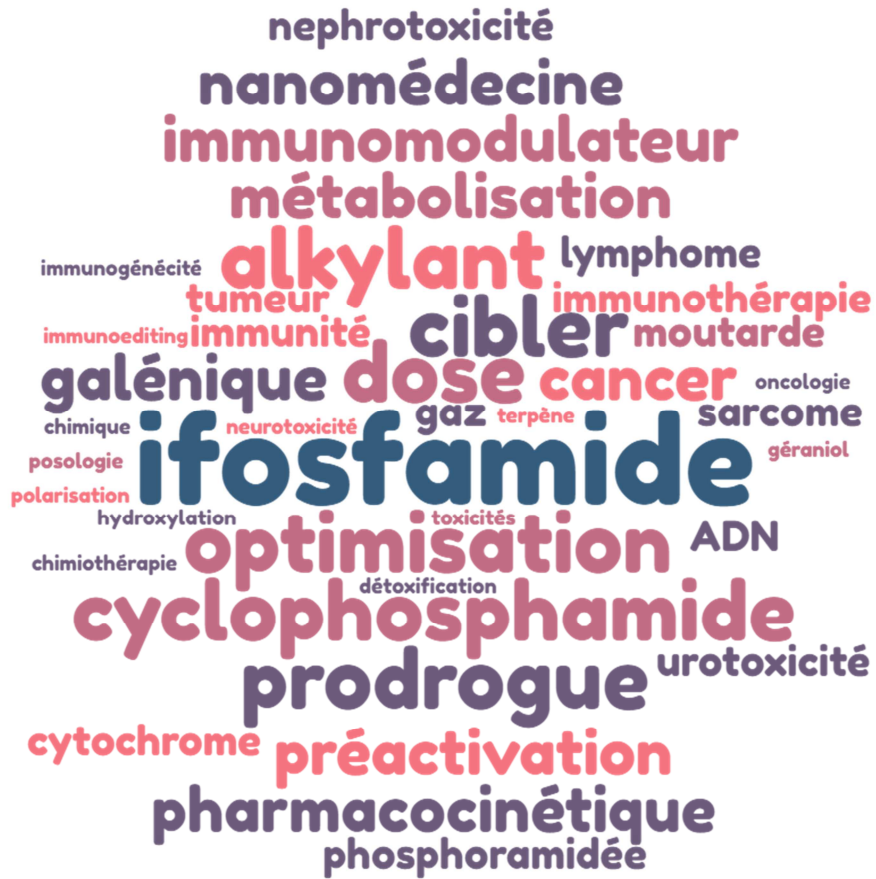
TLR : *Toll like receptor*

TNF α : *Tumor Necrosis Factor α*

Treg : Lymphocyte T régulateur

Vd : Volume de distribution

PARTIE I : INTRODUCTION ET OBJECTIFS



1. Les Oxazaphosphorines

1.1. Historique et mécanismes d'action

Il existe un large éventail de traitements anticancéreux dont les alkylants de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Les agents alkylants sont des composés fortement électrophiles qui vont réagir avec des molécules possédant des radicaux nucléophiles tels que le groupement $-NH_2$ retrouvé dans les acides nucléiques. Ils vont, par conséquent, former des liaisons covalentes avec les nucléotides de l'ADN et empêcher ainsi la réplication. Cette classe pharmacologique comprend de nombreuses molécules couramment utilisées en thérapeutique : les nitroso-urées dont la lomustine, les dérivés de platine dont le cisplatine, oxaliplatine et carboplatine, les triazènes dont la dacarbazine, les sulfonoxy-alcanes dont le busulfan, les aziridines dont le thiotépa, les moutardes azotées dont le melphalan, le chlorambucil et les oxazaphosphorines. Ces dernières sont principalement représentées par le cyclophosphamide (CPM) et son isomère de position l'ifosfamide (IFO).

Les moutardes azotées sont des dérivés organiques de synthèse portant un groupement $-CH_2-CH_2-Cl$. Ce groupement leur confère la propriété électrophile nécessaire à la formation d'une liaison covalente avec l'ADN. La découverte de cette sous-famille antitumorale, à la fin du XIX^{ème} siècle, fait suite à l'utilisation du gaz de combat dit « gaz moutarde ». En effet, le sulfure de bis-2-chloroéthyle (Figure 1) fut employé comme gaz de combat pour la première fois par l'armée allemande en 1917 près d'Ypres en Belgique. Ce sont historiquement les premières molécules utilisées dans la lutte contre le cancer. Le nom « moutarde » est lié à sa couleur caractéristique et à son odeur irritante.

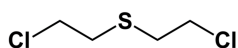


Figure 1. Structure chimique du sulfure de bis-2-chloroéthyle

Les soldats victimes du « gaz moutarde » présentaient des manifestations cliniques de type brûlures, irritation des yeux et vomissements puis le gaz entraînait des dommages plus profonds notamment

au niveau pulmonaire. Les médecins ont observé que le « gaz moutarde » entraînait des effets au niveau de la moelle osseuse caractérisés principalement par des leucopénies voire des aplasies médullaires se traduisant, chez les soldats gazés, par de nombreux décès dû à des infections ou des hémorragies. Cette spécificité de lésions a permis d'émettre des hypothèses sur l'utilisation du gaz de combat dans le traitement d'hémopathies malignes. Cependant le sulfure de bis-2-chloroéthyle reste un composé hautement toxique et au vue de sa faible solubilité dans l'eau, des modifications chimiques étaient nécessaires pour en faire un agent thérapeutique. C'est ainsi que dans les années 1940, deux jeunes scientifiques américains, Alfred Gilman et Louis Goodman, synthétisèrent la méchloréthamine (Figure 2) en remplaçant l'atome de soufre par un azote méthylé. C'est ce groupe fonctionnel, bis(2-chloroéthyl)amine qui sera à la base de toutes les moutardes azotées.

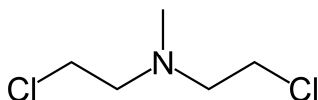


Figure 2. Structure chimique de la méchloréthamine

Des études menées d'abord chez l'animal puis chez l'homme ont révélé l'effet cytotoxique de la méchloréthamine (ou chlorméthine) (1). Elle est la première moutarde à l'azote à être utilisée en thérapeutique dans le traitement d'hémopathies malignes telles que la maladie de Hodgkin et les lymphosarcomes. Cependant la molécule est très instable chimiquement et ne reste active que quelques minutes après une injection intraveineuse car la formation de l'intermédiaire aziridinium est particulièrement rapide ; cette propriété a pour conséquence de graves effets secondaires qui limitent son utilisation. A l'heure actuelle, la méchloréthamine est utilisée en administration topique dans les pathologies telles que le mycosis fongoïdes (type de lymphome cutanée à cellules T) et le psoriasis. Des optimisations chimiques de la moutarde à l'azote ont été élaborées par la suite afin d'améliorer la stabilité ainsi que la tolérance.

Le chlorambucil (Chloraminophene®)

Dans les années 50, Everett *et al.* ont synthétisé un analogue de la chlorméthine en greffant le groupe actif sur un groupement aromatique ainsi qu'une chaîne butyrique (2) (Figure 3).

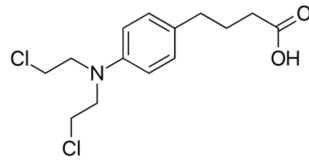


Figure 3. Structure chimique du chlorambucil

Le groupement aromatique rend le doublet de l'azote moins disponible et par conséquent diminue la vitesse de formation de l'intermédiaire aziridinium. L'ajout de l'acide butyrique permet d'améliorer la solubilité du composé dans l'eau.

Le chlorambucil a obtenu sa première autorisation de mise sur le marché (AMM) en 1956 dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Il est encore utilisé actuellement dans la leucémie lymphoïde chronique, les lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens et dans certains types de glomérulonéphrites chroniques primitives (3).

La bendamustine (Levact®)

La bendamustine a été synthétisée pour la première fois en 1963 par Ozegowski *et al.* (4) en modifiant le chlorambucil par remplacement du benzène par un cycle benzimidazole (Figure 4) générant ainsi un analogue de base purique de l'ADN. L'activité alkylante couplée à l'analogie nucléotidique de la bendamustine permet une interaction plus forte avec l'ADN se traduisant par une meilleure efficacité que le chlorambucil et dans certains cas une efficacité contre les cancers résistants aux dérivés de moutardes azotées (5). Elle est actuellement indiquée dans le traitement de la LLC, du lymphome non hodgkinien et du myélome multiple (6).

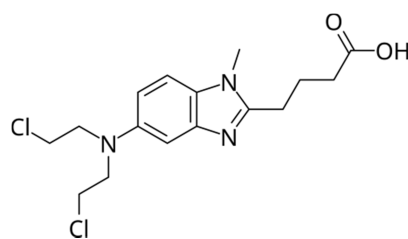


Figure 4. Structure chimique de la bendamustine

Le melphalan (Alkeran®)

Le melphalan a été synthétisé pour la première fois par Berget et Stock en 1953 (Figure 5), à partir de la L-Phénylalanine, améliorant ainsi le transport de la molécule vers les cellules tumorales grâce aux transporteurs d'acide aminé. Le melphalan est couramment utilisé en clinique notamment dans le

traitement du myélome multiple, les lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens, les leucémies aiguës lymphoblastique et myéloblastique, le neuroblastome de l'enfant, l'adénocarcinome ovarien et mammaire (7).

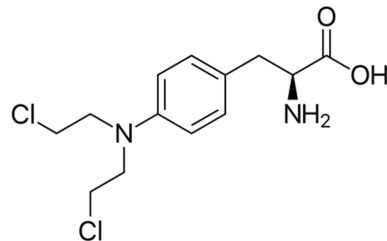


Figure 5. Structure chimique du melphalan

Les oxazaphosphorines : cyclophosphamide (Endoxan®) et ifosfamide (Holoxan®)

A la fin des années 50, Brock *et al.* introduisent une liaison phosphore-azote entre le groupement bis(2-chloroéthyl)amine et un cycle oxazaphosphorine dans le but d'éviter l'ionisation directe du groupement réactif $-CH_2-CH_2-Cl$; ils synthétisent donc une prodrogue de la moutarde azotée, appelée CPM. A la différence de dérivés du gaz moutarde cités précédemment, cette prodrogue nécessite une métabolisation afin de devenir active et d'exercer son effet alkylant. En effet ce groupement phosphoramidate est très électroattracteur et empêche la formation de l'intermédiaire aziridinium. Une métabolisation oxydative grâce notamment aux cytochromes P450 (CYP) fournit un doublet non lié qui va entraîner l'ouverture du cycle oxazaphosphorine permettant la libération du groupement actif. Le CPM est la huitième chimiothérapie à recevoir l'AMM par la Food and Drug Administration (FDA) (produit par les laboratoires Asta Medica et Baxter Oncology sous le nom d'Endoxan®). Cependant le CPM induit encore des effets myélosuppresseifs importants. C'est pourquoi en 1965, l'IFO, isomère de position du CPM, est synthétisé afin de limiter la myélosuppression induite par le CPM. L'IFO et le CPM diffèrent seulement par la localisation des chaînes chloroéthyles. L'IFO possède une chaîne chloroéthyle sur chacun des azotes, l'un endocyclique et l'autre exocyclique alors que les deux chaînes chloroéthyles du CPM sont sur l'azote exocyclique (Figure 6). Bien que ces deux molécules soient proches chimiquement, elles se différencient par leurs propriétés pharmacocinétiques et leurs profils d'activité (antitumorale et toxicité). D'un point de vue tolérance, une étude de comparaison entre IFO et CPM dans le traitement des sarcomes des tissus mous a montré que les patients ayant reçu de l'IFO présentaient moins de leucopénies que ceux ayant reçues du CPM (8). Concernant l'efficacité, cette même étude de phase II a conclu à la supériorité de l'IFO dans ce type de cancers (8). La première commercialisation de l'IFO a eu lieu aux Etats-Unis à la fin des années 1970, sous le nom de spécialité

Holoxan®. En France la date de la première AMM pour l'IFO est 1994. De plus, des tests de mutagénèse (tests d'Ames) ont indiqué que les métabolites de l'IFO seraient moins mutagènes que ceux du CPM (9).

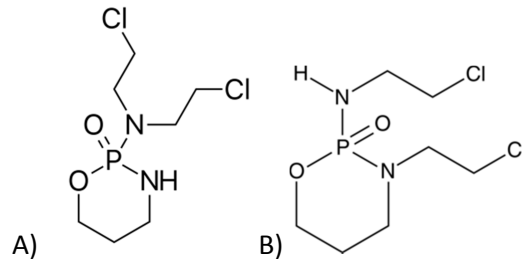


Figure 6. Structure chimique des Oxazaphosphorines

(A) cyclophosphamide et (B) ifosfamide

Le mécanisme d'action des moutardes à l'azote est décrit par les étapes suivantes (Figure 7) :

1. Cyclisation intramoléculaire d'une des deux chaînes chloroéthyles de la moutarde avec libération d'un chlore : formation de l'ion aziridinium, molécule très instable chimiquement. Ce dernier est très réactif et réagit instantanément avec tout donneur d'électron tel qu'un groupement amine, hydroxyle, thiol.
2. L'ion aziridinium va donc réagir avec le doublet non liant de l'azote situé sur l'acide nucléique type guanine en position 7 afin de former une liaison covalente stable
3. Répétition des étapes 1 à 2 avec le second groupement chloroéthyle
4. Formation de pont intra ou inter-brin de l'ADN
5. Rigidification de l'ADN
6. Blocage de la réplication et/ou de la transcription de l'ADN. L'alkylation intervient essentiellement au moment de la réplication de l'ADN (phase S) quand les deux brins sont séparés et exposent ainsi les sites d'intérêt à l'action alkylante.
7. Mort cellulaire par apoptose

La moutarde isophosphoramide (métabolite de l'IFO) possède une plus grande capacité d'alkylation de l'ADN que la moutarde phosphoramide (métabolite du CPM) (10). Cet effet est expliqué par la distance intramoléculaire entre les deux groupes chloroéthyle qui entraîne des vitesses d'alkylation et des taux d'alkylation différente. La moutarde isophosphoramide a une plus longue demi-vie que la moutarde phosphoramide et par conséquent la probabilité d'atteindre le noyau et d'alkyler l'ADN est supérieure pour la moutarde isophosphoramide.

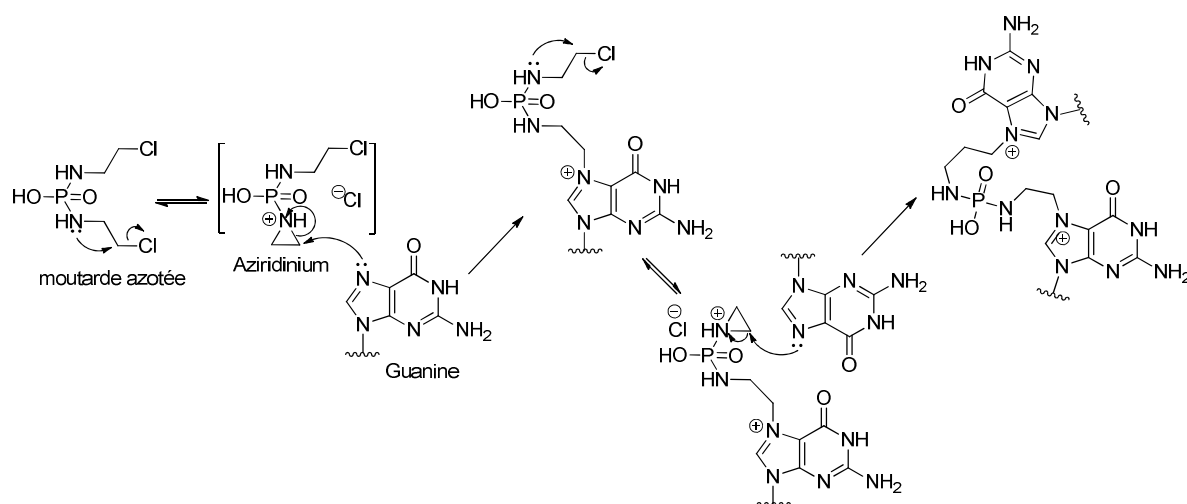


Figure 7. Mécanisme d'action des moutardes azotées

1.2. Indications et posologies

Les Oxazaphosphorines (Oxaza) ont l'AMM dans de nombreuses indications et sont, la plupart du temps, utilisées en association avec d'autres chimiothérapies. Les différentes indications thérapeutiques pour lesquelles les Oxaza ont une autorisation de mise sur le marché en France sont listées dans le Tableau 1.

IFO	CPM
<ul style="list-style-type: none"> - Sarcomes des tissus mous - Sarcomes des tissus ostéogéniques - Lymphomes non hodgkiniens - Cancer de l'ovaire en rechute - Cancers bronchiques à petites et non à petites cellules - Rechute lymphome hodgkiniens - Rechute carcinome testiculaire - Cancer du sein métastatique - Cancer de la sphère ORL en rechute ou métastatique 	<ul style="list-style-type: none"> - Adénocarcinomes mammaires - Cancers ovariens - Cancers bronchiques à petites cellules - Carcinome et séminomes testiculaires - Cancer de la vessie - Neuroblastome - Lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens - Myélomes multiples - Leucémies aigues

Tableau 1. Indications des Oxazaphosphorines.

Source : (11) (12)

La posologie des Oxaza est fonction de l'indication thérapeutique (traitement antitumoral ou immunosuppresseur/immunomodulateur), du type et de la localisation de la tumeur, de la phase du traitement (initiale ou d'entretien) et de son utilisation en monothérapie ou en association. Les posologies conventionnelles sont indiquées dans le Tableau 2.

IFO	CPM
<p>IV de 30 min à 8 h : 1 à 3 g/m²/jour par cycles courts de 3 à 5 jours renouvelables toutes les 3 à 4 semaines (la dose totale cherchée est de 5 à 10 g/m²/cycle voire 16g/m²/cycle)</p> <p>IV continue de 24h : 5 à 8 g/m²/jour renouvelables toutes les 3 à 4 semaines</p>	<p>Doses conventionnelles</p> <p>IV : 150 à 1200 mg/m² chez l'enfant</p> <p>IV : 500 à 4000 mg/ m² chez l'adulte</p> <p>Par cycles courts de 1 à 3 jours renouvelables toutes les 3-4 semaines ou 2 injections à 7 jours d'intervalle.</p>

Tableau 2. Posologies conventionnelles des Oxazaphosphorines.

Source : (11) (12)

Actuellement, en pratique clinique le CPM est plus utilisé que l'IFO. Toutefois, il est important de souligner que l'IFO est plus actif sur un plus grand panel de tumeurs malignes (13).

1.3. Pharmacocinétique et Métabolisme

Absorption

Le CPM est administré par voie parentérale et par voie orale (Biodisponibilité de 97%) alors que l'IFO n'est administrée que par voie parentérale. En effet l'IFO a montré une augmentation de l'incidence de la neurotoxicité lorsqu'il était administré per os (voir le chapitre Toxicités).

Distribution

La distribution du CPM et de l'IFO est caractérisée par un volume de distribution similaire (0,5-0,8L/kg) ainsi qu'une liaison aux protéines plasmatiques de 20%. Le CPM et l'IFO ainsi que leurs métabolites actifs sont largement liés aux érythrocytes circulants servant ainsi de transporteurs (14) (15, 16). Dans l'étude de Highley *et al.*, les érythrocytes des patients traités par IFO contenaient 77 % de la concentration sanguine totale de moutarde azotée dérivée de l'IFO (15). Ces résultats indiquent

que le suivi des concentrations d'érythrocytes dans les métabolites actifs du CPM et de l'IFO est intéressante, car les données peuvent avoir une valeur prédictive de l'efficacité thérapeutique (14).

Métabolisme

Les Oxaza sont des prodrogues c'est-à-dire qu'elles sont initialement inactives et nécessitent d'être métabolisées pour être actives. Elles subissent une activation enzymatique principalement dans le foie mais aussi dans des d'autres types cellulaires tels que les cellules rénales, suivant des voies métaboliques différentes dues à par l'action des CYP.

Ifosfamide

L'IFO est transformé par une voie activatrice dite « anabolique » qui consiste en l'oxydation enzymatique par l'isoforme CYP3A4 en position 4 du cycle de l'IFO conduisant à la formation de 4-hydroxy-IFO (HO-IFO), qui est en équilibre avec sa forme tautomérique, le 4-aldo-IFO. Ensuite deux types de réactions interviennent : une réaction de type « retro-Michael » qui libère la moutarde isophosphoramide, entité active, ainsi que l'acroléine (ACR), un aldéhyde hautement réactif responsable d'urotoxicité, et une réaction transformant le 4-aldo-IFO en carboxy-IFO, métabolite inactif. Une seconde voie métabolique, la voie toxicogène dite « catabolique » consiste en l'oxydation des chaînes latérales principalement par l'isoforme CYP2B6. Cette voie entraîne la déchloroéthylation de l'IFO en trois métabolites déchloroéthylés inactifs, N^2 -déchloroéthyl-ifosfamide (N^2 -DCE-IFO), N^2,N^3 -di-déchloroéthyl-ifosfamide (N^2,N^3 -di-DCE-IFO) et N^3 -déchloroéthyl-ifosfamide (N^3 -DCE-IFO). La déchloroéthylation est accompagnée par la libération de chloroacétaldéhyde (CAA), métabolite responsable de toxicité.

En raison de la plus faible affinité du CYP3A4 pour l'IFO comparée à celle du CYP2B6, la voie activatrice ne représente que 10 à 50% de la biotransformation de l'IFO (17).

Il est à noter que l'IFO possède un centre asymétrique au niveau de son phosphore et par conséquent il est administré en tant que mélange racémique (*S*-IFO et *R*-IFO) avec une distribution égale entre les deux énantiomères. Cependant il a été démontré que la métabolisation des deux énantiomères est différente avec un profil de toxicité différent. En effet, selon une étude menée chez le rat, l'énantiomère *S*-IFO serait associé à la neurotoxicité alors que le *R*-IFO serait responsable de l'activité antitumorale avec une plus faible libération des métabolites toxiques (18). En effet, il a été montré lors d'une expérience *in vitro* sur des cellules exprimant le CYP3A4 que le *R*-IFO libérait 2 à 3 fois plus de HO-IFO que le *S*-IFO (19).

Cyclophosphamide

Le CPM est transformé par une première voie activatrice avec l'oxydation enzymatique par l'isoforme 2B6 du CYP450 en position 4 du cycle du CPM conduisant à la formation de 4-hydroxy-CPM (HO-CPM), qui est en équilibre avec sa forme tautomérique, le 4-aldo-CPM. Ensuite deux types de réactions interviennent : une réaction de type « retro-Michael » qui libère la moutarde phosphoramidate, entité active, ainsi que l'ACR. Cette voie représente 90% de la biotransformation du CPM (17). La seconde voie métabolique, très minoritaire, la voie toxigène consiste en l'oxydation des chaînes latérales par l'isoforme CYP3A4. Cette voie entraîne la déchloroéthylation du CPM en trois métabolites déchloroéthylés inactifs, N^2 -déchloroéthyl-cyclophosphamide (N^2 -DCE-CPM), N^2,N^3 -di-déchloroéthyl-cyclophosphamide (N^2,N^3 -di-DCE-CPM) et N^3 -déchloroéthyl-cyclophosphamide (N^3 -DCE-CPM). La déchloroéthylation est également accompagnée par la libération de CAA mais elle ne représente que 10%.

Le CPM possède également un centre asymétrique au niveau de son phosphore et est administré en tant que mélange racémique (50:50). A la différence de l'IFO, le métabolisme ainsi que le profil d'efficacité et de toxicité ne semblent pas être différent pour les deux énantiomères (18).

Elimination

L'IFO sous forme inchangée est éliminé dans les urines (20%). La demi-vie de l'IFO est de 4 à 16h alors que celle du CPM est plus courte, de 3 à 10h.

Les principales enzymes de détoxification des dérivés hydroxylés des Oxaza (HO-CPM et HO-IFO) sont les aldéhydes déshydrogénases (ALDH1A1, ALDH3A1 et ALDH5A1) (20). D'autres enzymes intracellulaires interviennent dans la détoxification : l'aldo-keto réductase, l'alcool déshydrogénase (ADH) et la glutathion réductase (Figure 8).

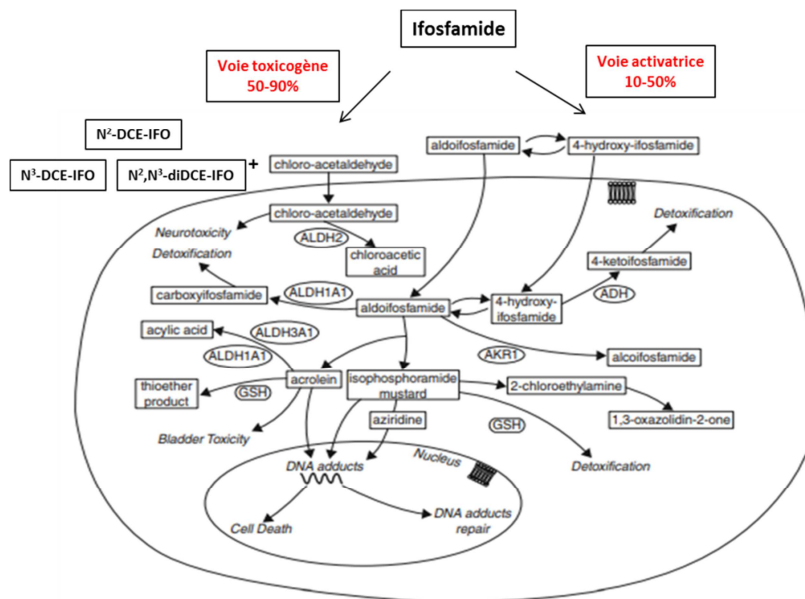


Figure 8. Métabolisme et détoxification de l'IFO.

Source : Adaptée de (21)

Les principaux paramètres pharmacocinétiques sont cités dans le Tableau 3.

	IFO	CPM
Absorption orale	Non utilisé per os Voie IV (voie intra-artérielle possible)	Biodisponibilité absolue per os = 97% Voie IV (voie IM possible si capital veineux altéré)
Distribution	Vd= 0,5-0,8 L/kg (augmenté chez le sujet obèse et âgé) Lpp = 20%	Vd= 0,5-0,8 L/kg Lpp CPM= 20% Lpp HO-CPM = 60% Faible passage dans le LCR : 20%
Métabolisme	Hépatique CYP3A4 -> HO-IFO	Hépatique CYP2B6-> HO-CPM
Élimination	Rénale (20% forme inchangée dans les urines) T _{1/2} = 4-16h (augmentée chez le sujet obèse et âgé) HO-IFO T _{1/2} = 4-7h	Rénale 90% T _{1/2} = 3-10h

Tableau 3. Principaux paramètres pharmacocinétiques des Oxazaphosphorines.

IM : Intramusculaire ; Vd : Volume de distribution ; Lpp : Liaison aux protéines plasmatiques ; LCR : Liquide céphalo-rachidien ; T_{1/2} : demi-vie d'élimination.

Source : (11) (12)

1.4. Toxicités

Les anticancéreux cytotoxiques ont des effets indésirables communs liés à leur effet antiprolifératif et des effets indésirables spécifiques. En effet, ils affectent les cellules cancéreuses (objectif du traitement) mais également les cellules saines en division. Ils sont donc principalement toxiques pour les tissus qui se renouvellent régulièrement tels que la moelle osseuse, la muqueuse du tube digestif, la peau, les phanères et les gonades.

Les Oxaza présentent une toxicité spécifique à leur classe thérapeutique, une toxicité vésicale pouvant entraîner une cystite hémorragique avec une évolution mortelle. Cette toxicité est imputable à la libération d'ACR en quantité équimolaire avec la moutarde azotée. En effet, l'ACR est un aldéhyde fortement réactif avec les composants cellulaires, principalement avec les groupements thiols du glutathion (GSH) et des protéines ; elle rompt l'équilibre en groupements thiols des cellules cibles, dénature les protéines et interfère avec la synthèse des acides nucléiques. La conséquence est principalement une déplétion en GSH. Le GSH est une molécule constituée de trois acides aminés, glutamate, cystéine et glycine. Elle participe à de nombreuses réactions métaboliques telles que la détoxification des radicaux libres et des toxines exogènes, la synthèse et le transport protéique, la maintenance de la balance redox intracellulaire. L'administration concomitante de 2-mercaptoéthanesulfonate de sodium (Mesna) a permis de pallier les effets de l'ACR et ainsi a largement bénéficié à l'amélioration de la tolérance des Oxaza. Brièvement, le Mesna va piéger l'ACR sous forme d'un thioéther stable, soluble, rapidement et totalement éliminé par la voie rénale. L'administration concomitante de Mesna est obligatoire avec une administration d'IFO alors qu'avec le CPM, la co-administration dépend de la dose de CPM. La posologie du Mesna (Uromitexan®) est habituellement fixée à 60% de la dose d'Oxaza administrée mais peut dépasser 100% de la dose. Il peut être administré en perfusion IV avec un tiers de la dose au début de l'administration de l'Oxaza, puis un second tiers 4 h plus tard et le dernier tiers 4 h plus tard, ou alors il peut être utilisé en perfusion IV continue débutant 15 min avant la perfusion de l'Oxaza et se prolongeant 8 à 12 h après la fin de celle-ci.

Un second métabolite des Oxaza est remis en cause dans les toxicités, le CAA qui serait responsable, en parti, de la néphrotoxicité et surtout de la neurotoxicité. En effet, le CAA est structurellement proche de l'acétaldéhyde et du trichloroacétaldéhyde, des métabolites neurotoxiques de l'éthanol et de l'hydrate de chloral (agent thérapeutique utilisé comme sédatif, hypnotique ou analgésique). De par son métabolisme, l'IFO libère une plus grande quantité de CAA que le CPM. Les troubles neurologiques induits par l'IFO s'accompagnent souvent du développement d'une encéphalopathie.

L'incidence de la neurotoxicité est variable selon le mode d'administration avec une incidence plus élevée avec une administration per os et une incidence plus faible lorsque l'IFO est administré en perfusion intraveineuse continue (22).

L'encéphalopathie à l'IFO survient dans les 24 heures à 8 jours suivant l'administration de l'IFO. Les signes cliniques sont non spécifiques : hallucinations, troubles de la vision, somnolence, troubles de la mémoire, confusion, agitation, syndrome extrapyramidal, convulsions, voire coma et parfois avec une issue fatale. Actuellement le traitement curatif est l'administration du bleu de méthylène IV ou per os avec de la thiamine pour une récupération dans les 24 heures.

Les résultats d'une enquête sous la direction du Comité technique de Pharmacovigilance (CT012015083) ont montré en France, 186 cas de neurotoxicité entre le 01/06/2012 et 01/09/2015 dont 44% des patients avaient moins de 18 ans. Sur ces 186 cas, 12 patients avaient un pronostic vital engagé et 5 patients sont décédés de cette toxicité. Il est également à noter que dans cette enquête la survenue de la neurotoxicité est plus précoce que celle décrite dans le RCP à savoir pendant la perfusion ou dans les 6 heures qui suivent la fin de perfusion.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la plus grande prévalence de neurotoxicité dans la population pédiatrique :

- Un métabolisme différent chez l'adulte et chez l'enfant
- Une sensibilité plus importante à l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale chez l'enfant atteint de cancers
- Une BHE plus perméable chez l'enfant
- Une plus faible détoxification des impuretés présentes dans les spécialités à base d'IFO

Concernant la néphrotoxicité, la prévalence est dose-dépendante et âge-dépendant. En effet, elle est plus importante dans la population pédiatrique et notamment chez les enfants de moins de 3 ans. La néphrotoxicité induite par l'IFO est principalement caractérisée par le syndrome de Fanconi, syndrome qui se traduit par un trouble généralisé de la fonction tubulaire proximale rénale (23). Du fait de l'absence de néphrotoxicité avec le CPM, le CAA a été mis en cause comme responsable de cette toxicité. En effet, il a été montré que les cellules rénales étaient capables de métaboliser l'IFO en CAA et DCE-IFO par les CYP3A et CYP2B6 rénaux (24) (25). De plus, il a été démontré que l'IFO, et non le CPM, était substrat du transporteur organique de cation 2 (*organic cation transporter 2* – OCT2). OCT2 est une protéine de transport principalement localisée sur la membrane basolatérale des cellules épithéliales du tube contourné proximal : elle intervient dans le passage transmembranaire des formes cationiques de nombreux médicaments. Par exemple, le cisplatine et l'oxaliplatine, anticancéreux néphrotoxiques, sont des substrats reconnus par le transporteur OCT2 ; en revanche, le carboplatine n'est pas reconnu par OCT2, ce qui pourrait expliquer sa moindre

néphrotoxicité face à ses analogues (26). Il a été montré, *in vitro*, que l'IFO diminuait la viabilité des cellules exprimant l'OCT2. L'administration concomitante de cimétidine, un substrat compétitif connu de l'OCT2, a limité cette toxicité induite par l'IFO. En plus de l'effet quantitatif sur les cellules présentant l'OCT2, l'IFO dépolarise les cellules tubulaires proximales ce qui entraîne des troubles cellulaires (27).

En plus de ces toxicités « spécifiques », sont retrouvées d'autres effets indésirables communs au traitement par chimiothérapie. Dans le Tableau 4 sont listées les toxicités induites par l'IFO, et dans le Tableau 5 celles induites par le CPM.

Toxicité	Importance	Caractères - Surveillance - Prévention
Hématologique - <i>Leucopénie</i> - <i>Thrombopénie</i>	G2-G3	Dose-dépendante et limitante - Nadir 7-14 jours. Réversible J21 - Non cumulative. Réduite si dose fractionnée.
Hypersensibilité	G2	Rare. Prévention par antihistaminiques ou corticoïdes. Réaction croisée avec d'autres alkylants.
Digestive - <i>Nausées, vomissements</i> - <i>Stomatite</i>	G1	Dose-dépendante peuvent être retardés : 3 jours. Protocole antiémétique - Prise à distance du repas. Hygiène buccale.
Alopécie	G2 - G3	Port du casque réfrigérant.
Cystite hémorragique	G3 - G4	Hydratation importante. Antidote mesna. Cf note Toxicité excréto-urinaire des oxazaphosphorines fiche cyclophosphamide.
Activité antidiurétique ("ADH - like")	Rare	
Cardiaque - <i>Insuffisance cardiaque</i> - <i>Troubles du rythme</i>		ECG avant traitement pour fortes doses. À très fortes doses chez les patients ayant déjà reçu des anthracyclines.
Acidose métabolique asymptomatique		Fréquente aux doses élevées (15 g/m ²). ECG avant ionogramme - correction du trouble.
Neurotoxicité - <i>Convulsions, stupeur, somnolence, ataxie, désorientation, coma</i> - <i>Encéphalopathie</i>	G1 - G3	Fractionner sur 5 jours. Ne pas dépasser 4 g/m ² /j. Éviter les médicaments agissant sur le SNC. Injection de bleu de méthylène 50 mg en IV au début des symptômes (147).
Rénale		Tubulopathie aiguë et tardive. Syndrome de De Toni-Debré-Fanconi chez l'enfant. Augmentée en cas de fortes doses quotidiennes et de traitement préalable ou antérieur par les sels de platine. En cas d'apparition d'IRC, arrêt momentané ou définitif.
Gonades		Diminution de la fertilité.
Toxicité excréto-urinaire		cf fiche cyclophosphamide (475, 504) et fiche spécifique mesna

Tableau 4. Toxicités induites par l'ifosfamide

Grade 1 : toxicité ne nécessitant pas l'arrêt du traitement. Grade 2 et 3 : toxicité nécessitant l'arrêt du traitement.

Source : (28)

Toxicité	Importance	Caractères - Surveillance - Prévention
Hématologique - <i>Leucopénie</i> - <i>Thrombopénie</i>	G2 - G3	Prévention par l'amifostine (ÉTHYOL®) en cas d'association au CDDP dans le cancer ovarien avancé. Nadir 7-14 jours - Réversibilité spontanée (J18 à J25). (à fortes doses)
Allergique - <i>Réactions cutanées</i> - <i>Choc anaphylactique</i>	G1 à G4	Prévention par antihistaminiques ou corticoïdes. Réaction croisée avec les autres alkylants.
Locale <i>Bouffées de chaleur</i>	G1	Préférer les perfusions lentes.
Digestive - <i>Nausées, vomissements</i> - <i>Stomatite</i>	G1 à G3 G1	Retardés de 12 à 24 heures. - Prise à distance du repas. Protocole antiémétique maintenu au moins 24 h après injection. - Hygiène buccale.
Alopécie	G2 - G3	Réversible (éventuellement port du casque réfrigérant).
Rénale - <i>Cystite hémorragique</i> - <i>Rétention hydrique</i>	G3-G4	Hydratation importante et alcalinisation urinaire. Prévention par du mesna pour les fortes doses (cf note Toxicité excréto-urinaire des oxazaphosphorines et moyens d'y remédier) Syndrome "ADH like" favorisant les cystites hémorragiques.
Cardiaque - <i>Troubles du rythme cardiaque</i> - <i>Insuffisance cardiaque congestive</i>		À fortes doses : survient entre J1 et J10. ECG avant traitement à fortes doses. Surveillance du poids.
Acidose métabolique asymptomatique		Ionogramme. Correction du trouble.
Pulmonaire <i>(pneumopathie interstitielle fibreuse pulmonaire)</i>		Radios pulmonaires. Antibiothérapie et corticothérapie. Favorisée par chimiothérapies multiples, radiothérapies et et oxygénothérapie.
Cutanée - <i>Hyperpigmentation</i> (peau, ongles) - <i>Desquamation palmo-plantaire</i>		Pour les ongles, effet plus fréquent chez les sujets de race noire
Hépatique		À doses myélosuppressives dans le conditionnement pour greffe de moelle : maladie veino-occlusive.
Leucémogène (587)		
Gonades		Oligo voire azoospermie. Atrophie testiculaire parfois irréversible Aménorrhée pendant 1 an.

Tableau 5. Toxicités induites par le cyclophosphamide

Grade 1 : toxicité ne nécessitant pas l'arrêt du traitement. Grade 2 et 3 : toxicité nécessitant l'arrêt du traitement.

Source : (28)

1.5. Nécessité d'optimiser le traitement par l'ifosfamide

Bien que le CPA et l'IFO soient des isomères de position, de nombreuses différences citées précédemment peuvent être résumées tant au point de vue pharmacologique, thérapeutique et toxicogène (Figure 9).

Caractéristique	CPA	IF
Déchloroéthylation	< 10 %	≥ 50 %
Hydroxylation	90 %	< 50 %
CYP humains	2B6 +++ (K_m faible) ; 2C, 3A4	3A4 +++ (K_m élevé) ; 2B6, 2B1
Saturation du métabolisme	> 4 g/m ²	> 18 g/m ²
Indications	Larges : hémopathies, sein, ovaire, enfant, intensifications	Restreintes : sarcomes, testis, intensifications
Doses standard	0,6–1,5 g/m ²	6-9 g/m ²
Mesna	Si dose > 1–1,2 g/m ²	Systématique
Administration intraveineuse	Perfusion courte	Perfusion courte, perfusion continue
Administration orale	Oui	Non (neurotoxicité)
Rôle du fractionnement	Non	Oui +++
Rôle de la perfusion continue	Faible	?
Toxicité extrahématologique	Rare	Neurologique, rénale
Intérêt clinique d'une modulation	Faible	Élevé

CPA : cyclophosphamide ; IF : ifosfamide ; CYP : cytochromes P450 ;
 K_m : constante d'affinité.

Figure 9. Principales caractéristiques différenciant le CPA et l'IFO

Source (17)

Il existe une relation dose-effet pour l'IFO, c'est-à-dire, plus on augmente la dose et plus on augmente l'exposition plasmatique à l'IFO (29). Plusieurs protocoles d'IFO à haute dose (IFO HD) ont été étudiés. Cette hypothèse a notamment été vérifiée dans l'étude de Le Cesne *et al.* ; chez des patients atteints de sarcomes avancés des tissus mous réfractaires aux doses standard d'IFO, cette étude a évalué l'efficacité (le « sauvetage ») ainsi que le profil de tolérance de l'administration d'IFO HD (dose cumulative de 12 g/m² en perfusion continue pendant 3 jours) et elle a montré une bonne efficacité (20 patients sur 36 ont montré une réponse partielle ou stabilisation de la maladie),

cependant accompagnée de toxicités importantes (neurotoxicité, néphrotoxicité et hématotoxicité) (30).

Concernant la population pédiatrique, une étude de 2005 a rapporté l'efficacité de l'IFO HD (dose cumulative de 14 g/m^2 , perfusée sur 2h avec à 12h d'intervalle) chez les enfants présentant un ostéosarcome et étant en rechute ; la survie sans progression était augmentée de 30%. Cependant cette augmentation de la dose standard entraîne une néphrotoxicité importante chez un quart des patients dont deux ont présenté insuffisance rénale terminale (31). Une étude a rapporté l'efficacité de la perfusion d'IFO HD (14 g/m^2) en perfusion continue sur 14 jours chez les enfants présentant un sarcome synovial ou un sarcome d'Ewing réfractaire ; 10 patients sur 14 ont présenté une réponse partielle ou une stabilisation de la maladie avec une absence de neurotoxicité et de néphrotoxicité, seuls 5 patients ont présenté une hématotoxicité de grade 3 (32). Cette étude montre que les conditions d'administration de l'IFO sont des facteurs conditionnant la gravité des effets indésirables.

L'IFO est une chimiothérapie ayant fait ses preuves dans différents types de cancers chez l'adulte comme chez les enfants. Le contrôle de ses effets secondaires est un objectif clinique rationnel dont les origines sont connues (métaboliques), et mérite d'être investigué par différentes stratégies de pharmacomodulation.

2. Optimisation de l'index thérapeutique : Pharmacomodulation et Immunomodulation

2.1. Pharmacomodulation : pré-activation et nanomédecine

2.1.1 Application aux Oxazaphosphorines

La complexité du métabolisme des Oxaza offre plusieurs possibilités thérapeutiques permettant d'améliorer la balance bénéfice/risque. Il est possible d'agir sur le métabolisme en modifiant l'activité des CYP et/ou des voies de détoxification grâce à des interactions médicamenteuses (modulations pharmacologiques) ou d'agir directement sur la molécule d'Oxaza pour orienter son métabolisme (modulation chimique).

2.1.1.1. Modulations pharmacologiques

2.1.1.1.1. Modulation de l'activité des cytochromes P450

Les Oxaza étant des prodrogues nécessitent une bioactivation enzymatique. Une des stratégies envisagées pour promouvoir l'activité des Oxaza est de s'intéresser aux enzymes activatrices et/ou toxigènes c'est-à-dire d'influencer l'activité des CYP3A4 et CYP2B6. Dans le cas de l'IFO il est intéressant de favoriser la métabolisation par le CYP3A4 et/ou inhiber la métabolisation par le CYP2B6. Pour le CPM, il est intéressant de favoriser l'activité du CYP2B6.

L'activité des CYP peut être influencée de façon exogène par différentes stratégies : compétition pharmacologique avec un médicament inducteur/inhibiteur des CYP ou l'utilisation de la thérapie génique.

Interactions médicamenteuses

L'administration concomitante d'inducteurs du CYP3A4 tels que l'anti-infectieux rifampicine avec l'IFO a montré que la clairance de l'ifosfamide était augmentée et que l'exposition des métabolites déchloroéthylés était diminuée. Cependant, la concentration plasmatique en HO-IFO restait inchangée (33). Dans cette même étude, les auteurs ont aussi étudié l'influence de l'administration concomitante de l'IFO et du kétonazole, puissant inhibiteur du CYP3A4 ; le kétonazole n'a pas eu

d'influence sur les concentrations plasmatiques des métabolites déchloroéthylés mais une exposition réduite au HO-IFO a été observée.

Gene directed-enzyme prodrug therapy (GDEPT)

La voie enzymatique activatrice des Oxaza peut être améliorée pour augmenter l'hydroxylation en position 4 en utilisant l'approche de la thérapie génique (*Gene directed-enzyme prodrug therapy* GDEPT). Une telle approche implique la délivrance d'un gène CYP activateur directement à la cellule tumorale à l'aide d'un vecteur de thérapie génique approprié permettant une activation localisée et intratumorale. Des études précliniques ont montré que la chimiosensibilité des tumeurs aux prodrogues telles que les Oxaza peut être considérablement augmentée par le transfert du gène CYP (34). Dans une étude clinique, le traitement de patients atteints d'un carcinome pancréatique inopérable par l'IFO en association avec des cellules encapsulées exprimant le CYP2B1 a permis de tripler la survie à 1 an (35). Dans une étude de phase I, menée chez des patientes atteintes d'un cancer du sein avancé qui n'ont pas répondu à tous les traitements disponibles, l'administration rétrovirale de CYP2B6 (MetXia-P450) dans des nodules de surface en association avec le CPM a provoqué une bonne réponse antitumorale avec l'amélioration marquée des lésions distales au site du traitement et l'induction d'une réponse immunitaire spécifique antigène antitumoral qui a entraîné une chute de 60% des niveaux circulants du marqueur CA 15-3, protéine produite notamment par les cellules cancéreuses du sein (36).

2.1.1.1.2. Modulations des voies de détoxification

Le ciblage des enzymes de détoxification ALDH est également une opportunité thérapeutique pour favoriser l'action des Oxaza. La déplétion de GSH par des agents thérapeutiques tels que la buthionine sulfoximine a montré, *in vitro* dans un modèle de leucémie myéloïde humaine, une cytotoxicité du CPM augmentée de 5 fois (37). L'exploitation d'inhibiteurs d'ALDH tels que le disulfiram (38) ou du CB29 (39) pourrait être envisagé afin de favoriser l'action alkylante et/ou de contourner les résistances aux Oxaza dues à une surexpression de ces enzymes dans les cellules cibles. Actuellement aucune donnée clinique n'a été publiée.

Les hypothèses de modulation pharmacologique faites pour favoriser la voie activatrice et/ou inhiber la voie toxicogène, n'ont pas montré de résultats satisfaisants sur l'impact clinique ou nécessitent des études supplémentaires. Des modifications d'ordre chimique, c'est-à-dire des modifications

apportées directement sur la moutarde azotée, ont et sont également développées afin de modifier le profil pharmacocinétique des Oxaza pour améliorer l'index thérapeutique.

2.1.1.2. Pharmacomodulation chimique

2.1.1.2.1. Historique

De nouveaux dérivés de l'IFO et CPM ont pu être élaborés par des modifications soit du cycle, soit des chaînes latérales.

Modification au niveau du cycle

Les modifications du cycle Oxaza peuvent être apportées sur les hétéroatomes du cycle, par exemple avec le remplacement de l'azote intracyclique par un soufre (40). Certains de ces analogues du CPM ont montré une activité antitumorale *in vivo* sur un modèle murin de carcinome du sein mais n'ont pas eu de développement ultérieur. Des modifications touchant les carbones du cycle ont été également décrites avec par exemple la synthèse du 4-hydroperoxy-ifosfamide (HOO-IFO) (Figure 10) (41). Cette molécule est qualifiée de pré-activée car l'ajout d'un oxygène en position 4 permet de contourner l'oxydation réalisée par les CYP conduisant au métabolite intermédiaire, le HO-IFO. Elle a montré une bonne activité *in vivo* dans un modèle murin de leucémie. Cependant ce dernier est très réactif et par conséquent instable pour une utilisation en routine chez l'homme. Actuellement une forme complexée de HOO-IFO est étudiée et est protégée par un brevet (EP 2 401 285 B1).

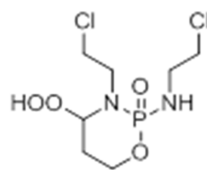


Figure 10. Structure chimique du 4-hydroperoxy-ifosfamide

D'autres substitutions en position 4 ont été réalisées, tout particulièrement sur le CPM ; celle qui a semblé la plus prometteuse est le mafosfamide. Elle est le résultat du greffage d'une molécule de Mesna au CPM (Figure 11) (42). L'idée d'administrer ces deux molécules couplées (le cytotoxique et l'uroprotecteur) pouvait être une très bonne stratégie thérapeutique, cependant une intolérance au site d'injection par voie systémique (douleur veineuse et irritation des muqueuses) chez les patients

de l'essai clinique de Phase I a conduit à une impossibilité d'envisager une administration parentérale du mafosfamide (43).

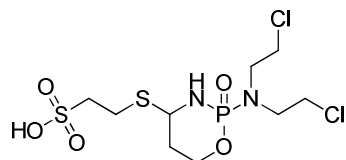


Figure 11. Structure chimique du mafosfamide

Des modifications en position 5 et/ou 6 par des groupements méthyles (44) ont également été rapportées avec l'ajout d'un atome de brome (45), ou d'un groupement trifluorométhyle (46) ou encore par des cycles benzénique (47), tétrahydrofurane ou tétrahydropyrane (48) (Figure 12). Aucun de ces composés n'a montré de résultats satisfaisants.

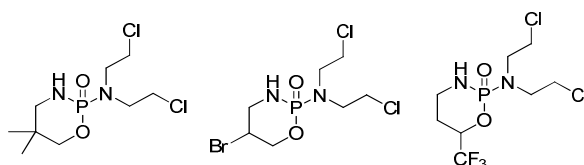


Figure 12. Exemples de substitutions en position 5 ou 6

Modifications au niveau des chaînes latérales

Les premières modifications ont porté sur la substitution d'un ou des deux atomes de chlore par un autre halogène tel que le brome. Ces nouveaux composés bromés ont montré un meilleur index thérapeutique dans un modèle murin de leucémie que l'IFO et le CPM (49) caractérisé par une plus grande capacité à former des liaisons avec l'ADN (50). Cependant, le développement des analogues bromés ne s'est pas poursuivi.

Afin d'éviter l'oxydation des chaînes latérales et par conséquent favoriser la voie activatrice par rapport à la voie toxigène, l'hypothèse d'encombrement stérique par greffage de méthyles sur les chaînes chlorées a été étudiée. Notre équipe a développé la synthèse totale de composés diméthylés par greffage d'un groupement méthyle en position 7 et 9 de l'IFO : l'analogue diméthyle-ifosfamide (diMe-IFO) (Figure 13) (51). Ces méthylation génèrent deux nouveaux centres asymétriques menant

à de nombreux diastéréoisomères. L'évaluation pharmacologique de ces composés a permis de mettre en évidence le couple de diastéréoisomères le plus actif (7*S*,9*R*-diMe-IFO). De plus, les moutardes diméthylées formées ont montré une activité alkylante fortement augmentée en comparaison de la moutarde de référence (52). Des essais pré-cliniques pharmacologiques et toxicologiques sont en cours pour mettre en évidence l'efficacité antitumorale de cette molécule prometteuse.

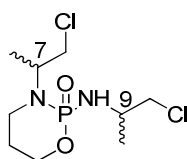


Figure 13. Structure chimique du 7,9-diméthyle-ifosfamide

2.1.1.2.2. Les dérivés pré-activés X-IFO

La notion de pré-activation, imaginée par Hohorst *et al.*, a été re-investiguée par notre équipe avec la mise en œuvre de la pré-activation de l'IFO par une réaction d'oxydation anodique (53). Cette technique a permis de mettre au point un protocole pour synthétiser la forme biomimétique du HO-IFO par synthèse électrochimique du méthoxy-IFO (MeO-IFO) à partir de l'IFO. Celui-ci est obtenu par greffage spécifique du groupement méthoxy (MeO) en position 4 du cycle Oxaza. Par la suite, il a été mis au point un protocole permettant de greffer différents groupements et ainsi obtenir un large éventail d'analogues pré-activés de l'IFO. Ce panel de composés a été obtenu par substitution du groupement méthyle par une variété de chaînes aliphatiques, saturées ou insaturées, comportant 1 à 30 carbones (C₁ à C₃₀) (Figure 14). Ces analogues (X-Oxaza) ont montré une activité cytotoxique *in vitro* en absence de CYP démontrant ainsi la preuve de concept de pré-activation. La longueur de la chaîne alkyle ainsi que sa nature ont un rôle dans la vitesse de cette libération (54).

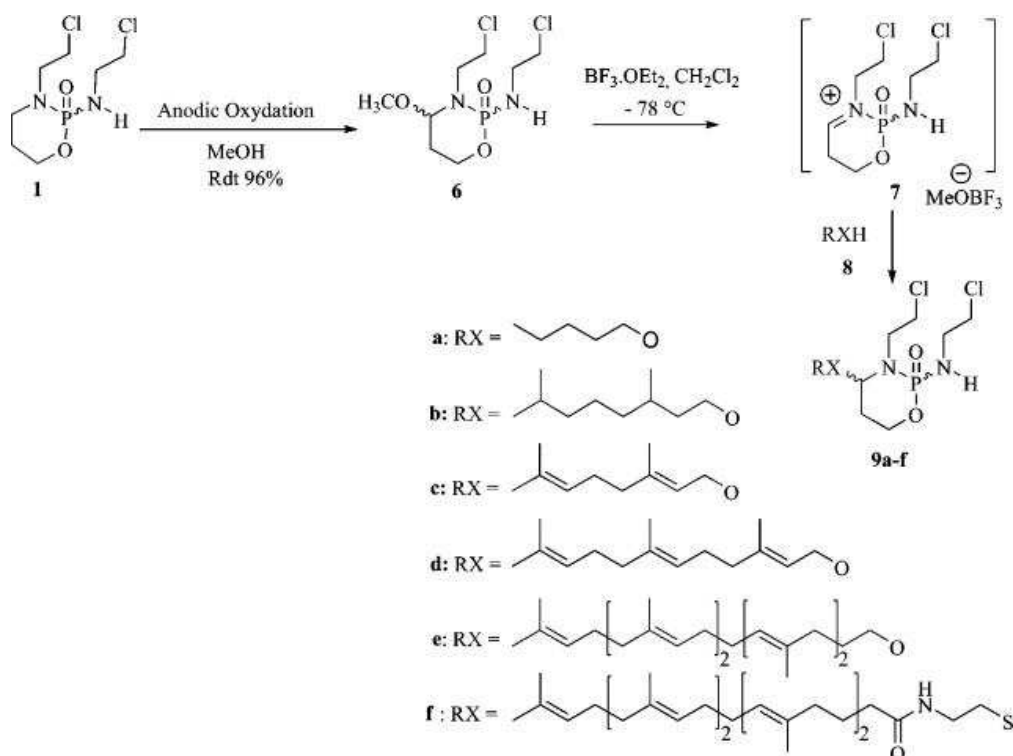


Figure 14. Structure chimique des X-Oxaza

Source : (54)

De plus, certains composés pré-activés possèdent la propriété de s'auto-assembler dans l'eau sous forme de NA ; ce sont les analogues obtenus par couplage de chaînes alkyles insaturés et de types terpéniques de taille allant de C₁₀ à C₃₀ : le géranyloxy-ifosfamide (G-IFO), le farnésyloxy-ifosfamide (F-IFO) et le squalénoxy-ifosfamide (SQ-IFO). Ces composés formulés sous forme de NA ont eux aussi démontré une efficacité *in vitro* comparable ou meilleure que sous leur forme libre (54). La forme nanoparticulaire offre la possibilité de protéger l'agent thérapeutique de la dégradation, de contrôler leur libération, de surmonter les barrières biologiques et de cibler l'environnement tumorale et/ou la cellule tumorale. Elle influe sur la biodisponibilité et la pharmacocinétique des médicaments. Par conséquent cette forme galénique permet d'améliorer l'index thérapeutique. En ce qui concerne tout particulièrement les traitements anticancéreux, les nano-assemblages (NA) peuvent profiter de l'effet accru de perméabilisation et rétention (*Enhanced Permeabilization Retention-EPR effect*) caractérisé par la déstructuration du système vasculaire (présence de fenestrations entre les cellules endothéliales), un faible drainage lymphatique pouvant entraîner une accumulation des nano-objets dans le compartiment tumoral.

L'évaluation pré-clinique ainsi que l'optimisation galénique de ces nouveaux composés offre une stratégie thérapeutique rationnelle et prometteuse.

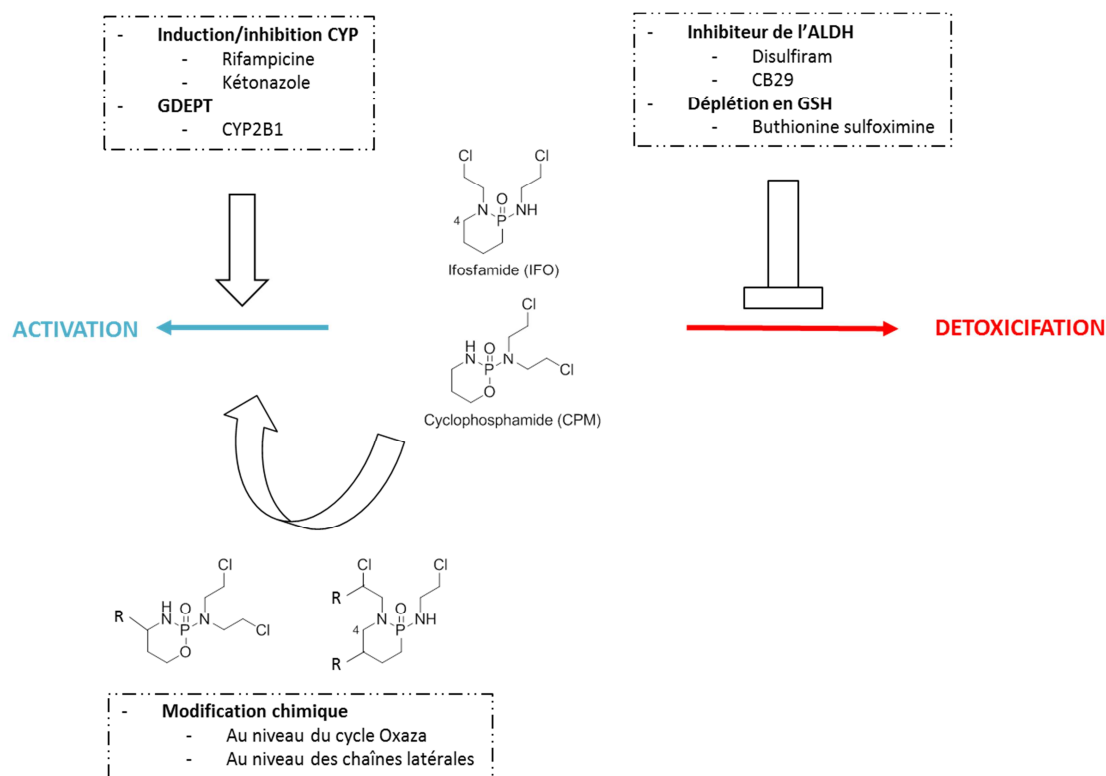


Figure 15. Stratégies de pharmacomodulation des Oxaza

2.1.2. Revue de la littérature « Prodrugs as drug delivery system in oncology »

Les prodrugs sont des molécules thérapeutiques inactives qui ont besoin d'une biotransformation pour exercer leur activité pharmacologique. L'exploitation de cette propriété offre un large éventail de possibilités de cibler spécifiquement un tissu malade et/ou une cellule anormale. Dans le domaine de l'oncologie, le ciblage est d'autant plus important car les effets secondaires sur les tissus sains sont très fréquents et malheureusement de gravité importante. Les chimiothérapies conventionnelles sont des molécules thérapeutiques possédant une puissante activité cytotoxique, cependant leurs utilisations sont limitées par la relation effet/dose et/ou par l'état général du patient. Développer des prodrugs à partir de ces molécules permettrait d'améliorer la balance bénéfique/risque. La revue de la littérature présentée ci-après décrit l'importance d'investiguer cette stratégie thérapeutique, les différentes possibilités de synthèse et les différentes cibles tumorales actuellement exploitées par cette stratégie.



Prodrugs as drug delivery system in oncology

J. Delahousse^{1,2} · C. Skarbek¹ · A. Paci^{1,2,3}

Received: 27 February 2019 / Accepted: 5 July 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

The use of conventional chemotherapy in the treatment of cancer has been restricted by the lack of cell specificity, which causes toxicity regarding healthy cells resulting in limiting side effects responsible for low therapeutic efficiency. To overcome these drawbacks, the design of prodrugs has evolved and improved by covalently linking the drug through a degradable spacer. The use of these prodrugs as drug delivery systems, which are able to inactivate the drug during its biodistribution to specifically deliver the drug to its target, is an important breakthrough in cancer therapy. This strategy consisting in the covalent binding of a promoiety to daily used therapeutic compounds has been clinically proven in the design of targeted prodrugs leading enhanced therapeutic efficacy and increase of the therapeutic index. This review summarizes and compares several strategies that improve the therapeutic index of chemotherapy (i.e. conventional drugs) by their chemical transformation into prodrugs improving pharmacokinetic profiles and optimizing administration routes in comparison to the initial drug. This review provides an overview of the methods used to control the structure and function of prodrugs and, ultimately, their current and future potential in increasing the therapeutic index of daily used anticancer drugs. First, prodrugs' design and their activation within the tumor microenvironment or within the tumor cell will be exposed. Then, the different strategies used leading to these prodrugs will be presented.

Keywords Cancer therapy · Drug delivery systems · Microenvironment · Prodrugs · Targeting

Targeting for efficient care

Prodrug strategy

Chemotherapy (CT) has demonstrated important curative rates; nevertheless, the lack of specificity is still an issue as CT is responsible for side-effects especially towards fast dividing healthy cells. CT drugs act through an antiproliferative mechanism or by disruption of the cell cycle at a

specific phase. Hence, these drugs, due to poor specificity, affect rapidly proliferating and dividing cells such as red blood cells, hair follicles, gut epithelial cells, bone marrow, and the lymphatic system, leading to numerous side-effects which limit their uses. High-dose CT is generally required to effectively inhibit tumor proliferation, especially in resistant solid tumors. The lack of specificity of CT could lead to lethal damages of the adjacent normal proliferating cells, resulting in a discontinuity of therapy. Therefore, improving the specificity of CT drugs used daily is a vital step to increase their therapeutic index. Many strategies have been developed for this purpose. Among them, a relevant strategy is based on the development of prodrugs. Initially, a prodrug is an inactive drug designed to be activated through a spontaneous process (e.g. hydrolytic degradation) or through a biocatalytic mechanism, near the pharmacological target allowing a specific release of the active entity at its target site [1].

Their design is commonly based on three components (Fig. 1): (1) the active moiety for anticancer activity (i.e. drug); (2) a cleavable labile chemical moiety (i.e. linker) which is conjugated to the active moiety through a functional

J. Delahousse and C. Skarbek have contributed equally to the present study.

✉ C. Skarbek
charles.skarbek@gmail.com

¹ Vectorologie des anticancéreux et des acides nucléiques, UMR 8203, CNRS, Université Paris-Saclay, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

² Service de Pharmacologie, Département de Biologie et Pathologie médicales, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

³ University Paris-Saclay, Faculté de Pharmacie, Chatenay-Malabry, France

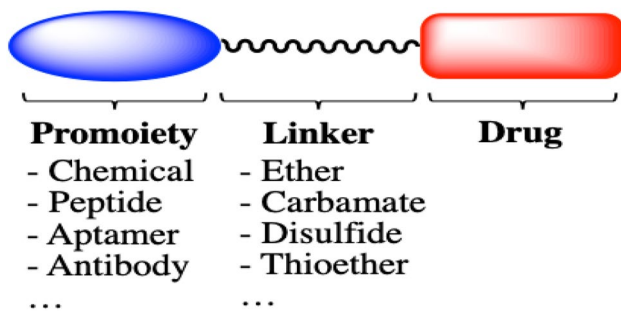


Fig. 1 Common structure of a prodrug

group (hydroxyl, carboxylic, amine, carbonyl, and phosphate groups, etc.); and (3) a targeting moiety for specific delivery to tumor cells such as polypeptides or monoclonal antibodies (mAb) (i.e. promoiety) [2].

The design of such compounds depends on two major principles: (1) the structural features of the active moiety with the ability of the targeted moiety to mask the pharmacodynamic activity of the anticancer drug. (2) The bioconversion mechanism of the drug release which can either gradually or immediately degrade the linker chosen for the conjugation [3]. The design of prodrugs provides a remarkable tool to improve the pharmacological properties of the active moiety. Conventional prodrug design aims mostly to: improve solubility in water or lipid membrane, improve chemical stability, increase oral or local absorption and brain permeability, mask unacceptable taste, reduce irritation or pain, modify pre-systemic metabolism, and reduce toxicity [4].

Paracelsus said some 500 years ago: “All things are poison and nothing is without poison, only the dose permits something not to be poisonous”. In the sixteenth century, Paracelsus initiated the shift from conventional medicine to modern medicine based on chemical knowledge for a better development of pharmaceuticals. For a long time, the galenic development of drugs has been limited to physicochemical stability concerns to be stored and administered. Better understandings on the fate and behavior of the drugs in the body (pharmacokinetics) have allowed designing “clever” drugs. In the beginning of the twentieth century,

a German scientist named Paul Ehrlich thought that a compound could target selectively a disease-causing organism without harming the body itself and called the hypothetical agents “Zauberkegel”, the “Magic Bullet” [5]. His idea has been extended to many drugs used in various diseases including malignant diseases. The dream of Paul Ehrlich is becoming true towards new vectorization concepts, with the development of new physicochemical concepts, new therapeutic targets, and new biomaterials. We are now faced with more than 110,000 publications (Pubmed) in the field of drug delivery systems. Today, controlling the duration and the localization of the drug release for optimized exposure is a reality (Fig. 2).

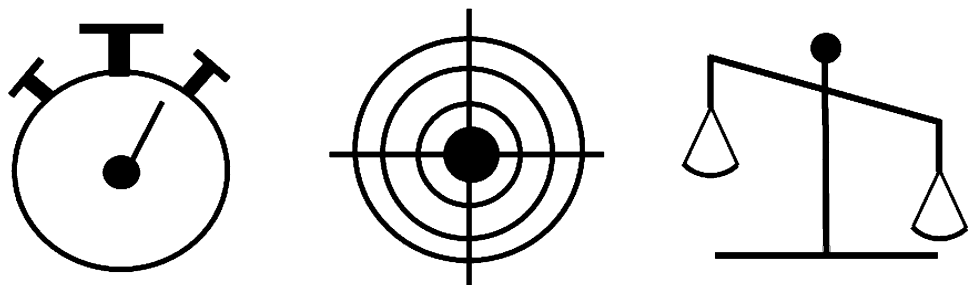
Temporally controlled drug delivery systems (TCDDS)

Controlling the chronology of drug release displays endpoints: (1) delay the drug release in order to reach the right tissue based on the pharmacokinetic and (2) increase the drug exposure by controlling its release (diffusion through a structure, erosion, etc.) and degradation/elimination process (decreasing the renal or hepatic clearance, protecting the drug from biologic events). Nowadays, drug release can be modulated through innovative structure, such as lipidic or polymeric scaffolds, sensible to biologic or external stimuli, and benefit from new knowledge of the specific microenvironment of the target.

Spatially controlled drug delivery systems (SCDDS)

In oncology, CT uses are limited because of their off-target toxicities; CT agents act by inhibiting the cellular division and, by consequence, have drastic effects on healthy cells, especially on cells with rapid cell divisions such as bone marrow cells, cells from the digestive tract and hair follicles. In addition, some cytotoxic agents have a specific toxicity profile such as platinum (Pt) with nephro-/ototoxicity, doxorubicin (DOX) with cardiotoxicity, leading to interruptions or cessation of treatment. DDS are now able to control the drug release to target a specific physiologic compartment

Fig. 2 Control of duration and localization for improved quantity release to the target



which could be a tissue involved in the disease. This strategy hugely improves the risk/benefit balance.

The strategy aiming to design new spatially controlled drug delivery systems (SCDDS) can be of interest in the targeting of specific organs or compartment and can be divided into: (1) the passive targeting with an indirect targeting focused on tumor microenvironment and (2) the active targeting by a direct targeting of the specific proteins or surface marker of tumor cells. It is necessary to keep in mind two characteristics of cancer cells related to targeting. First, the majority of cancer cells express surface molecular targets such as ligand, also present in healthy cells at lower levels. Secondly, the microenvironment of the cancer cells represents significant limitations for drug penetration especially in large solid tumors.

Quantity release-controlled drug delivery systems (QRCDDS)

Galenic developments play a role in the drug release at the right place and at the right time as well as the right delivered quantity. Therapeutic concentrations are a major concern especially in anticancer drugs. High cytotoxic exposure can cause collateral damages and poor exposure can lead to treatment failure. DDS provides the opportunity to control and optimize blood and/or tumor concentration and thus an increased therapeutic index (efficacy/toxicity balance). Besides, unfavorable physicochemical characteristics of some CT limited the effective doses, for example low water solubility for paclitaxel. DDS strategies allow developing structures to improve physicochemical properties.

Prodrugs design

The term “prodrug” was first introduced by Albert in 1951; he defined a prodrug as “a molecule which does not have any intrinsic biological activity but which is capable, during the different phases of its metabolism, to generate a biologically active drug” [6]. Ideally, the prodrug should convert to the active drug as soon as the target is reached concomitantly with the release of the non-cytotoxic moiety followed by its subsequent elimination. This conversion can be obtained

after an enzymatic or chemical degradation *in vivo*. According to the linked moiety, self-assembling properties can be observed giving access to a passive targeting. This new property leads to an increased specificity for the target site decreasing the exposure regarding normal cells and tissue which leads to an improved therapeutic index of the parent active drug.

Functional linker for an optimal release

The design of prodrug relies on the choice of the right functional group present between the drug and the promoiety. This functional group should be self-immolative or enzymatically/chemically cleavable so that the active drug can be liberated spontaneously or under triggerable condition. This process takes place either in the tumor microenvironment: such as in the presence of an overexpressed enzyme, a change in the pH, the presence of a characteristic stimulus, or at the surface of the tumor cell using a specific ligand–receptor combination. The promoiety linked to the active moiety (drug) plays a key role in the improvement of the drug-like properties and in overcoming physiological barriers or in the guidance of the drug to its target cells. The linker between the active moiety and the promoiety should be stable enough to remain intact in the blood circulation until it reaches the target cells. Optimization of the conjugation is highly suggested during the prodrug design to achieve the optimal stability and efficacy. Commonly, only a few functional groups are used for the design of prodrugs (Table 1).

Ester functional groups are among the most used as they are most easily cleaved by a large number of esterase in biological environments. They are usually introduced by the conjugation using charged groups such as hemi-esters, sulfates, phosphates or their salts, thus creating a variety of links. These functional groups can be readily hydrolyzed to release effective molecules by ubiquitous esterase, phosphatases, and sulfatases in the blood, liver, and other organs and tissues [7]. Depending on the differences in the structure of the prodrug or of the environmental conditions, the half-life of the ester bond can vary from several minutes to several hours according to accessibility of the bond [8].

Table 1 Commonly found linkers in prodrug conjugation strategy

Ester					Amide		Other linkers		
Carboxyl ester	Carbamate ester	Carbonate ester	Phosphate ester	Sulfate ester	Peptide bond	Oxime	Imine	Disulfide	Thioether

Amide group is usually designed to enhance oral absorption of drugs with amine and carboxylic functionalities. It has a relatively higher enzymatic stability than ester bond. Most of the amide bonds are stable for several hours or even several days in the plasma in the absence of specific enzymes [9]. However, the use of an amide linker in prodrugs is designed to be cleavable by a specific enzyme to increase the target-ability or reduce the toxicity.

In addition to ester and amide bonds, several other types of linkers including oximes/imines, disulfide bond or uncleavable thioether and ether bond, have also been used as functional groups [10].

Other functional groups have recently been proposed. Self-immolative linkers have significantly broadened the synthetic scope with regard to chemical functionalities amenable for prodrug design. These new types of linker are designed to rely on the cleavage of the promoiety and the active moiety with the activation of a precursor. This chemical activation generates a cascade of disassembling reaction leading to the spontaneous and fast release of the active moiety drug (Fig. 3) [11].

Self-assembling concept

Chemical modifications can also provide new physicochemical properties to the compound such as self-assembling property leading to prodrug-based nanoparticle drug delivery systems (PBN-DDS) [13]. These PBN-DDS could lead to a dual targeting property, by integrating prodrug strategy and nanomedicine strategy into one same drug delivering system. PBN-DDS have many advantages; on the one hand, prodrugs are inactive drugs and become active only after a specific metabolization or after a chemical reaction at the active site. On the other hand, the nanoparticle system plays the role of cargo resulting in the protection and guidance of the prodrug to the active site. As for today, PBN-DDS can be divided into two major groups according to the characteristic of the material used for its design which can be: (1) high weight polymeric

structures; or (2) small molecular weight PBN-DDS. Each category corresponds to the conjugation of the drug to a polymeric block or a small molecular weight compound, respectively. The physicochemical property of the moiety enables the PBN-DDS to self-assemble into nano-object in aqueous media.

These PBN-DDS refer to amphiphilic conjugates in which the carrier material and the drug play an important role in the hydrophilic–lipophilic balance of the prodrug. These prodrugs are designed by the conjugation of the carrier material directly to the anticancer drug by a covalent bond. The resulting nano-object provides the protection of the prodrug from degradation and diminishes the premature burst release. In addition, the nanoparticulate form provides an increased internalization of the drug leading to an increase of the intracellular drug concentration [14]. The first generation of PBN-DDS describes a drug delivery system that targets the lesion through passive mechanism using the so-called “Enhanced Permeability Retention” (EPR) effect proposed by Maeda [15]. The EPR effect is a phenomenon due to the anatomical and physiological characteristics of tumors. In contrast to normal tissues and organs, most tumors show a higher vascular density, such as in the case of angiogenesis which is one of the most important features of tumors to sustain their uncontrolled and rapid growth. Important differences in the structure between tumor vessels and normal blood vasculature are observed as normal cell vascularization is characterized by joined cells. On the contrary, tumor vessels are formed by non-binding cells leading to small gaps where PBN-DDS auto-agglutinate; this phenomenon characterizes the EPR effect [16]. Even if the EPR phenomenon is widely documented, controversies are discussed. The tumor physiology outlined three points: (1) heterogeneous blood vasculature which can be totally disorderly with loops and shunts leading to tight supplies, (2) elevated interstitial fluid pressure due to the plasmatic protein leakage as well as macromolecules which can block the drug uptake or promote its exclusion, and (3) distance into tumor interstitium for the macromolecules transport [17].

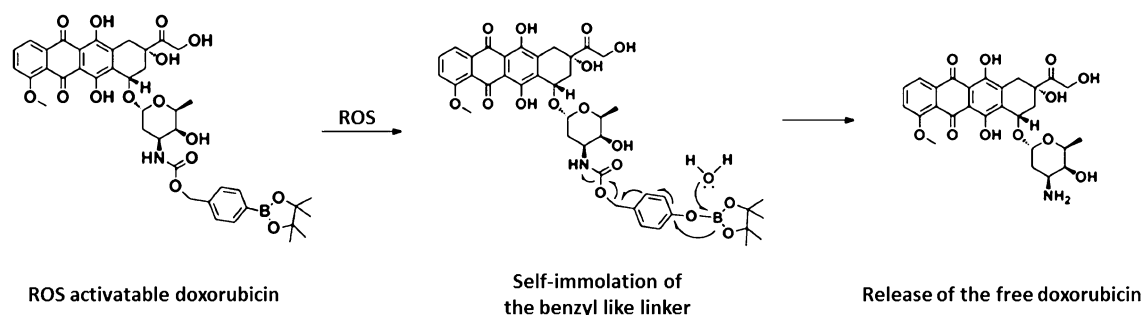


Fig. 3 Example of a ROS activatable self-immolative doxorubicin prodrug [12]

Surface modulation of this PBN-DDS is frequently observed by the use of poly(ethylene) glycol chains (PEG) which leads to “stealth” PBN-DDS with substantially increased circulation time and more likely an increased passive tumor activity (second generation) [18, 19]. The evolutions towards the third generation of PBN-DDS correspond to a dual PBN-DDS with the compilation of different functional moieties such as the drug and a ligand moiety specific for a tumor antigen/receptor (Fig. 4) [20].

Polymer PBN-DDS

This class corresponds to the covalent conjugation of drugs to polymer blocks. In the field of anticancer therapeutics, various polymer blocks have been used to design polymer PBN-DDS, such as poly-lactic-*co*-glycolic acid (PLGA), poly-lactic acid (PLA), poly-glutamic acid (PGA), polycaprolactone (PCL), *N*-hydroxypropyl-methacrylate copolymers (HPMA), and poly-amino acids. Among them, the mostly used are PLA, PLGA and PGA due to their favorable biocompatibility and biodegradability properties [21]. The use of these polymer blocks led to the development of various polymer PBN-DDS which afford different properties, such as water solubility optimization and self-assembling properties. Moreover, the choice of the optimal polymer is essential as it drives the final structure of the skeleton which plays an important role in the final physicochemical properties of the obtained nanosystem. Linear polymer blocks are usually used to synthesize self-assembling PBN-DDS polymer due to their low drug loading. Regarding the use of branched polymer blocks, they offer more functional

groups and enable to increase the conjugation of numerous drugs on the same polymer but leads to an increase of the drug loading. However, the increase of the drug conjugation leads to an important modification of the skeleton which can result in the loss of the self-assembling property. In addition, branched polymers exhibit high steric hindrance which can be critical for cellular internalization and might often result in a delayed cellular entry [22]. The conjugation of paclitaxel to PLA (CT-2103) led to the development of a polymer PBN-DDS which has been studied in phase II trial for the treatment of ovarian, breast and lung cancer. Unfortunately, the study showed no increased overall survival in terms of efficacy compared to the control treatment [23]. More complex polymer can also be used such as polysaccharides which are interesting regarding their physicochemical and biological properties. Chitosan, for example, is an important polysaccharide which is biodegradable, biocompatible, showing antibacterial, antifungal and antioxidant properties. Nevertheless, the conjugation of drugs to chitosan is mainly fulfilled in the antimicrobial or antifungal research area and not in the cancer research [24, 25].

Small molecular weight PBN-DDS

Unlike polymer PBN-DDS, small molecular weight PBN-DDS use small molecules. Some of the most commonly used are polyethylene glycol, hyperbranched poly(ether-ester) (< 5 kD) or squalene [26]. The main advantage of these conjugates is their small size (lower than 250 nm) and their interesting higher drug loading efficiency. Among them, the ones using squalene or polyisoprenoid moieties have generated expanding attention in recent years [27]. Furthermore, to deceive the short circulation time in the blood stream, poor solubility and structural stability in time issues, the co-precipitation in the presence of amphiphilic long-chain PEG copolymers can be fulfilled to achieve an increased circulation time and a higher structural stability [28]. The liberation of the drug can be triggered by a variety of stimuli and many researchers have studied approaches to design stimuli-sensitive nanosystems by applying various specific and/or sensitive linkers. These stimuli can be endogenous redox, enzyme and pH or exogenous, such as light, ultrasound, magnetic fields or temperature [29].

The stimuli-responsive behavior can be achieved by grafting these moieties to the appropriate anticancer drug through cleavable bonds or using gatekeepers, which are ruptured in response to the specific stimuli. In this case, the nanosystem transports the drug to the target tissue and, once there, the presence of a particular stimulus will trigger the release of the trapped drug achieving better control over the administered dose and bringing specificity for the target [30].

To increase the specificity, different target can be defined. Among them, we have chosen to present the strategies used

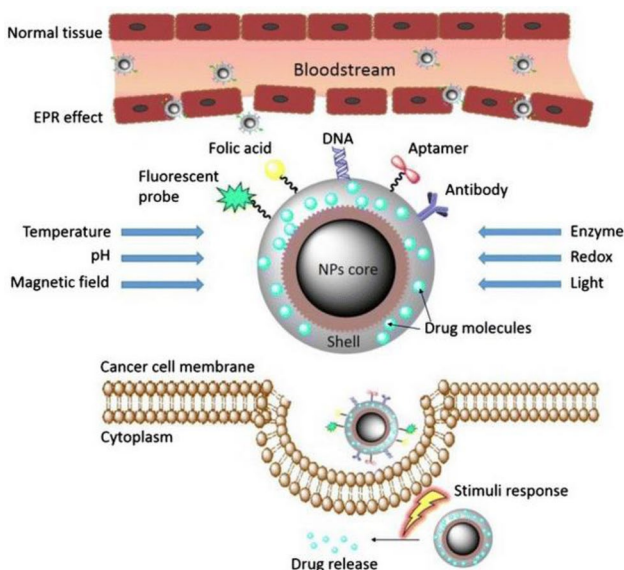


Fig. 4 Illustration underlining examples and targets of third-generation PBN-DDS taken from [20]

to target either (1) the tumor microenvironment taking into account the general surrounding of the tumor (passive targeting), and, (2) the tumor cell more specifically by taking advantage of the ligand receptor interaction (active targeting) (Fig. 5).

Targeting strategies using prodrugs

Enzyme-specific release

One of the targeting strategies takes advantage in the elevated amounts of specific enzymes in the tumor tissues. The most common elevated enzymes are from the proteases family including lysosomal proteases, such as cathepsins, and proteases present in the extracellular matrix, such as matrix metalloproteases (MMP) (Table 2).

Matrix metalloproteinase

A methotrexate (MTX) prodrug has been developed by conjugation with a MMP-2 and MMP-9-cleavable peptide (PVGLIG). This prodrug was combined also with dextran in order to take advantage of the EPR effect. This strategy has demonstrated a better therapeutic index for the prodrug

compared to MTX alone in fibrosarcoma and glioblastoma xenografted mouse models [31]. Other research teams have investigated this strategy, i.e. PVGLIG peptide with paclitaxel [32]. However, to date, no prodrug with this linker has reached clinical stage.

Prostate-specific antigen

Prostate-specific antigen (PSA) is a chymotrypsin-like protease overexpressed and secreted in the extracellular fluid of the prostate cancer microenvironment. Taking advantage of the high PSA level is one of the targeting strategies in prostate cancer research.

Denmeade et al. have synthesized a prodrug of DOX conjugated to a peptide (L-377202) specifically cleavable by PSA in prostate tumor tissue. The release of the active metabolites Leu-DOX and DOX in the prostate gland led to a localized antitumor action [33]. L-377202 has shown a good tolerance in patients at equivalent dose on a molar basis (NCT00987753) [34]. Nevertheless, the clinical phases II and III of the present clinical trial have never raised. Other cytotoxic drugs (paclitaxel, nitrogen mustard, vinblastine and methotrexate) have also been conjugated with PSA-activated peptide [35]. Among them, PSA-activated vinblastine prodrug has shown an excellent antitumor efficacy

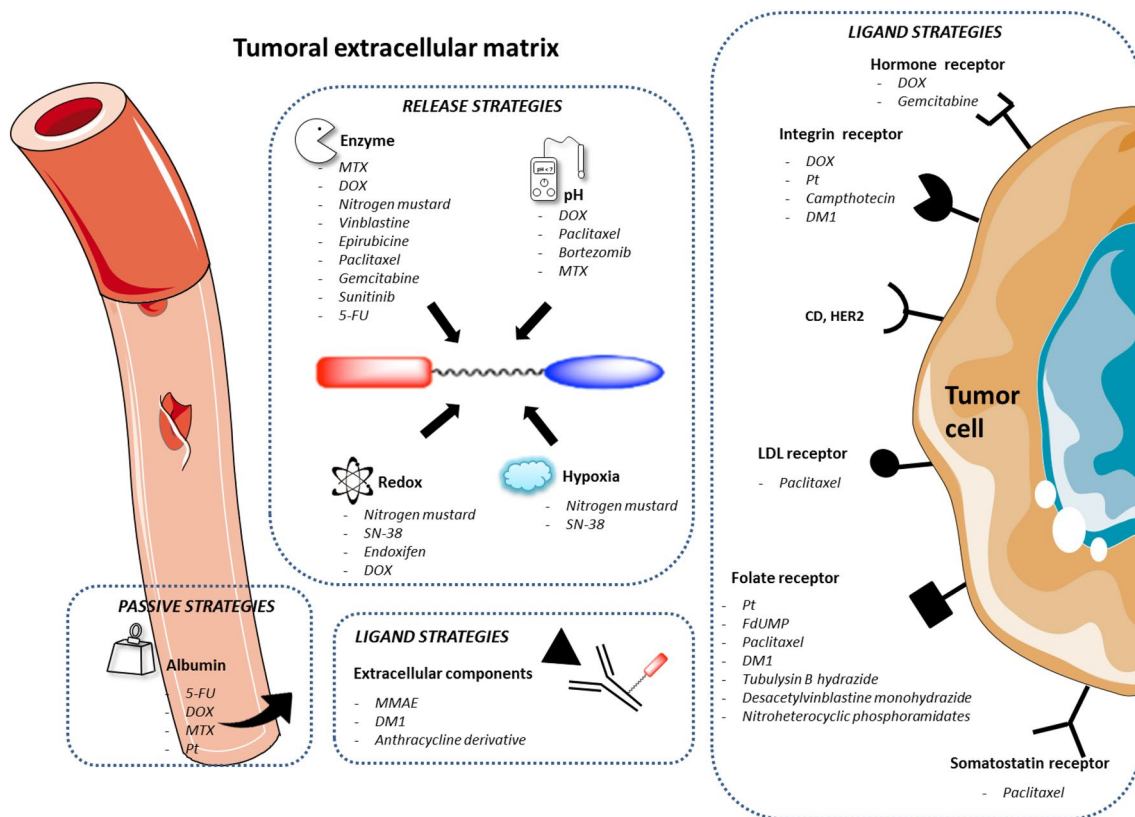


Fig. 5 Use of the tumor microenvironment or the tumor cell as a targeting strategy (Servier Medical Art)

Table 2 Enzyme-specific prodrugs

Target	Parent drug	Linker	Activity	References
Matrix-metalloproteinase	MTX	Matrix-metalloproteinase specific peptide: Pro-Val-Gly-Leu-Ile-Gly (PVGLIG)	In vivo efficacy on Glioblastoma, fibrosarcoma and bladder carcinoma xenografted tumor	[31]
Prostate specific antigen	DOX	Gly-Ile-Val-Gly-Pro-Leu (GIVGPL) PSA-specific peptide: His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln-Leu	Enzymatic activation validation, in vitro activity on a panel of prostate cancer cell line	[33]
Cancer associated fibroblasts	Nitrogen mustards Vinblastine Vinblastine	PSA-specific peptide: Glu-Hyp-Ala-Ser-Chg-Gln	Validation of in vitro proof of concept	[35]
		PSA-specific peptide: Hyp-Ser-Ser-Chg-Gln-Ser-Ser-Pro	In vivo proof of concept on tumor bearing mice	[36]
		Fibroblast protein specific peptide: Gly-Pro	In vivo efficacy on a panel of xenografted tumor (lung, liver and breast cancer)	[38]
	DOX	Fibroblast protein specific peptide: Gly-Pro	Evaluation of the toxicological profile and the safety pharmacological property of FAP α -targeting prodrug of doxorubicin in vitro and in vivo	[39]
Cathepsin B	Epirubicin	Fibroblast protein specific peptide: Gly-Pro	Similar in vivo efficacy and no visible cardiotoxicity side effects compared to free EPI	[40]
		Ac-Phe-Lys: dipeptide specific for cathepsin B Cathepsin B specific peptide: Gly-Phe-Leu-Gly	In vivo efficacy and toxicity study Phase II study in the treatment of breast, non-small cell lung and colorectal cancer	[42] [44]
Thymidine phosphorylase	Paclitaxel	Polyglutamate residue specifically digested by Cathepsin B	Phase III trial in non-small cell lung and ovarian cancer	[45]
	Gemcitabine	Cathepsin B-sensitive maleimide linker	In vivo efficacy superiority compared to gemcitabine	[67]
	Sunitinib	Cathepsin B specific peptide: Phe-Lys	In vitro and ex vivo Validation cathepsin B cleavage	[48]
	Vedotin	cathepsin B specific peptide: Val-Cit	Approved in refractory or recurrent Hodgekin's lymphoma and large cell anaplastic lymphoma, primary cutaneous large cell anaplastic lymphoma, Hodgekin's lymphoma stage III or IV	[47]
Endopeptidase	DOX	Fluoropyrimidine carbamate moiety	Increased safety and efficacy compared to free 5-FU in more several tumor grafted models	[56]
		Conjugation of albumin	Improvement of the circulation in blood stream and better PK/PD properties	[59]
Legumain	DOX	Endopeptidase specific peptide: Glu-Hyp-Ala-Ser-Chg-Gln-Ser-Leu Legumain specific peptide: Ala-Ala-Asp-Leu peptide	Phase I trial led to showing a good tolerable and safe prodrug with partial response in patient with soft-tissue sarcoma A phase II is recommended In vivo efficacy and improved therapeutic index were observed	[61] [68]

with slight side-effects on prostate human tumor xenograft and dogs [36].

Fibroblast activation protein α

Targeting tumor cancer-associated fibroblasts (CAFs) is also a strategy in order to release the cytotoxic drug into the tumor environment. Fibroblast activation protein α (FAP α) is an enzyme overexpressed by CAFs as well as in pericytes in human epithelial cancers [37]. Recently, Chen et al. have developed a FAP α -activated vinblastine prodrug by conjugation of the peptide Gly-Pro (Z-Gly-Pro), in order to overcome resistance to vascular disrupting agents through pericytes targeting, which has shown efficacy in tumor xenografts of carcinomas [38]. DOX was also tested in combination with the FAP α -cleaved peptide Z-Gly-Pro; the solubility of DOX was enhanced and the first clinical results in mouse and dog models have shown a reduced toxicity compared to DOX with a comparable antitumor efficacy [39]. The prodrug Z-Gly-Pro epirubicin also has shown a better therapeutic index in mouse model [40]. However, no clinical trials are ongoing for this kind of prodrugs.

Cathepsin B

Cathepsin B is a cysteine protease present in the lysosome as well as in the extracellular matrix. Its overexpression is correlated with invasive and metastatic cancers [41]. Regarding cathepsin B-cleavable tumor-targeting prodrug, Shao et al. have designed a cathepsin B-activated DOX prodrug, Ac-Phe-Lys-PABC-ADM [42], enhancing efficacy and reduced side-effects in gastric cancer peritoneal carcinomatosis mouse model. Other cathepsin B-activated prodrugs of DOX (PDOX) have been developed with a different linker, Gly-Phe-Leu-Gly. PDOX has shown a similar antitumor activity but reduced toxicities in carcinoma-bearing rabbits [43]. Another DOX prodrug made of [*N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide] copolymer and DOX linked by a tetrapeptide spacer cleavable by lysosomal cathepsins (FCE28068 or PK1) has been evaluated in patients with non-small cell lung, breast and colorectal cancer. PK1 takes advantage of the EPR effect and specific cleavage. Moreover, PK1 has shown a good tolerance and efficacy in phase II clinical trial [44]. Paclitaxel prodrug was also developed with the dual strategy “EPR and cathepsin B-cleavable linker” with combination of paclitaxel between degradable polymers made of L-glutamic acid residues (PPX for Paclitaxel polyglumex). PPX has shown in phase III in patients with non-small cell lung cancer a similar efficacy compared docetaxel but an increased neurotoxicity and lower neutropenia and alopecia [45]. Under the trade name Opaxio[®], PPX has been withdrawn of the application for marketing authorization by the

European Medicines Agency (EMA) in 2009 because of the neurotoxicity.

More recently, a multifunctional tumor-targeting cathepsin B-sensitive gemcitabine prodrug has been developed to take advantage of the specific cleavage by cathepsin B in the tumor cell as well as the *in vivo* covalently bound with the circulating albumin. This dual strategy has shown a better antitumor efficacy in mouse breast tumor xenografted model [46]. Finally, a new ADC obtained by the conjugation of Brentuximab, a mAb targeting specifically CD30 surface receptors on the surface of activated B and T cells, to the antimetabolic agent vedotin was designed. The conjugation is fulfilled thru a valine–citrulline linker specifically cleaved inside the lysosome by lysosomal cysteine proteases such as cathepsin B. This ADC is approved in refractory or recurrent Hodgkin’s lymphoma and large cell anaplastic lymphoma, primary cutaneous large cell anaplastic lymphoma, Hodgkin’s lymphoma stage III or IV and is commercialized under the trade name Adcetris[®] [47].

In addition to the work on CT, developments are also being made on tyrosine kinase inhibitors, such as sunitinib, the VEGFR inhibitor. Sunitinib prodrug was prepared by conjugation of sunitinib to a cathepsin B cleavable dipeptide. Preliminary *in vitro* data have shown similar efficacy compared to sunitinib alone; *in vivo* investigations are needed to appreciate the potential increased therapeutic index [48].

This strategy seems to be promising but no prodrugs have gone through the phase III of clinical trial.

Thymidine phosphorylase and others

The enzyme thymidine phosphorylase is necessary to convert fluoropyrimidines-based prodrug such as 5-fluorouracil (5-FU) into the antimetabolite agent. This enzyme is overexpressed in tumor cells, which leads to an increase of the fluoropyrimidine-based prodrug concentration into the tumor tissue [49]. 5-FU is a cytotoxic agent that has been widely investigated in order to improve its therapeutic index. Briefly, 5-FU is administered by intravenous injection (IV) due to an unpredictable gastrointestinal absorption and a fast degradation. To overcome the drawbacks of IV injection, such as infection risks, oral prodrugs of 5-FU have been developed. The first oral 5-FU prodrug, tegafur, was developed in 1967 [50] leading to the release of 5-FU after hepatic biotransformation (mainly by CYP2A6), but has shown neurotoxicities and is used in association with uracil to overcome these side-effects [51]. Tegafur has also been integrated in a therapeutic cocktail (S-1 cocktail) with an inhibitor of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) to increase the 5-FU half-life, and, an inhibitor of 5-FU phosphorylation in the gastrointestinal tract to decrease the gastrointestinal toxicities. S-1 cocktail has shown a high efficacy but also high incidence of side-effects during the

phase II trial [52]; nevertheless it has been approved for the treatment of advanced gastric cancer by the EMA in 2011 (Teysuno[®]) but not by the Food and Drug Administration (FDA). Another oral prodrug has been developed taking advantage of metabolic pathway enabling the liberation of 5-FU to decrease the dose limiting due to hematotoxicity, the doxifluridine. The pyrimidine phosphorylase required for the transformation of doxifluridine into 5-FU is practically absent in the bone marrow [53]. A Japanese study did not show any significant advantages of doxifluridine over 5-FU in rectal cancer in clinic [54]. Besides, doxifluridine has been also studied with intravenous injections. Nevertheless, the phase II clinical trial of doxifluridine in patients with advanced ovarian cancer has shown toxic deaths and severe neurotoxicities; doxifluridine could pass through the blood–brain barrier more easily than 5-FU [55]. Capecitabine (Xeloda[®]), a derivative of doxifluridine, is not metabolized by intestinal cells with a nearly complete absorption and concentrates mostly into tumor cell to give 5-FU by metabolism through a cascade reaction of three enzymes with the last step by thymidine phosphorylase [56]. Nowadays, capecitabine is widely used in antitumor treatments. However, a recent meta-analysis has concluded no difference in overall survival and progression-free survival between 5-FU, capecitabine and S-1 in advanced gastric cancer, while lower toxicities with S-1 were observed [57]. Fukushima et al. have developed DFP-11207, which is a combination with precursor form of 5-FU (1-ethoxymethyl-5-FU), an inhibitor of 5-FU degradation (5-chloro-2,4-dihydroxypyridine) and an inhibitor of 5-FU phosphorylation (citrazinic acid). Pharmacokinetic study on rats has shown, after an oral administration, a lower C_{max} and longer half-life compared to the other 5-FU prodrugs, and a similar efficacy of 5-FU but lower toxicities [58]. A phase I is ongoing in solid tumors (NCT02171221).

Other developments aim to increase the half-life and the biodistribution of 5-FU, such as an albumin-bound 5-FU prodrug, which forms a drug–albumin conjugate nanoparticle after administration [59].

Endopeptidase

More recently, a first-in-man phase I study investigated the safety and pharmacokinetic parameters of DOX prodrug DTS-201 (ALAL-DOX). This prodrug is cleaved into tumor tissue by extracellular tumor-specific endopeptidases, neprilysin and thimetoligopeptidase. Preclinical evaluations have shown clearly difference in pharmacokinetic and tissue distribution between DOX and DTS-201 after equimolar administration: with DTS-201, normal tissue were much less exposed to DOX (i.e. area under the curve (AUC) of DOX in the heart normal tissue is decreased of 93% after DTS-201

administration), whereas the exposure of the xenografted tumors was almost doubled [60].

It has shown a better cardiac safety profile at doses of DOX higher than those usually used (threefold increase) [61] and a phase II trial is ongoing. A second generation of tetrapeptidic enzyme-activated DOX prodrug, ALGP-DOX, has demonstrated a tolerated dose 30- to 40-fold higher compared to DOX in patient-derived soft tissue sarcoma xenograft model. The modification of the tetrapeptidic sequence could offer a better prodrug stability and tumor specificity [62].

Legumain

Legumain is a lysosomal protease elevated in several solid tumors such as breast, ovarian, colon and prostate cancer as well as in tumor-associated macrophages and intra tumoral blood vessels [63]. Wu et al. have developed a legumain-activated DOX prodrug (LEG-3) which has shown a better therapeutic index (lower toxicity and better efficacy) in CT26 mouse model [64]. More recently, DOX was conjugated to legumain-cleavable carboxyl-terminated poly(ethylene glycol) via the Ala-Ala-Asp-Leu peptide (4-arm PEG-AANL-DOX) which is known to be a good legumain substrate. Besides, this prodrug could self-assemble into nanoparticles and by consequence takes advantage of the so-called EPR effect. The 4-arm PEG-AANL-DOX has shown in vivo efficacy in human melanoma model comparable to DOX without toxicities [65]. The etoposide agent was also conjugated to legumain-cleavable peptide, Ala-Ala-Asp-ethylenediamine and this prodrug has shown a better cytotoxicity activity in vitro on tumor cell models [66]. Recent studies established on neuroblastoma mostly in children using high-dose of therapeutic treatment were fulfilled, but their use are so far limited. The authors synthesized 6-maleimidocaproyl-AANL-DOX (EMA-AANL-DOX) which has shown lower toxicities in vivo neuroblastoma human cell than DOX. The advantage of EMA-AANL-DOX over previous legumain-cleavable prodrugs is the presence of 6-maleimidocaproyl which is protective, as well as it can bind to serum albumin (SA) and by consequence benefit from the EPR effect [46]. The therapeutic strategy with legumain-cleavable based prodrug is recent and no clinical trial is yet on going.

pH-specific release

Abnormal structure of tumor vasculature along with abnormal blood flow lead to a heterogeneity of oxygen concentration which is lower in the microenvironment of the tumor. By consequence, the low level of oxygen triggers an anaerobic metabolism for the tumor cell and the production of lactic acid and CO_2 . This phenomenon promotes an acidic microenvironment in tumor between pH 6.0 and 6.8 and

in endosome/lysosome ($\text{pH} < 5.5$) which is different from the physiological pH observed in healthy cells ($\text{pH} \approx 7.4$). Among the design of prodrug strategies, pH-cleavable prodrugs are investigated to specifically target the acidity of tumors (Table 3). Different linkers have been developed using polymers responsive to tumoral low pH [polymers having imidazole groups or poly(β -amino ester)]. Paclitaxel has been linked to an imidazole derivative and has shown in vivo increased efficacy on carcinoma mouse model compared to paclitaxel alone [69]. On the other hand, linkers have been synthesized using polymers responsive to intracellular pH (mostly prodrugs with hydrazone bond) [70] with a main focus on the use of DOX as active entity [71–73]. Besides, one of the most interesting challenges of vectorized treatment is to target the bone tissue where metastases are often found. Recently, researchers have studied a bortezomib (BTZ) pH-based prodrug made of co-encapsulated BTZ with aryl boronate group as acidity-labile linker, and alendronate as bone-targeting ligand. This strategy takes advantage of the EPR effect, pH-cleavable linker and active targeting. This prodrug has shown a good efficacy in vivo in bone metastasis human breast adenocarcinoma model; decreased bone destruction was also underlined [74]. MTX was also studied as pH-sensible prodrug; it was coupled to 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[aldehyde-(polyethyleneglycol)-2000] (DSPE-PEG-Imine-MTX) and the obtained complex showed the ability to self-assemble into micellar nanoparticles. Combining the EPR effect and the imine-pH cleavable linker, DSPE-PEG-Imine-MTX has

shown promising efficacy in vivo in human cervical carcinoma model [75].

Nevertheless, none of these pH-responsive prodrugs is involved on clinical trial for now.

Hypoxic-sensitive release

The formation of abnormal physiopathology of tumor tissue leads to hypoxia. Hypoxia is widely described as a biomarker of malignancy and an obstacle in drug therapy. Taking advantage of the hypoxic environment, several DDS have been developed with a specific hypoxic sensitivity. Among them, hypoxia-activated prodrugs (HAPs), which are specifically cleaved by reductive enzymes with a bioreductive group, have been designed (Table 4). Their developments involve the conjugation of the 2-nitroimidazole moiety to different anticancer drugs. One of the most clinically advanced hypoxia-activated prodrugs, evofosfamide (TH-302), was obtained by conjugation with the DNA cross-linking toxin bromo-isophosphoramidate mustard (Br-IPM). However, TH-302 did not show effective results in phase III trials in locally advanced, unresectable or metastatic soft-tissue sarcoma [76]. Nevertheless, TH-302 is widely studied in others malignancies tumors; such as in i) relapse/refractory multiple myeloma with a positive phase I/II trial [77], ii) patients with aggressive human papillomavirus-negative head and neck squamous cell carcinoma [78], iii) combination with sunitinib in neuroblastoma [79], iv) melanoma xenograft models [80], v) nasopharyngeal carcinoma

Table 3 Acidic pH specific prodrugs

Target	Parent drug	Linker	Activity	References
Acidic pH	Paclitaxel	pH sensitive imidazole moiety	Similar cell toxicity and improved efficacy in vivo compared to free paclitaxel	[69]
	DOX	pH sensitive hydrazone moiety	Similar cell toxicity and improved efficacy in vivo compared to free DOX	[71]
	Bortezomib	pH sensitive aryl boronate moiety	Reduced systemic toxicity and improved therapeutic effects compared to free bortezomib	[74]
	MTX	pH sensitive imine moiety	Increased of the in vitro and in vivo anticancer activity	[75]

Table 4 Hypoxic environment specific prodrugs

Target	Parent drug	Linker	Activity	References
Hypoxic environment	Nitrogen mustard	Hypoxia sensitive nitroimidazole moiety	Promising phase II results in multiple myeloma patients	[77]
			Failed in phase III trial in soft tissue sarcoma	[76]
	Nitrogen mustard	Hypoxia sensitive nitroaromatic moiety	Validated a phase I clinical trial but increased hematotoxicity	[86]
			Phase I/II this prodrug is unlikely to be successful for long-term leukemia control because of on-target toxicity	[88]
SN-38	Hypoxia sensitive nitroimidazole moiety	The proof of concept was validated in vitro	[85]	

xenograft models [81], vi) recurrent bevacizumab-refractory glioblastoma with positive phase I trial [82], vii) osteosarcoma xenograft model [83], and viii) combination with radiotherapy in human orthotopic pancreatic tumor model [84]. This strategy was then applied to design a new prodrug by conjugation of the nitro-imidazole moiety to SN-38, the principal metabolite of irinotecan, showing the capacity of being a promising hypoxia-selective antitumor agent [85]. Besides, PR-104 is a phosphate ester that is hydrolyzed through hypoxia-activated pathway releasing nitrogen mustard. Nevertheless, a clinical trial phase I in advanced solid tumors has shown severe side-effects such as myelotoxicity [86]. Indeed, Guise et al. have demonstrated a second mechanism for PR104 activation through hypoxia-independent aldo-keto reductase 1C3 enzyme [87], which is highly expressed in acute myeloid leukemia (AML) blast [78]. For this reason, PR-104 has been investigated in a phase I/II trial (NCT 01037556) in relapsed or refractory AML and has shown a threefold-higher AUCs due to overexpression of this enzyme into AML blasts compared to other solid tumors. Nevertheless, severe gastro-intestinal toxicities and myelosuppression have been reported and PR-104 did not provide efficacy evidence [88].

Reactive oxygen species-sensitive release

It has now been demonstrated that cancer cells exhibit increased intrinsic oxidative stress leading to an increased amount of reactive oxygen species (ROS) compared to normal healthy cells, such as superoxide anion, hydrogen peroxide and the hydroxyl radicals. These high levels of ROS in cancer cells contribute to cancer-cell proliferation, DNA alterations, apoptosis, metastasis, angiogenesis and alteration in the cellular sensitivity to anticancer agents [89]. Consequently, ROS production has been used as a target to design new ROS-activable prodrug which would be activated in the presence of high amounts of ROS (Table 5). As described by Saravanakumar et al., numerous ROS-responsive linkers can be used to design these prodrugs [90]. However, boron-based linkers have been widely developed in the past decade by designing several prodrugs by conjugation of numerous anticancer compounds to boronate moieties.

Among the anticancer drugs used with this strategy, we can find nitrogen mustards [91], SN-38 [92], endoxifen (non-steroidal selective estrogen receptor modulator) [93] and more recently DOX [12]. All these new prodrugs showed interesting results as the proof of concept of ROS activation was validated in vitro. Nevertheless, the type of linker, its sensitivity to be cleaved and its placement in the molecule structure govern the kinetic of the drug release as each linker has its own advantages and limitations. In regards to arylboronate linkers, there is the generation of harmful quinone methide upon degradation of the arylboronate, which remains a main concern for the clinical development [90].

High weight molecule-conjugate prodrug: serum albumin

The abnormality of the blood vasculature and lymphatic drainage lead to an accumulation of plasmatic protein such as SA into the tumor tissues. Moreover, SA has a biological half-life of 19 days, mostly due to its recognition by FcRn. Researchers have investigated the binding between SA and chemotherapy agents (Table 6) in order to take advantage of EPR effects and they have shown enhanced pharmacokinetic parameters of the active moiety. Since 1994, researchers have investigated albumin–drug conjugates; Gabor et al. have shown promising in vitro results of albumin–DOX conjugates against Ewing’s sarcoma [94]. DOXO-EMCH (also called INNO-206 or aldoxorubicin) binds to the circulating albumin and accumulates into the tumor. Moreover, this DOX-derivative contains an acid-sensitive hydrazone linker that releases the cytotoxic drugs in acidic microenvironment [95]. The phase I and phase II in soft tissue sarcoma have shown a better antitumor activity compared to DOX with a well-tolerated cumulative dose (more than fivefold the median cumulative dose of DOX) [96]. Pharmacokinetic study has shown a narrow volume of distribution (0.3 L/kg versus 72 L/kg at DOX equivalent dose) which means that aldoxorubicin remains into the blood stream and does not accumulate in the body [95]. Then a small concentration of free-DOX and DOX metabolite has been found into the systemic compartment and urine that means aldoxorubicin has bounded to albumin and few DOX was released from

Table 5 ROS specific prodrugs

Target	Parent drug	Linker	Activity	References
Reactive oxygen species (ROS)	Nitrogen mustards	ROS sensitive arylboronate or boronic acid moieties	The proof of concept was validated in vitro	[91]
	SN-38	ROS sensitive arylboronate or boronic acid moieties	The proof of concept was validated in vitro	[92]
	Endoxifen	ROS sensitive arylboronate or boronic acid moieties	validated in vitro	[93]
	DOX	ROS sensitive arylboronate or boronic acid moieties	and in vivo	[12]

Table 6 Albumin targeting prodrugs

Target	Parent drug	Linker	Activity	References
Albumin	DOX	Acid-sensitive hydrazone linker	Clinical trials in sarcomas, small-cell lung cancer, glioblastoma	[95]
	DOX	Ile-Ala-Gly-Gln (MMP2-sensitive)	In vivo: melanoma model	[98]
	DOX	Ala-Leu-Ala-Leu (Cathepsin B-sensitive)	In vivo: colon model	[99]
	DOX	6-Maleimidocaproic acid-Arg-Arg-Ser-Ser-Tyr-Tyr—Ser-Gly (PSA-sensitive)	In vivo: prostate adenocarcinoma model	[100]
	MTX	No linker: simple Amide bond	Phase II in RCC: failed	[103]
	Oxaliplatin	Mono-maleimide moiety	In vivo in CT-26 model: tumor regression	[104]

RCC renal cell carcinoma

aldoxorubicin [97]. Phase III is being investigated in soft tissue sarcomas (NCT02049905), a phase II in recurrent small cell lung cancer (NCT02200757), a phase II in glioblastoma (NCT2014844) and a phase II in HIV-related Kaposi's sarcoma (NCT02029430). Albumin-binding prodrugs of DOX have been investigated with other enzyme-sensible linkers such as Ile-Ala-Gly-Gln for a cleavage by MMP-2 [98], Ala-Leu-Ala-Leu for a cleavage by cathepsin B [99], 6-maleimidocaproic acid-Arg-Arg-Ser-Ser-Tyr-Tyr—Ser-Gly for a cleavage by PSA [100].

Other cytotoxic agents have been investigated such as MTX, drug with a short half-life due to renal elimination leading also to nephrotoxicity. MTX has been bounded to SA in order to limit the renal elimination and promote the tumor uptake rate. The bioconjugate has shown therapeutic activity in various cancers without toxic side-effects [101]. A phase I in cancer patients confirmed a well-tolerated treatment [102]. Unfortunately, no objective responses have been demonstrated in phase II in renal cell carcinoma [103]. Platinum complexes (oxaliplatin and cisplatin) bounded to mono-maleimide as promoieties have been studied; only oxaliplatin derivatives that have shown outstanding antitumor activity are presented, which will now be further developed towards clinical phase I trials [104]. The difference in antitumor activity between oxaliplatin and cisplatin derivatives might be explained by different extravasation potency or different affinity for glycoprotein 18 and 30, which are involved in the recognition of conformationally modified albumin molecules.

Tumor-specific ligand

The active targeting strategy takes advantage of the cellular difference between healthy cells and tumor cells. The targeting ligands can be classified into three groups according to the place where tumor-specific or overexpressed antigen is presented: (1) the tumor cell surface, (2) the endothelial cell surface or (3) the extracellular matrix cells surface. Proteins (monoclonal antibody), peptides (Arg-Gly-Asp (RGD)

peptides, poly-Arg peptides) and small molecules have been investigated to target selectively cancer cells (Table 7).

Immuno-driven DDS

Antibody–drug conjugates The coupling of a cytotoxic agent to a monoclonal antibody (mAb) is called immuno-conjugate or antibody–drug conjugate (ADC). ADC offers a strategy to improve the tolerance/efficacy balance for highly cytotoxic molecules. Indeed, mAb brings target specificity and, consequently, improves the pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) of these molecules and some of them have obtained their approval from either the FDA or the EMA (Table 8). There are two types of release of the agents: ADC can be cleaved externally via a cleavable linker (non-internalizing mAb) or inside the cell after endocytosis with a non-cleavable linker (internalizing mAb). The highest advantage of non-cleavable linkers compared to cleavable linkers is their plasma stability and by consequence, an optimized therapeutic window mostly due to reduced off-target toxicity. The PK of ADC is complex because it takes into account the PK characteristics of the cytotoxic molecule, the mAb, as well as the physicochemical properties of the linker. It is nevertheless greatly influenced by the PK of the mAb as the latter represents more than 90% of the molecular weight. Besides, sizes ranging of ADC are from 10 to 100 nm and can benefit of EPR effect as well. The first ADC to receive marketing authorization (MA) was Mylotarg[®], conjugation of ozogamicin with gemtuzumab (mean drug:Ab ratio (DAR) 1.5) bounded by an acid-cleavable hydrazine [105]. Ozogamicin is a derivative of calicheamicin, a highly cytotoxic antibiotic, and gemtuzumab is an IgG4 anti-CD33, a surface marker expressed on cells of the myeloid line. Mylotarg[®] received the MA in 2000 from the FDA for the indication of relapsed AML but was withdrawn in 2010 and then reinstated in 2017 with a dosage regimen optimization including a lower dose [106]. Its withdrawal in 2010 was due to off-target reactions, particularly in hepatic tissue where K_upffer cells also express

Table 7 Immuno-driven prodrugs

Target	Parent drug	Ligand	Linker	Activity	References
Integrin receptor	DOX	RGD	Polyethylene glycol chain	Increased in vivo efficacy	[143]
	Pt	RGD	Amide bond	In vitro: greater the number of bounded RGD, greater is the internalization and efficiency	[120]
Hormone receptor	Camptothecin	RGD	Dipeptide alanine-citrulline or phenylalanine-lysine + glycol chain	In vitro: shorter is the glycol chain, lower are the solubility and the affinity for receptor	[121]
	DM1	RGD	PEGP (TMC-co-Poly(pyridyldisulfide cyclic carbonate) [PDSC]) and Mal-PEG-P (TMC-co-PDSC) copolymers	In vivo: increase efficacy in human breast model	[123]
LDL receptor	DOX	Small peptide agonist to LHRH receptor	Peptidic bond	Phase II ovarian cancer, prostate cancer), III (endometrial cancer)	[125–127]
	Gemcitabine	Gonadotrophin releasing hormone receptor ligand peptide	Succinate linker	Efficacy in human prostate model	[128]
Somato-statin receptor	Paclitaxel	Angiotenp-2	Cleavable ester linkage	Phase I in recurrent glioma, phase II for brain metastasis from breast or lung cancer	[130, 144]
	Paclitaxel	Octreotide	Polyethylene glycol chain	Efficacy in non-small cell lung cancer model	[132]
Folate receptor	Nitroheterocyclic phosphoramidates	Pteric acid	Lysine	In vitro: no satisfactory cytotoxicity	[133]
	Pt	Folic acid	Polyethylene glycol	In vitro: no increased cytotoxicity compared PEG-Pt	[134]
Folate receptor	N 5-fluoro2'-deoxyuridine-5'-O-monophosphate (FdUMP)	Folic acid	Phosphodiester linkage	In vitro: increased cytotoxicity on 5-FU resistant cells	[135]
	Paclitaxel	Folic acid	Ester linker	In vivo: no increased efficacy	[136]
Folate receptor	DM1	Folic acid	Disulfide linker	In vitro: increased cytotoxicity	[137]
	Desacetylvinblastine monohydrate	Folic acid	Endosome-cleavable disulfide bond	Phase III in Pt-resistant ovarian cancer: failure in improvement progression-free survival	[139]
Folate receptor	Tubulysin B hydrazide	Folic acid	Water soluble saccharo-peptide spacer	Phase I in advanced solid tumors	[145]
	Paclitaxel	Folic acid + evans blue (derivative for albumin bonding)	Ester linker	In vivo: Increased circulation half-life, more delivered paclitaxel into tumor and better efficacy	[141]
DOX	<i>trans</i> -Activating factor	Ala-Ala-Asp	Breast cancer model	[142]	

Table 8 Approved ADC by FDA and EMA

Target	Parent drug	Ligand	Linker	Activity	References
CD33	Ozogamicin	Gemtuzumab	Acid-cleavable hydrazone	Approved drug in relapsed AML	SmPC Mylotarg [®]
CD30	Vedotin	Brentuximab	Maleimide group-valine-citrulline-para-aminobenzyl carbamate	Approved in refractory or recurrent Hodgkin's lymphoma and large cell anaplastic lymphoma, primary cutaneous large cell anaplastic lymphoma, Hodgkin's lymphoma stage III or IV	SmPC Adcetris [®]
CD22	Ozogamicin	Inotuzumab	Acid-labile acetyl butyrate	Relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia with B precursor	SmPC Besponsa [®]
HER2	DM1	Trastuzumab	Amide bond	HER2 positive, metastatic or locally advanced, unresectable breast cancer	SmPC Trastuzumab [®]

SmPC summary of product characteristics

CD33 [107], leading to patient deaths (study SWOG S0106). The second ADC to receive MA by FDA (2011) and EMA (2012) was Adcetris[®] for refractory or recurrent Hodgkin's lymphoma and large cell anaplastic lymphoma. This ADC has also received MA in primary cutaneous large cell anaplastic lymphoma (FDA-2017 and EMA-2017) and more recently in first-line treatment against Hodgkin's lymphoma stage III or IV (FDA-2018) [47]. Adcetris[®] is composed of the antimetabolic monomethylauristatin E (MMAE or vedotin) and the IgG1 brentuximab. MMAE which belongs to the antimetabolic and antimicrotubule family is 50- to 200-fold more active than vinca-alkaloid. Brentuximab specifically targets CD30 surface receptors on the surface of activated B and T cells. The binding between the mAb and the cytotoxic agent (mean DAR 3.9) is made of a maleimide group, protease (cathepsin)-cleavable linker (valine-citrulline) and para-aminobenzyl carbamate spacers. This peptide-based linker is stable under physiological conditions, but, after internalization, is cleaved inside the lysosome by lysosomal cysteine proteases such as cathepsin B. Recently, the ADC, named Besponsa[®], received MA in 2017 for in acute lymphoblastic leukemia (ALL) with B precursor, CD22 positive, relapsed or refractory. This ADC is made of ozogamicin and IgG4 inotuzumab (mean DAR 5.1) linked by an acid-labile acetyl butyrate linker, more stable in bloodstream than the linker used in Mylotarg[®] [108]. Inotuzumab specifically targets the CD22 surface protein present on B cells.

Regarding treatment of solid tumors, the PK biodisponibility is more complex because ADC has to diffuse to the targeting tissue. The parent drug maytansine—or DM1—is widely investigated. It is a vinca-alkaloid derivative, a potent inhibitor of microtubule assembly, 25–400 times more active than paclitaxel and 100–5000 times more active than DOX [109]. However, it failed as an anticancer agent in human clinical trials because of its lack of tumor specificity associated with an important systemic toxicity. DM1 has been linked to trastuzumab to afford T-DM1 with a mean DAR 3.4 via succinimidyl-*trans*-4(maleimidylmethyl) cyclohexane-1-carboxylate, a stable thioether linker that binds the

mAb lysine residues [110]. Trastuzumab (Herceptin[®]) is a IgG1 mAb targeting extracellular domain of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2 receptor, also known as neu, ErbB2, *p185^{HER2}*) and is widely used in the treatment of HER2 receptor positive breast cancer since 1998 in the United States and 2000 in Europe. This new ADC showed a similar drug release compared to Cantuzumab-DM1. Unlike Cantuzumab-DM1, the bond that connects the two entities is not cleavable by enzymes or reducing agents (e.g. glutathione) but the release of the cytotoxic agent is done by catabolism of the antibody after internalization in the targeted cancer cell. T-DM1 conjugate design led to favorable pharmacokinetic properties with an increased half-life from 2 to 44 h and an increased area under the curve by 60-fold [111]. T-DM1 (Kadcyla[®]) received MA in 2013 (FDA) and 2014 (EMA) in HER2 positive, metastatic or locally advanced, unresectable breast cancer previously treated with trastuzumab and a taxane. However, many DM1 or DM4-coupled mAbs failed as anticancer agents in clinical trials [112]. The reasons for discontinued ADCs are due to off-target effect with unacceptable toxicities (for example Bivatuzumab-DM1 has shown a fatal dermal toxicity in phase I leading to stop the development; Bivatuzumab targets CD44v6, receptor abundantly present in head and neck squamous cell carcinomas but also on normal keratinocytes [113]). It was discontinued also for the lack evidence of clinical activity [112].

The previously mentioned ADC target a receptor present on the surface of the tumor cell. A recent strategy aims to develop non-internalizing ADC targeting antigens overexpressed in the tumor extracellular matrix such as collagen IV, fibrin, fibronectin and tenascin-C [114]. Indeed Neri's team is investigating DM1 coupled with an antibody directed against fibronectin [115], MMAE and anthracycline derivative coupled with an antibody directed against tenascin-C through a valine-citrulline linker [114]. These ADCs have shown promising results in vivo in teratocarcinoma and human epidermoid carcinoma. The notable advantages are the accessibility of the extracellular matrix components and

the release of cytotoxic into the tumoral microenvironment may facilitate the diffusion and internalization in neighboring cells.

Approximately 222 clinical trials have been reported describing 82 different new ADCs that are listed on the clinicaltrials.gov website, 123 of them are currently under clinical evaluation.

Cancer-targeting ADC and more generally mAbs' uses are limited by the pharmacokinetic properties: Cellular up-take clearance due tumor tissue infiltration and reticulo-endothelial elimination via Fc fragments is the major parameter of the distribution of ADC.

Fragment-based antibody Over the past decades, the use of antibody-based therapeutics has grown exponentially leading to a revolution in biological drugs and has revolutionized targeted cancer therapies. However, the use of such therapeutics has limitation due to the large size of the scaffolds leading to the following: (1) poor penetration in the tumor, (2) important systemic accumulation and (3) slow clearance profiles. As the targeting capacity of Ab is achieved by a small variable loop, the selection of these small fragments has led to the design of small fragment-based prodrugs [116]. Aubrey et al. have recently developed two promising auristatin prodrugs targeting specifically HER2-positive breast cancer using this strategy. Their work was fulfilled by conjugation of auristatin to an engineered scFv fragment through maleimide linker. Their strategy was validated in vitro on HER2-positive breast cancer cells with activities in the subnanomolar range and no activity on HER2-negative breast cancer cells [117].

Peptides and small molecule-driven DDS

Investigation of peptide as drug delivery system conjugate offers some advantages compared to mAbs. Indeed peptides are easier to use (no tertiary structure, control of the drug ratio, lower immunogenicity), easier and less expensive to produce in large quantities. Upon peptide-receptor binding, the complex can undergo receptor-mediated endocytosis.

Integrin receptor targeting $\alpha_v\beta_3$ integrin is a protein involved in cell adhesion playing a major role in angiogenesis and tumor metastasis. This protein is overexpressed on the surface of tumor cell in glioma, melanoma, breast cancer and ovarian cancer [118]. RGD peptide has been shown to exhibit excellent binding affinity and selectivity for $\alpha_v\beta_3$ integrin [119]. Synthesis of RGD-derivative DOX, Pt and camptothecin has been investigated in order to give specificity and decrease toxicity, particularly cardiotoxicity for DOX and nephrotoxicity for Pt. Nevertheless, only promising in vitro data are available and need more investigations [120, 121]. Moreover, many studies are investigating

in the development of integrin-targeting DDS [122]. Recent study on cyclic RGD-functionalized micellar DM1 prodrug; compared to T-DM1, the cytotoxic loading is higher as well as the stability and the efficacy has been proved in vivo in human breast model [123].

Hormone receptor targeting Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) receptors is over-expressed in prostate and gynecological cancers [124]. A small peptide agonist to LHRH receptor has been conjugated to the DOX (AEZS-108). AEZS-108 has shown positive clinical results in ovarian cancer (phase II [125]), in castration- and taxane-resistant prostate cancer (phase I: [126]; phase II: [127]) and in endometrial cancer but the phase III did not improve efficacy or safety compared to DOX alone (NCT01767155). Besides, gemcitabine was coupled with gonadotrophin releasing hormone receptor ligand peptide with a succinate linker. The complex has shown efficacy in vivo in a castration resistant prostate cancer model [128].

LDL receptor targeting ANG1005, called GRN1005 or paclitaxel trevatide, is a prodrug designed from three molecules of paclitaxel coupled with angiopep-2. Angiopep-2 targets low-density lipoprotein receptors which are overexpressed on solid tumor and enhances the uptake through the blood-brain-barrier [129]. Its half-life is shorter compared to nab-paclitaxel (3.6 h vs 21.6 h, respectively) and paclitaxel alone (20.5 h) [129]. Several trials have been investigated with this prodrug in recurrent malignant glioma [130] (NCT01967810), in non-small cell lung cancer patients with brain metastases (NCT01497665; NCT02048059) and in breast or lung cancer patients with brain metastases (NCT01679743-ended in 2018).

Somatostatin receptor targeting Somatostatin receptor are G-protein-coupled receptors overexpressed in various cancer, therefore targeting somatostatin receptor has been proposed for anticancer strategy. Octreotide, an octapeptide that mimics natural somatostatin pharmacologically, has been used to develop drug delivery system. Huo et al. have studied the somatostatin receptor as a target for the delivery of paclitaxel. Paclitaxel presents a poor water solubility (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$); the currently formulation mixes Cremophor[®]EL and ethanol (Taxol[®]) in order to solubilize paclitaxel for intravenous injection. However, Cremophor[®]EL can lead to serious acute hypersensitivity reactions and other toxicities [131], therefore researchers have investigated new paclitaxel analog in order to increase specificity and especially solubility. The authors have developed a paclitaxel prodrug made of taxane and octreotide linked by polyethylene glycol chain (OCT-PEG-PTX). The paclitaxel prodrug solubility was hugely increased (30,000-fold) compared paclitaxel, and has shown a higher antitumor efficacy in somatostatin receptor

overexpressing non-small cell lung cancer cells [132] but no clinical data are currently available.

Folate receptor targeting The overexpression of folate receptor in many human cancers leads to developed folate-targeting prodrugs. DNA alkylating agents [133], platinum derivatives [134], 5-fluorouracil [135], paclitaxel [136] conjugates have been investigated for this purpose. Nevertheless, all cited folate receptor-specific prodrugs have shown no increased cytotoxicity in vitro and in vivo (for paclitaxel prodrug) compared to the parent drug except for folic acid (FA)-derivated 5FU which has proven enhanced efficacy on 5FU-resistant cells. FA has been linked to FdUMP and this conjugate is 10- to 25-fold more cytotoxic than 5-FU on human colorectal tumor cell lines. Ladino et al. have investigated the synthesis of DM1 bound to FA which has demonstrated high cytotoxicity on folate receptor positive carcinoma (KB), ovarian cancer (SK-OV-3) and colon cancer (Lo Vo, SW620) cell lines [137]; 10 years later Reddy et al. has confirmed the high specificity of folate-conjugated DM1 and the optimized therapeutic window. However, to our knowledge, this was only demonstrated in preclinical experiments [138].

EC145 (vintafolide), a conjugate of folic acid and a vinca-alkaloid compound (desacetyl vinblastine hydrazone) through an endosome-cleavable disulfide bond, has been evaluated in a phase I and II trial in advanced non-small lung cancer, ovarian and endometrial cancers [139]. The drug received orphan drug status in Europe in 2012 for the treatment of folate-positive Pt-resistant ovarian cancer in combination with pegylated liposomal DOX, but in 2014, Merck and Endocyte stopped its commercialization because of drug failure in improvement progression-free survival. Guertin et al. proposed the hypothesis that this failure is due to the implication of P-glycoprotein pump that trigger a folate-prodrug resistance [140]. A second-generation FA drug conjugate linked to tubulysin B hydrazone is under investigation in patients with advanced solid tumors (NCT01999738). EC1456) delivers higher doses than EC145,

Recently, Shan et al. have developed a dual-targeting prodrug of paclitaxel with bifunctional folate and albumin binding moieties for both passive and active targeted cancer therapy [141]. This prodrug has shown a prolonged blood circulation, enhanced drug accumulation in tumors and higher therapeutic index in vivo on human breast adenocarcinoma model.

Others Liu et al. have designed a DOX derivative conjugated to cell-penetrating peptides (TAF, *trans*-activating factor) with a legumain-sensible linker (alanine-alanine-asparagine), and loaded on liposomes (using PEG 2000) in order to combine different targeting ways [142]. TAF is known to promote the cell internalization capability of lipo-

somal NPs. The addition of the legumain-sensible linker to TAT has shown, in vitro, a decrease of 72.65% for its transmembrane transport capacity. Therefore legumain-sensible targeting has been used in vivo in breast cancer model to effectively recover the internalization capacity of TAF in tumor cells and tumor-associated macrophages which both upregulate legumain expression.

This complex DDS has shown a better therapeutic window on breast cancer mouse model.

Most of these the studies fulfilled with peptide-associated prodrug were carried out in the last decades. Taking into account the relative recentness of these studies the proof of concept in clinics is hard to establish as for today. Thus, none of the peptide-associated prodrug has successfully reached the therapeutic market, yet.

Conclusion

The intratumoral chemotherapies, surgery and radiotherapy, are widely used but their success is guaranteed only if the tumor presents a well-defined localization. In the field of cancer chemotherapy, the main goal is to facilitate the accumulation of active drugs in tumor tissues or in its microenvironment compared to normal tissues. The therapeutic effect of daily used chemotherapeutic agents is far from being optimal due to their poor specificity and/or insufficient access to the tumor. Indeed, non-local administration of chemotherapy needs the delivery of anticancer drugs from the blood to the tumor cell through a complex transport process. The antitumor drug vectorization (i.e. targeted drug delivery systems), allows, on one hand, to target the malignant cells, and on the other hand to avoid toxicities on non-malignant cells. Prodrug design has become an established concept and a powerful tool in optimizing daily used chemotherapy agents, overcoming their physicochemical and pharmaceutical issues. These modifications aim to improve tumor targeting, as the active compound is released only after an activation process is triggered near the target. Targeted prodrug drug delivery systems should be designed to facilitate the targeted delivery of anticancer agents to the tumor. In the present review, we have reported that several PBN-DDS strategies achieve this goal by combining the advantages of both prodrugs and nanotechnology. Nowadays, numerous PBN-DDS are under clinical trials suggesting that these new targeted compounds/DDS could have great potential to be used in clinical practice in the future. These prodrug delivery strategies are novel. Most of the investigations are from academic laboratories and are currently in preclinical or early stages clinical studies. The way to FDA or EMA approval is long and numerous prodrugs fail to obtain this invaluable sesame, the market authorization. However, these failures pave the way for future pharmaceutical development as in oncology,

and in other therapeutic areas, medicine will be always more precision (i.e. specific) medicine.

Funding This review work was not supported by any grant.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest All authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Lesniewska-Kowiel MA, Muszalska I (2017) Strategies in the designing of prodrugs, taking into account the antiviral and anticancer compounds. *Eur J Med Chem* 129:53–71. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.02.011>
- Singh Y, Palombo M, Sinko PJ (2008) Recent trends in targeted anticancer prodrug and conjugate design. *Curr Med Chem* 15(18):1802–1826
- Soyez H, Schacht E, Vanderkerken S (1996) The crucial role of spacer groups in macromolecular prodrug design. *Adv Drug Deliv Rev* 21(2):81–106. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(96\)00400-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(96)00400-0)
- Muller CE (2009) Prodrug approaches for enhancing the bio-availability of drugs with low solubility. *Chem Biodivers* 6(11):2071–2083. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900114>
- Heynick F (2009) The original ‘magic bullet’ is 100 years old—extra. *Br J Psychiatry* 195(5):456. <https://doi.org/10.1192/bjp.195.5.456>
- Albert A (1958) Chemical aspects of selective toxicity. *Nature* 182(4633):421–422. <https://doi.org/10.1038/182421a0>
- Rautio J, Kumpulainen H, Heimbach T, Oliyai R, Oh D, Jarvinen T, Savolainen J (2008) Prodrugs: design and clinical applications. *Nat Rev Drug Discov* 7(3):255–270. <https://doi.org/10.1038/nrd2468>
- Mahato R, Tai W, Cheng K (2011) Prodrugs for improving tumor targetability and efficiency. *Adv Drug Deliv Rev* 63(8):659–670. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.02.002>
- Gupta D, Gupta SV, Lee KD, Amidon GL (2009) Chemical and enzymatic stability of amino acid prodrugs containing methoxy, ethoxy and propylene glycol linkers. *Mol Pharm* 6(5):1604–1611. <https://doi.org/10.1021/mp900084v>
- Walther R, Rautio J, Zelikin AN (2017) Prodrugs in medicinal chemistry and enzyme prodrug therapies. *Adv Drug Deliv Rev* 118:65–77. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.06.013>
- Alouane A, Labruere R, Le Saux T, Schmidt F, Jullien L (2015) Self-immolative spacers: kinetic aspects, structure–property relationships, and applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 54(26):7492–7509. <https://doi.org/10.1002/anie.201500088>
- Ye M, Han Y, Tang J, Piao Y, Liu X, Zhou Z, Gao J, Rao J, Shen Y (2017) A tumor-specific cascade amplification drug release nanoparticle for overcoming multidrug resistance in cancers. *Adv Mater* 29(38):1702342. <https://doi.org/10.1002/adma.201702342>
- Bildstein L, Pili B, Marsaud V, Wack S, Meneau F, Lepetre-Mouelhi S, Desmaele D, Bourgaux C, Couvreur P, Dubernet C (2011) Interaction of an amphiphilic squalenoyl prodrug of gemcitabine with cellular membranes. *Eur J Pharm Biopharm* 79(3):612–620. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.07.003>
- Blanco E, Shen H, Ferrari M (2015) Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol* 33(9):941–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>
- Maeda H, Nakamura H, Fang J (2013) The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* 65(1):71–79. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.002>
- Greish K (2010) enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. In: Grobmyer SR, Moudgil BM (eds) *Cancer nanotechnology: methods and protocols*. Humana Press, Totowa, pp 25–37. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-609-2_3
- Nichols JW, Bae YH (2014) EPR: evidence and fallacy. *J Control Release* 190:451–464. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.057>
- Bansal R, Post E, Proost JH, de Jager-Krikken A, Poelstra K, Prakash J (2011) PEGylation improves pharmacokinetic profile, liver uptake and efficacy of interferon gamma in liver fibrosis. *J Control Release* 154(3):233–240. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.05.027>
- Choi KY, Min KH, Yoon HY, Kim K, Park JH, Kwon IC, Choi K, Jeong SY (2011) PEGylation of hyaluronic acid nanoparticles improves tumor targetability in vivo. *Biomaterials* 32(7):1880–1889. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.11.010>
- Piktel E, Niemirowicz K, Watek M, Wollny T, Deptula P, Bucki R (2016) Recent insights in nanotechnology-based drugs and formulations designed for effective anti-cancer therapy. *J Nanobiotechnol* 14(1):39. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0193-x>
- Kamaly N, Xiao Z, Valencia PM, Radovic-Moreno AF, Farokhzad OC (2012) Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem Soc Rev* 41(7):2971–3010. <https://doi.org/10.1039/c2cs15344k>
- Khandare JJ, Jayant S, Singh A, Chandna P, Wang Y, Vorsa N, Minko T (2006) Dendrimer versus linear conjugate: influence of polymeric architecture on the delivery and anticancer effect of paclitaxel. *Bioconjug Chem* 17(6):1464–1472. <https://doi.org/10.1021/bc060240p>
- Langer CJ, O’Byrne KJ, Socinski MA, Mikhailov SM, Lesniewski-Kmak K, Smakal M, Ciuleanu TE, Orlov SV, Dediu M, Heigener D, Eisenfeld AJ, Sandalic L, Oldham FB, Singer JW, Ross HJ (2008) Phase III trial comparing paclitaxel polyglumex (CT-2103, PPX) in combination with carboplatin versus standard paclitaxel and carboplatin in the treatment of PS 2 patients with chemotherapy-naïve advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 3(6):623–630. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181753b4b>
- Cheng C, Jiang-Ling Z, Xue H, Fei S, Xiu-Li W, Yu-Zhong W (2014) A prodrug strategy based on chitosan for efficient intracellular anticancer drug delivery. *Nanotechnology* 25(25):255101
- Dragojevic S, Ryu JS, Raucher D (2015) Polymer-based prodrugs: improving tumor targeting and the solubility of small molecule drugs in cancer therapy. *Molecules* 20(12):21750–21769. <https://doi.org/10.3390/molecules201219804>
- Fumagalli G, Marucci C, Christodoulou MS, Stella B, Dosio F, Passarella D (2016) Self-assembly drug conjugates for anticancer treatment. *Drug Discov Today* 21(8):1321–1329. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.06.018>
- Zhou M, Zhang RH, Wang M, Xu GB, Liao SG (2017) Prodrugs of triterpenoids and their derivatives. *Eur J Med Chem* 131:222–236. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.005>
- Maksimenko A, Dosio F, Mougín J, Ferrero A, Wack S, Reddy LH, Weyn AA, Lepeltier E, Bourgaux C, Stella B, Cattel L, Couvreur P (2014) A unique squalenoylated and nonpegylated doxorubicin nanomedicine with systemic long-circulating

- properties and anticancer activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(2):E217–E226. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313459110>
29. Mura S, Nicolas J, Couvreur P (2013) Stimuli-responsive nano-carriers for drug delivery. *Nat Mater* 12(11):991–1003. <https://doi.org/10.1038/nmat3776>
 30. Siafaka PI, Ustundag Okur N, Karavas E, Bikiaris DN (2016) Surface modified multifunctional and stimuli responsive nanoparticles for drug targeting: current status and uses. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/ijms17091440>
 31. Chau Y, Padera RF, Dang NM, Langer R (2006) Antitumor efficacy of a novel polymer-peptide-drug conjugate in human tumor xenograft models. *Int J Cancer* 118(6):1519–1526. <https://doi.org/10.1002/ijc.21495>
 32. Huang C, Yi X, Kong D, Chen L, Min G (2016) Controlled release strategy of paclitaxel by conjugating to matrix metalloproteinases-2 sensitive peptide. *Oncotarget* 7(32):52230–52238. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10735>
 33. Denmeade SR, Nagy A, Gao J, Lilja H, Schally AV, Isaacs JT (1998) Enzymatic activation of a doxorubicin-peptide prodrug by prostate-specific antigen. *Cancer Res* 58(12):2537–2540
 34. DiPaola RS, Rinehart J, Nemunaitis J, Ebbinghaus S, Rubin E, Capanna T, Ciardella M, Doyle-Lindrud S, Goodwin S, Fontaine M, Adams N, Williams A, Schwartz M, Winchell G, Wickersham K, Deutsch P, Yao SL (2002) Characterization of a novel prostate-specific antigen-activated peptide-doxorubicin conjugate in patients with prostate cancer. *J Clin Oncol* 20(7):1874–1879. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.07.001>
 35. Wu X, Hu L (2016) Design and synthesis of peptide conjugates of phosphoramidate mustard as prodrugs activated by prostate-specific antigen. *Bioorg Med Chem* 24(12):2697–2706. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.04.035>
 36. DeFeo-Jones D, Brady SF, Feng DM, Wong BK, Bolyar T, Haskell K, Kiefer DM, Leander K, McAvoy E, Lumma P, Pawluczyk JM, Wai J, Motzel SL, Keenan K, Van Zwieten M, Lin JH, Garsky VM, Freidinger R, Oliff A, Jones RE (2002) A prostate-specific antigen (PSA)-activated vinblastine prodrug selectively kills PSA-secreting cells in vivo. *Mol Cancer Ther* 1(7):451–459
 37. Brennen WN, Rosen DM, Wang H, Isaacs JT, Denmeade SR (2012) Targeting carcinoma-associated fibroblasts within the tumor stroma with a fibroblast activation protein-activated prodrug. *J Natl Cancer Inst* 104(17):1320–1334. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs336>
 38. Chen M, Lei X, Shi C, Huang M, Li X, Wu B, Li Z, Han W, Du B, Hu J, Nie Q, Mai W, Ma N, Xu N, Zhang X, Fan C, Hong A, Xia M, Luo L, Ma A, Li H, Yu Q, Chen H, Zhang D, Ye W (2017) Pericyte-targeting prodrug overcomes tumor resistance to vascular disrupting agents. *J Clin Investig* 127(10):3689–3701. <https://doi.org/10.1172/JCI94258>
 39. Huang S, Zhang Y, Zhong J, Pan Y, Cai S, Xu J (2018) Toxicological profile and safety pharmacology of a single dose of fibroblast activation protein-alpha-based doxorubicin prodrug: in vitro and in vivo evaluation. *Anticancer Drugs* 29(3):253–261. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000593>
 40. Wang J, Li Q, Li X, Yuan W, Huang S, Cai S, Xu J (2017) A novel FAPalpha-based Z-Gly-Pro epirubicin prodrug for improving tumor-targeting chemotherapy. *Eur J Pharmacol* 815:166–172. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.09.016>
 41. Aggarwal N, Sloane BF (2014) Cathepsin B: multiple roles in cancer. *Proteom Clin Appl* 8(5–6):427–437. <https://doi.org/10.1002/prca.201300105>
 42. Shao LH, Liu SP, Hou JX, Zhang YH, Peng CW, Zhong YJ, Liu X, Liu XL, Hong YP, Firestone RA, Li Y (2012) Cathepsin B cleavable novel prodrug Ac-Phe-Lys-PABC-ADM enhances efficacy at reduced toxicity in treating gastric cancer peritoneal carcinomatosis: an experimental study. *Cancer* 118(11):2986–2996. <https://doi.org/10.1002/cncr.26596>
 43. Zhong YJ, Shao LH, Li Y (2013) Cathepsin B-cleavable doxorubicin prodrugs for targeted cancer therapy (review). *Int J Oncol* 42(2):373–383. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1754>
 44. Seymour LW, Ferry DR, Kerr DJ, Rea D, Whitlock M, Poyner R, Boivin C, Hesslewood S, Twelves C, Blackie R, Schatzlein A, Jodrell D, Bissett D, Calvert H, Lind M, Robbins A, Burtles S, Duncan R, Cassidy J (2009) Phase II studies of polymer-doxorubicin (PK1, FCE28068) in the treatment of breast, lung and colorectal cancer. *Int J Oncol* 34(6):1629–1636. https://doi.org/10.3892/ijo_00000293
 45. Paz-Ares L, Ross H, O'Brien M, Riviere A, Gatzemeier U, Von Pawel J, Kaukel E, Freitag L, Digel W, Bischoff H, Garcia-Campelo R, Iannotti N, Reiterer P, Bover I, Prendiville J, Eisenfeld AJ, Oldham FB, Bandstra B, Singer JW, Bonomi P (2008) Phase III trial comparing paclitaxel poliglumex vs docetaxel in the second-line treatment of non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 98(10):1608–1613. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604372>
 46. Zhang M, Jiang Z, Chen S, Wu Z, Chen K, Wu Y (2018) Legumain correlates with neuroblastoma differentiation and can be used in prodrug design. *Chem Biol Drug Des* 91(2):534–544. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13116>
 47. Connors JMRJ (2018) Brentuximab vedotin for stage III or IV Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 378(16):1558–1561. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1802363>
 48. Karthaler-Benbakka C, Koblmüller B, Mathuber M, Holste K, Berger W, Heffeter P, Kowol CR, Keppler BK (2018) Synthesis, characterization and in vitro studies of a Cathepsin B-cleavable prodrug of the VEGFR inhibitor sunitinib. *Chem Biodivers*. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800520>
 49. Bollag W (1965) Hartmann HR (1980) tumor inhibitory effects of a new fluorouracil derivative: 5'-deoxy-5-fluorouridine. *Eur J Cancer* 16(4):427–432. [https://doi.org/10.1016/0014-2964\(80\)90221-2](https://doi.org/10.1016/0014-2964(80)90221-2)
 50. Hiller SA, Lidak MY, Zhuk RA et al (1969) Analogs of pyrimidine nucleosides. *Chem Heterocycl Compd* 5(2):283–285. <https://doi.org/10.1007/BF00943946>
 51. Koukourakis GV, Kouloulis V, Koukourakis MJ, Zacharias GA, Zabatis H, Kouvaris J (2008) Efficacy of the oral fluorouracil pro-drug capecitabine in cancer treatment: a review. *Molecules* 13(8):1897–1922. <https://doi.org/10.3390/molecules13081897>
 52. Sakata Y, Ohtsu A, Horikoshi N, Sugimachi K, Mitachi Y, Taguchi T (1998) Late phase II study of novel oral fluoropyrimidine anticancer drug S-1 (1 M tegafur–0.4 M gimestat–1 M otastat potassium) in advanced gastric cancer patients. *Eur J Cancer* 34(11):1715–1720. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(98\)00211-1](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(98)00211-1)
 53. Alberto P, Winkelmann JJ, Paschoud N, Peytremann R, Bruyere A, Righetti A, Decoster G, Holdener EE (1989) Phase I study of oral doxifluridine using two schedules. *Eur J Cancer Clin Oncol* 25(5):905–908. [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(89\)90139-9](https://doi.org/10.1016/0277-5379(89)90139-9)
 54. Kim NK, Min JS, Park JK, Yun SH, Sung JS, Jung HC, Roh JK (2001) Intravenous 5-fluorouracil versus oral doxifluridine as preoperative concurrent chemoradiation for locally advanced rectal cancer: prospective randomized trials. *Jpn J Clin Oncol* 31(1):25–29. <https://doi.org/10.1093/jjco/hye009>
 55. van Oosterom AT, ten Bokkel Huinink WW, van der Burg ME, Vermorken JB, Willemse PH, Neijt JP (1991) Phase II clinical trial of doxifluridine in patients with advanced ovarian cancer. *Eur J Cancer* 27(6):747–749. [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(91\)90180-L](https://doi.org/10.1016/0277-5379(91)90180-L)
 56. Miwa M, Ura M, Nishida M, Sawada N, Ishikawa T, Mori K, Shimma N, Umeda I, Ishitsuka H (1998) Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates

- 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur J Cancer* 34(8):1274–1281. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(98\)00058-6](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(98)00058-6)
57. Ter Veer E, Ngai LL, Valkenhoeft GV, Mohammad NH, Anderegg MCJ, van Oijen MGH, van Laarhoven HWM (2017) Capecitabine, 5-fluorouracil and S-1 based regimens for previously untreated advanced oesophagogastric cancer: a network meta-analysis. *Sci Rep* 7(1):7142. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07750-3>
 58. Fukushima M, Iizuka K, Jin C, Zhang C, Hong M, Eshima K (2017) Development of new promising antimetabolite, DFP-11207 with self-controlled toxicity in rodents. *Drug Des Dev Ther* 11:1693–1705. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S128420>
 59. Zhao D, Zhang H, Tao W, Wei W, Sun J, He Z (2017) A rapid albumin-binding 5-fluorouracil prodrug with a prolonged circulation time and enhanced antitumor activity. *Biomater Sci* 5(3):502–510. <https://doi.org/10.1039/c6bm00884d>
 60. Dubois V, Dasnois L, Lebtahi K, Collot F, Heylen N, Havaux N, Fernandez AM, Lobl TJ, Oliyai C, Nieder M, Shochat D, Yarranton GT, Trouet A (2002) CPI-0004Na, a new extracellularly tumor-activated prodrug of doxorubicin: in vivo toxicity, activity, and tissue distribution confirm tumor cell selectivity. *Cancer Res* 62(8):2327–2331
 61. Schoffski P, Delord JP, Brain E, Robert J, Dumez H, Gasmi J, Trouet A (2017) First-in-man phase I study assessing the safety and pharmacokinetics of a 1-h intravenous infusion of the doxorubicin prodrug DTS-201 every 3 weeks in patients with advanced or metastatic solid tumours. *Eur J Cancer* 86:240–247. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.09.009>
 62. Cornillie J, Wozniak A, Pokreisz P, Casazza A, Vreys L, Wellens J, Vanleeuw U, Gebreyohannes YK, Debiec-Rychter M, Sciort R, Hompes D, Schoffski P (2017) In vivo antitumoral efficacy of PhAc-ALGP-doxorubicin, an enzyme-activated doxorubicin prodrug, in patient-derived soft tissue sarcoma xenograft models. *Mol Cancer Ther* 16(8):1566–1575. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0832>
 63. Vandooren J, Opendakker G, Loadman PM, Edwards DR (2016) Proteases in cancer drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 97:144–155. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.020>
 64. Wu W, Luo Y, Sun C, Liu Y, Kuo P, Varga J, Xiang R, Reisfeld R, Janda KD, Edgington TS, Liu C (2006) Targeting cell-impermeable prodrug activation to tumor microenvironment eradicates multiple drug-resistant neoplasms. *Cancer Res* 66(2):970–980. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2591>
 65. Zhou H, Sun H, Lv S, Zhang D, Zhang X, Tang Z, Chen X (2017) Legumain-cleavable 4-arm poly(ethylene glycol)-doxorubicin conjugate for tumor specific delivery and release. *Acta Biomater* 54:227–238. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.03.019>
 66. Stern L, Perry R, Ofek P, Many A, Shabat D, Satchi-Fainaro R (2009) A novel antitumor prodrug platform designed to be cleaved by the endoprotease legumain. *Bioconjug Chem* 20(3):500–510. <https://doi.org/10.1021/bc800448u>
 67. Zhang H, Sun Z, Wang K, Li N, Chen H, Tan X, Li L, He Z, Sun J (2018) Multifunctional tumor-targeting cathepsin B-sensitive gemcitabine prodrug covalently targets albumin in situ and improves cancer therapy. *Bioconjug Chem* 29(6):1852–1858. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00223>
 68. Wu W, Luo Y, Sun C, Liu Y, Kuo P, Varga J, Xiang R, Reisfeld R, Janda KD, Edgington TS, Liu C (2006) Targeting cell-impermeable prodrug activation to tumor microenvironment eradicates multiple drug-resistant neoplasms. *Can Res* 66(2):970. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2591>
 69. Seo K, Chung SW, Byun Y, Kim D (2012) Paclitaxel loaded nano-aggregates based on pH sensitive polyaspartamide amphiphilic graft copolymers. *Int J Pharm* 424(1–2):26–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.12.047>
 70. Yoshida T, Lai TC, Kwon GS, Sako K (2013) pH- and ion-sensitive polymers for drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 10(11):1497–1513. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.821978>
 71. Xiong S, Wang Z, Liu J, Deng X, Xiong R, Cao X, Xie Z, Lei X, Chen Y, Tang G (2019) A pH-sensitive prodrug strategy to co-deliver DOX and TOS in TPGS nanomicelles for tumor therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 173:346–355. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.012>
 72. Huang X, Liao W, Xie Z, Chen D, Zhang CY (2018) A pH-responsive prodrug delivery system self-assembled from acid-labile doxorubicin-conjugated amphiphilic pH-sensitive block copolymers. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 90:27–37. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.036>
 73. Rahoui N, Jiang B, Taloub N, Hegazy M, Huang YD (2018) Synthesis and evaluation of water soluble pH sensitive poly(vinyl alcohol)-doxorubicin conjugates. *J Biomater Sci Polym Ed* 29(12):1482–1497. <https://doi.org/10.1080/09205063.2018.1466470>
 74. Zhu J, Huo Q, Xu M, Yang F, Li Y, Shi H, Niu Y, Liu Y (2018) Bortezomib-catechol conjugated prodrug micelles: combining bone targeting and aryl boronate-based pH-responsive drug release for cancer bone-metastasis therapy. *Nanoscale* 10(38):18387–18397. <https://doi.org/10.1039/c8nr03899f>
 75. Xie J, Fan Z, Li Y, Zhang Y, Yu F, Su G, Xie L, Hou Z (2018) Design of pH-sensitive methotrexate prodrug-targeted curcumin nanoparticles for efficient dual-drug delivery and combination cancer therapy. *Int J Nanomed* 13:1381–1398. <https://doi.org/10.2147/IJN.S152312>
 76. Tap WD, Papai Z, Van Tine BA, Attia S, Ganjoo KN, Jones RL, Schuetz S, Reed D, Chawla SP, Riedel RF, Krarup-Hansen A, Toulmonde M, Ray-Coquard I, Hohenberger P, Grignani G, Cranmer LD, Okuno S, Agulnik M, Read W, Ryan CW, Alcindor T, del Muro XFG, Budd GT, Tawbi H, Pearce T, Kroll S, Reinke DK, Schöffski P (2017) Doxorubicin plus evofosfamide versus doxorubicin alone in locally advanced, unresectable or metastatic soft-tissue sarcoma (TH CR-406/SARC021): an international, multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 18(8):1089–1103. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(17\)30381-9](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(17)30381-9)
 77. Laubach JP, Liu CJ, Raje NS, Yee AJ, Armand P, Schlossman RL, Rosenblatt J, Hedlund J, Martin M, Reynolds C, Shain KH, Zackon I, Stampleman L, Henrick P, Rivotto B, Hornburg KTV, Dumke HJ, Chuma S, Savell A, Handisides DR, Kroll S, Anderson KC, Richardson PG, Ghobrial IM (2018) A phase I/II study of evofosfamide, a hypoxia-activated prodrug with or without bortezomib in subjects with relapsed/refractory multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-18-1325>
 78. Jamieson SM, Tsai P, Kondratyev MK, Budhani P, Liu A, Senzer NN, Chiorean EG, Jalal SI, Nemunaitis JJ, Kee D, Shome A, Wong WW, Li D, Poonawala-Lohani N, Kakadia PM, Knowlton NS, Lynch CR, Hong CR, Lee TW, Grenman RA, Caporiccio L, McKee TD, Zaidi M, Butt S, Macann AM, McIvor NP, Chaplin JM, Hicks KO, Bohlander SK, Wouters BG, Hart CP, Print CG, Wilson WR, Curran MA, Hunter FW (2018) Evofosfamide for the treatment of human papillomavirus-negative head and neck squamous cell carcinoma. *JCI Insight*. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.122204>
 79. Kumar S, Sun JD, Zhang L, Mokhtari RB, Wu B, Meng F, Liu Q, Bhupathi D, Wang Y, Yeger H, Hart C, Baruchel S (2018) Hypoxia-targeting drug evofosfamide (TH-302) enhances sunitinib activity in neuroblastoma xenograft models. *Transl Oncol* 11(4):911–919. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.05.004>
 80. Liu S, Tetzlaff M, Wang T, Chen X, Yang R, Kumar SM, Xu X (2017) Hypoxia-activated prodrug enhances therapeutic effect

- of sunitinib in melanoma. *Oncotarget* 8(70):115140–115152. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22944>
81. Huang Y, Tian Y, Zhao Y, Xue C, Zhan J, Liu L, He X, Zhang L (2018) Efficacy of the hypoxia-activated prodrug evofosfamide (TH-302) in nasopharyngeal carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer Commun (Lond)* 38(1):15. <https://doi.org/10.1186/s40880-018-0285-0>
 82. Brenner A, Zuniga R, Sun JD, Floyd J, Hart CP, Kroll S, Fichtel L, Cavazos D, Caffisch L, Gruslova A, Huang S, Liu Y, Lodi A, Tiziani S (2018) Hypoxia-activated evofosfamide for treatment of recurrent bevacizumab-refractory glioblastoma: a phase I surgical study. *Neurooncology* 20(9):1231–1239. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nyo015>
 83. Liapis V, Zysk A, DeNichilo M, Zinonos I, Hay S, Panagopoulos V, Shoubridge A, Difelice C, Ponomarev V, Ingman W, Atkins GJ, Findlay DM, Zannettino ACW, Evdokiou A (2017) Anticancer efficacy of the hypoxia-activated prodrug evofosfamide is enhanced in combination with proapoptotic receptor agonists against osteosarcoma. *Cancer Med* 6(9):2164–2176. <https://doi.org/10.1002/cam4.1115>
 84. Hajj C, Russell J, Hart CP, Goodman KA, Lowery MA, Haimovitz-Friedman A, Deasy JO, Humm JL (2017) A combination of radiation and the hypoxia-activated prodrug evofosfamide (TH-302) is efficacious against a human orthotopic pancreatic tumor model. *Transl Oncol* 10(5):760–765. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2017.06.010>
 85. Jin C, Zhang Q, Lu W (2017) Synthesis and biological evaluation of hypoxia-activated prodrugs of SN-38. *Eur J Med Chem* 132:135–141. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.040>
 86. McKeage MJ, Gu Y, Wilson WR, Hill A, Amies K, Melink TJ, Jameson MB (2011) A phase I trial of PR-104, a prodrug of the bioreductive prodrug PR-104A, given weekly to solid tumour patients. *BMC Cancer* 11:432. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-432>
 87. Guise CP, Abbattista MR, Singleton RS, Holford SD, Connolly J, Dachs GU, Fox SB, Pollock R, Harvey J, Guilford P, Donate F, Wilson WR, Patterson AV (2010) The bioreductive prodrug PR-104A is activated under aerobic conditions by human aldo-keto reductase 1C3. *Cancer Res* 70(4):1573–1584. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3237>
 88. Konopleva M, Thall PF, Yi CA, Borthakur G, Coveler A, Bueso-Ramos C, Benito J, Konoplev S, Gu Y, Ravandi F, Jabbour E, Faderl S, Thomas D, Cortes J, Kadia T, Kornblau S, Daver N, Pemmaraju N, Nguyen HQ, Feliu J, Lu H, Wei C, Wilson WR, Melink TJ, Gutheil JC, Andreeff M, Estey EH, Kantarjian H (2015) Phase I/II study of the hypoxia-activated prodrug PR104 in refractory/relapsed acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 100(7):927–934. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.118455>
 89. Peng X, Gandhi V (2012) ROS-activated anticancer prodrugs: a new strategy for tumor-specific damage. *Ther Deliv* 3(7):823–833. <https://doi.org/10.4155/tde.12.61>
 90. Saravanakumar G, Kim J, Kim Won J (2016) Reactive-oxygen-species-responsive drug delivery systems: promises and challenges. *Adv Sci* 4(1):1600124. <https://doi.org/10.1002/advs.201600124>
 91. Kuang Y, Balakrishnan K, Gandhi V, Peng X (2011) Hydrogen peroxide inducible DNA cross-linking agents: targeted anticancer prodrugs. *J Am Chem Soc* 133(48):19278–19281. <https://doi.org/10.1021/ja2073824>
 92. Wang L, Xie S, Ma L, Chen Y, Lu W (2016) 10-Boronic acid substituted camptothecin as prodrug of SN-38. *Eur J Med Chem* 116:84–89. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.03.063>
 93. Zhang C, Zhong Q, Zhang Q, Zheng S, Miele L, Wang G (2015) Boronic prodrug of endoxifen as an effective hormone therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 152(2):283–291. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3461-9>
 94. Gabor F, Wollmann K, Theyer G, Haberl I, Hamilton G (1994) In vitro antiproliferative effects of albumin-doxorubicin conjugates against Ewing's sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor cells. *Anticancer Res* 14(5A):1943–1950
 95. Kratz F (2007) DOXO-EMCH (INNO-206): the first albumin-binding prodrug of doxorubicin to enter clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs* 16(6):855–866. <https://doi.org/10.1517/13543784.16.6.855>
 96. Chawla SP, Papai Z, Mukhametshina G, Sankhala K, Vasylyev L, Fedenko A, Khamly K, Ganjoo K, Nagarkar R, Wieland S, Levitt DJ (2015) First-line aldorubicin vs doxorubicin in metastatic or locally advanced unresectable soft-tissue sarcoma: a phase 2b randomized clinical trial. *JAMA Oncol* 1(9):1272–1280. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.3101>
 97. Mita MM, Natale RB, Wolin EM, Laabs B, Dinh H, Wieland S, Levitt DJ, Mita AC (2015) Pharmacokinetic study of aldorubicin in patients with solid tumors. *Investig New Drugs* 33(2):341–348. <https://doi.org/10.1007/s10637-014-0183-5>
 98. Mansour AM, Dreves J, Esser N, Hamada FM, Badary OA, Unger C, Fichtner I, Kratz F (2003) A new approach for the treatment of malignant melanoma: enhanced antitumor efficacy of an albumin-binding doxorubicin prodrug that is cleaved by matrix metalloproteinase 2. *Can Res* 63(14):4062
 99. Schmid B, Chung DE, Warnecke A, Fichtner I, Kratz F (2007) Albumin-binding prodrugs of camptothecin and doxorubicin with an Ala-Leu-Ala-Leu-linker that are cleaved by cathepsin B: synthesis and antitumor efficacy. *Bioconjug Chem* 18(3):702–716. <https://doi.org/10.1021/bc0602735>
 100. Graeser R, Chung DE, Esser N, Moor S, Schachtele C, Unger C, Kratz F (2008) Synthesis and biological evaluation of an albumin-binding prodrug of doxorubicin that is cleaved by prostate-specific antigen (PSA) in a PSA-positive orthotopic prostate carcinoma model (LNCaP). *Int J Cancer* 122(5):1145–1154. <https://doi.org/10.1002/ijc.23050>
 101. Wunder A, Stehle G, Schrenk HH, Hartung G, Heene DL, Maier-Borst W, Sinn H (1998) Antitumor activity of methotrexate-albumin conjugates in rats bearing a Walker-256 carcinoma. *Int J Cancer* 76(6):884–890. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19980610\)76:6%3c884::AID-IJC19%3e3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19980610)76:6%3c884::AID-IJC19%3e3.0.CO;2-2)
 102. Hartung G, Stehle G, Sinn H, Wunder A, Schrenk HH, Heeger S, Kranzle M, Edler L, Frei E, Fiebig HH, Heene DL, Maier-Borst W, Queisser W (1999) Phase I trial of methotrexate-albumin in a weekly intravenous bolus regimen in cancer patients. Phase I Study Group of the Association for Medical Oncology of the German Cancer Society. *Clin Cancer Res* 5(4):753–759
 103. Vis AN, van der Gaast A, van Rhijn BW, Catsburg TK, Schmidt C, Mickisch GH (2002) A phase II trial of methotrexate-human serum albumin (MTX-HSA) in patients with metastatic renal cell carcinoma who progressed under immunotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 49(4):342–345. <https://doi.org/10.1007/s00280-001-0417-z>
 104. Mayr J, Heffeter P, Groza D, Galvez L, Koellensperger G, Roller A, Alte B, Haider M, Berger W, Kowol CR, Keppler BK (2017) An albumin-based tumor-targeted oxaliplatin prodrug with distinctly improved anticancer activity in vivo. *Chem Sci* 8(3):2241–2250. <https://doi.org/10.1039/c6sc03862j>
 105. Beck A, D'Atri V, Ehkirch A, Fekete S, Hernandez-Alba O, Gahoual R, Leize-Wagner E, Francois Y, Guillarme D, Cianferani S (2019) Cutting-edge multi-level analytical and structural characterization of antibody–drug conjugates: present and future. *Expert Rev Proteom* 16(4):337–362. <https://doi.org/10.1080/14789450.2019.1578215>
 106. Jen EY, Ko CW, Lee JE, Del Valle PL, Aydanian A, Jewell C, Norsworthy KJ, Przepiorcka D, Nie L, Liu J, Sheth CM,

- Shapiro M, Farrell AT, Pazdur R (2018) FDA approval: gemtuzumab ozogamicin for the treatment of adults with newly diagnosed CD33-positive acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 24(14):3242–3246. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3179>
107. Tack DK, Letendre L, Kamath PS, Tefferi A (2001) Development of hepatic veno-occlusive disease after Mylotarg infusion for relapsed acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 28(9):895–897. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1703242>
108. Lu J, Jiang F, Lu A, Zhang G (2016) Linkers having a crucial role in antibody–drug conjugates. *Int J Mol Sci* 17(4):561. <https://doi.org/10.3390/ijms17040561>
109. Junttila TT, Li G, Parsons K, Phillips GL, Sliwkowski MX (2011) Trastuzumab-DM1 (T-DM1) retains all the mechanisms of action of trastuzumab and efficiently inhibits growth of lapatinib insensitive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 128(2):347–356. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1090-x>
110. Girish S, Gupta M, Wang B, Lu D, Krop IE, Vogel CL, Burris Iii HA, LoRusso PM, Yi J-H, Saad O, Tong B, Chu Y-W, Holden S, Joshi A (2012) Clinical pharmacology of trastuzumab emtansine (T-DM1): an antibody–drug conjugate in development for the treatment of HER2-positive cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 69(5):1229–1240. <https://doi.org/10.1007/s00280-011-1817-3>
111. Joubert N, Denevault-Sabourin C, Bryden F, Viaud-Massuard MC (2017) Towards antibody–drug conjugates and prodrug strategies with extracellular stimuli-responsive drug delivery in the tumor microenvironment for cancer therapy. *Eur J Med Chem* 142:393–415. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.049>
112. Chen H, Lin Z, Arnst KE, Miller DD, Li W (2017) Tubulin inhibitor-based antibody–drug conjugates for cancer therapy. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules22081281>
113. Riechelmann H, Sauter A, Golze W, Hanft G, Schroen C, Hoermann K, Erhardt T, Gronau S (2008) Phase I trial with the CD44v6-targeting immunoconjugate bivatuzumab mertansine in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 44(9):823–829. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2007.10.009>
114. Dal Corso A, Cazzamalli S, Gebleux R, Mattarella M, Neri D (2017) Protease-cleavable linkers modulate the anticancer activity of noninternalizing antibody–drug conjugates. *Bioconjug Chem* 28(7):1826–1833. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00304>
115. Perrino E, Steiner M, Krall N, Bernardes GJ, Pretto F, Cusi G, Neri D (2014) Curative properties of noninternalizing antibody–drug conjugates based on maytansinoids. *Cancer Res* 74(9):2569–2578. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2990>
116. Richards DA (2018) Exploring alternative antibody scaffolds: antibody fragments and antibody mimics for targeted drug delivery. *Drug Discov Today Technol* 30:35–46. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.10.005>
117. Aubrey N, Allard-Vannier E, Martin C, Bryden F, Letast S, Colas C, Lakhfir Z, Collinet N, Dimier-Poisson I, Chourpa I, Viaud-Massuard MC, Joubert N (2018) Site-specific conjugation of auristatins onto engineered scFv using second generation maleimide to target HER2-positive breast cancer in vitro. *Bioconjug Chem* 29(11):3516–3521. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00668>
118. Desgrosellier JS, Cheresh DA (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10(1):9–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2748>
119. Dechantsreiter MA, Planker E, Matha B, Lohof E, Holzemann G, Jonczyk A, Goodman SL, Kessler H (1999) *N*-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective alpha(V) beta(3) integrin antagonists. *J Med Chem* 42(16):3033–3040. <https://doi.org/10.1021/jm970832g>
120. Massaguer A, Gonzalez-Canto A, Escribano E, Barrabes S, Artigas G, Moreno V, Marchan V (2015) Integrin-targeted delivery into cancer cells of a Pt(IV) pro-drug through conjugation to RGD-containing peptides. *Dalton Trans* 44(1):202–212. <https://doi.org/10.1039/c4dt02710h>
121. Dal Pozzo A, Esposito E, Ni M, Muzi L, Pisano C, Bucci F, Vesci L, Castorina M, Penco S (2010) Conjugates of a novel 7-substituted camptothecin with RGD-peptides as alpha(v)beta(3) integrin ligands: an approach to tumor-targeted therapy. *Bioconjug Chem* 21(11):1956–1967. <https://doi.org/10.1021/bc100097r>
122. Arosio D, Casagrande C (2016) Advancement in integrin facilitated drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 97:111–143. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.001>
123. Zhong P, Gu X, Cheng R, Deng C, Meng F, Zhong Z (2017) alphavbeta3 integrin-targeted micellar mertansine prodrug effectively inhibits triple-negative breast cancer in vivo. *Int J Nanomed* 12:7913–7921. <https://doi.org/10.2147/IJN.S146505>
124. Engel J, Emons G, Pinski J, Schally AV (2012) AEZS-108: a targeted cytotoxic analog of LHRH for the treatment of cancers positive for LHRH receptors. *Expert Opin Investig Drugs* 21(6):891–899. <https://doi.org/10.1517/13543784.2012.685128>
125. Emons G, Gorchev G, Sehouli J, Wimberger P, Stahle A, Hanke L, Hilpert F, Sindermann H, Grundker C, Harter P (2014) Efficacy and safety of AEZS-108 (INN: zoptarelin doxorubicin acetate) an LHRH agonist linked to doxorubicin in women with platinum refractory or resistant ovarian cancer expressing LHRH receptors: a multicenter phase II trial of the ago-study group (AGO GYN 5). *Gynecol Oncol* 133(3):427–432. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.03.576>
126. Liu SV, Tsao-Wei DD, Xiong S, Groshen S, Dorff TB, Quinn DI, Tai YC, Engel J, Hawes D, Schally AV, Pinski JK (2014) Phase I, dose-escalation study of the targeted cytotoxic LHRH analog AEZS-108 in patients with castration- and taxane-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 20(24):6277–6283. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0489>
127. Yu SS, Athreya K, Liu SV, Schally AV, Tsao-Wei D, Groshen S, Quinn DI, Dorff TB, Xiong S, Engel J, Pinski J (2017) A phase II trial of AEZS-108 in castration- and taxane-resistant prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer* 15(6):742–749. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2017.06.002>
128. Karampelas T, Skavatsou E, Argyros O, Fokas D, Tamvakopoulos C (2017) Gemcitabine based peptide conjugate with improved metabolic properties and dual mode of efficacy. *Mol Pharm* 14(3):674–685. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00961>
129. Kurzrock R, Gabrail N, Chandhasin C, Moulder S, Smith C, Brenner A, Sankhala K, Mita A, Elian K, Bouchard D, Sarantopoulos J (2012) Safety, pharmacokinetics, and activity of GRN1005, a novel conjugate of angiopoep-2, a peptide facilitating brain penetration, and paclitaxel, in patients with advanced solid tumors. *Mol Cancer Ther* 11(2):308–316. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0566>
130. Drappatz J, Brenner A, Wong ET, Eichler A, Schiff D, Groves MD, Mikkelsen T, Rosenfeld S, Sarantopoulos J, Meyers CA, Fielding RM, Elian K, Wang X, Lawrence B, Shing M, Kelsey S, Castaigne JP, Wen PY (2013) Phase I study of GRN1005 in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* 19(6):1567–1576. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2481>
131. Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A (2001) Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer* 37(13):1590–1598. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(01\)00171-X](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(01)00171-X)
132. Huo M, Zhu Q, Wu Q, Yin T, Wang L, Yin L, Zhou J (2015) Somatostatin receptor-mediated specific delivery of paclitaxel prodrugs for efficient cancer therapy. *J Pharm Sci* 104(6):2018–2028. <https://doi.org/10.1002/jps.24438>

133. Steinberg G, Borch RF (2001) Synthesis and evaluation of ptericoic acid-conjugated nitroheterocyclic phosphoramidates as folate receptor-targeted alkylating agents. *J Med Chem* 44(1):69–73. <https://doi.org/10.1021/jm000306g>
134. Aronov O, Horowitz AT, Gabizon A, Gibson D (2003) Folate-targeted PEG as a potential carrier for carboplatin analogs. Synthesis and in vitro studies. *Bioconjug Chem* 14(3):563–574. <https://doi.org/10.1021/bc025642i>
135. Liu J, Kolar C, Lawson TA, Gmeiner WH (2002) Targeted drug delivery to chemoresistant cells: folic acid derivatization of FdUMP[10] enhances cytotoxicity toward 5-FU-Resistant human colorectal tumor cells. *J Org Chem* 67(8):2734. <https://doi.org/10.1021/jo01619-6>
136. Lee JW, Lu JY, Low PS, Fuchs PL (2002) Synthesis and evaluation of taxol–folic acid conjugates as targeted antineoplastics. *Bioorg Med Chem* 10(7):2397–2414. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(02\)00019-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(02)00019-6)
137. Ladino CA, Chari RV, Bourret LA, Kedersha NL, Goldmacher VS (1997) Folate-maytansinoids: target-selective drugs of low molecular weight. *Int J Cancer* 73(6):859–864. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19971210\)73:6%3c859:AID-IJC16%3e3.0.CO;2-%23](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19971210)73:6%3c859:AID-IJC16%3e3.0.CO;2-%23)
138. Reddy JA, Westrick E, Santhapuram HK, Howard SJ, Miller ML, Vetzal M, Vlahov I, Chari RV, Goldmacher VS, Leamon CP (2007) Folate receptor-specific antitumor activity of EC131, a folate-maytansinoid conjugate. *Cancer Res* 67(13):6376–6382. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3894>
139. Li J, Sausville EA, Klein PJ, Morgenstern D, Leamon CP, Messmann RA, LoRusso P (2009) Clinical pharmacokinetics and exposure-toxicity relationship of a folate-Vinca alkaloid conjugate EC145 in cancer patients. *J Clin Pharmacol* 49(12):1467–1476. <https://doi.org/10.1177/0091270009339740>
140. Guertin AD, O'Neil J, Stoeck A, Reddy JA, Cristescu R, Haines BB, Hinton MC, Dorton R, Bloomfield A, Nelson M, Vetzal M, Lejnine S, Nebozhyn M, Zhang T, Loboda A, Picard KL, Schmidt EV, Dussault I, Leamon CP (2016) High levels of expression of p-glycoprotein/multidrug resistance protein result in resistance to vintafolide. *Mol Cancer Ther* 15(8):1998–2008. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0950>
141. Shan L, Zhuo X, Zhang F, Dai Y, Zhu G, Yung BC, Fan W, Zhai K, Jacobson O, Kiesewetter DO, Ma Y, Gao G, Chen X (2018) A paclitaxel prodrug with bifunctional folate and albumin binding moieties for both passive and active targeted cancer therapy. *Theranostics* 8(7):2018–2030. <https://doi.org/10.7150/thno.24382>
142. Liu Z, Xiong M, Gong J, Zhang Y, Bai N, Luo Y, Li L, Wei Y, Liu Y, Tan X, Xiang R (2014) Legumain protease-activated TAT-liposome cargo for targeting tumours and their microenvironment. *Nat Commun* 5:4280. <https://doi.org/10.1038/ncomms5280>. <https://www.nature.com/articles/ncomms5280#supplementary-information>
143. Zhang Y, Huang F, Ren C, Yang L, Liu J, Cheng Z, Chu L, Liu J (2017) Targeted chemo-photodynamic combination platform based on the DOX prodrug nanoparticles for enhanced cancer therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* 9(15):13016–13028. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b00927>
144. Regina A, Demeule M, Che C, Lavallee I, Poirier J, Gabathuler R, Beliveau R, Castaigne JP (2008) Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2. *Br J Pharmacol* 155(2):185–197. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.260>
145. Reddy JA, Dorton R, Bloomfield A, Nelson M, Dircksen C, Vetzal M, Kleindl P, Santhapuram H, Vlahov IR, Leamon CP (2018) Pre-clinical evaluation of EC1456, a folate-tubulysin anti-cancer therapeutic. *Sci Rep* 8(1):8943. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27320-5>

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

2.2. Immunomodulation

La pharmacomodulation d'agents antitumoraux est la capacité de modifier leurs expositions plasmatique et tissulaire pour un meilleur index thérapeutique. L'exposition de ces xénobiotiques peut également jouer sur le fonctionnement du système immunitaire (SI) et influe indirectement sur la balance bénéfice/risque. Dans la partie suivante est rappelé le rôle du SI dans le processus pro/antitumoral afin de se focaliser sur des stratégies d'immunomodulation induite par les agents cytotoxiques.

2.2.1. Immunologie : acteurs et polarisation

Le SI regroupe l'ensemble des mécanismes de défense de l'organisme face aux agents étrangers et aux cellules du non-soi. Il se divise en deux catégories : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Brièvement, l'immunité innée, est la première ligne de défense non spécifique de l'organisme, elle met en jeu différents modules de défense : des modules constitutifs comme la barrière peau et muqueuses et des modules induits comme la phagocytose et la réponse inflammatoire *via* la libération de cytokines. Les acteurs de l'immunité innée sont les granulocytes (neutrophiles, basophiles, éosinophiles), les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques (*Dendritic cell* (DC)) ainsi que des cellules de lignées lymphoïdes telles que les lymphocytes *natural killer* (NK). L'immunité adaptative a une action plus tardive et est plus spécifique que l'immunité innée. Elle implique les lymphocytes B (LB) qui vont induire la réponse humorale avec production d'anticorps, et les lymphocytes T (LT) qui vont induire la réponse immunitaire cellulaire. Il existe deux sous-groupes de LT, les LT effecteurs et les LT régulateurs (Treg). Les LT effecteurs ont une action pro-inflammatoire avec la sécrétion de cytokines, l'activation/spécification des LB par les LT Cluster of Differentiation (CD) 4^+ et une action cytotoxique directe par les LT CD 8^+ . Les LT effecteurs CD 4^+ sont également appelés LT auxiliaires ou T *helper* (Th). Le terme polarisation a été introduit en 1986 par Mosman *et al.* pour définir deux sous-populations de Th murins, Th1 et Th2 en fonction du stimulus rencontré lors de leur activation (55). La distinction entre ces deux sous-populations est traduite par un profil de sécrétions cytokiniques différent : les Th1 avec la sécrétion d'interleukine (IL)-2 et interféron- γ (IFN γ), Th2 avec la sécrétion d'IL-4. Une troisième sous population est également décrite plus tardivement, les Th17 sécrétant de l'IL-17. Les Th1 sont principalement impliqués dans l'immunité à médiation cellulaire avec activation des LT cytotoxiques, les Th2 dans l'immunité antiparasitaire, allergique et activation des LB, et les Th17 dans les pathologies inflammatoires auto-immunes. Les LT cytotoxiques CD 8^+ ont une action directe sur les cellules du non-soi et agents

pathogènes. Les Treg sont des LT CD4⁺ ayant une activité immunosuppressive par la propriété d'inhiber la prolifération des LT effecteurs. Ils sont nécessaires au maintien de la tolérance immunitaire.

Les macrophages proviennent de la différenciation des monocytes circulants et infiltrent les tissus. Ils ont un rôle dans l'immunité innée avec une action de défense non spécifique *via* leur capacité de phagocytose, cependant ils participent également à l'immunité acquise avec des interactions avec les LT en se comportant comme une cellule présentatrice d'antigène (CPA). Longtemps décrits comme des cellules "éboueuses" participant à la clairance et à l'élimination d'agents pathogènes, leurs fonctions dans la réponse immunitaire s'avèrent beaucoup plus complexes. En effet, les macrophages ne sont pas simplement des cellules douées d'une activité phagocytaire mais assurent aussi de nombreuses autres fonctions dont la participation au processus de réparation tissulaire et de régulation de l'inflammation. Plusieurs années après les travaux de Mosman, les travaux de Mills *et al.* ont montré que la polarisation Th1 et Th2 modifiait la réponse inflammatoire des macrophages murins (56) ; les macrophages murins activés par les Th1 produisent majoritairement du monoxyde d'azote (*nitric oxide* - NO) alors que ceux activés par les Th2 produisent de l'ornithine. Ces travaux ont également montré que les macrophages « Th1 » et « Th2 » influencent respectivement la réponse inflammatoire des Th1 avec une augmentation de la sécrétion d'IFN γ et des Th2 avec une augmentation de *transforming growth factor*- β (inhibiteur de la production de NO) dans les LT murins. Ces observations ont permis de poser le concept de polarisation des macrophages M1 et M2, respectivement pro-inflammatoires et immunorégulateurs. En fonction de l'environnement, les macrophages peuvent adapter leurs fonctions selon différentes modalités, on parle alors de polarisation : "classique" de type M1 dont l'activité est pro-inflammatoire et "alternative" de type M2 qui participe à la régulation de l'inflammation et au phénomène de réparation tissulaire.

2.2.2. L'immunologie en oncologie

2.2.2.1. Immunoediting

Dans le domaine de la cancérologie, le nouveau paradigme du 21^{ème} siècle est la compréhension du rôle de l'immunité dans le développement tumoral. En effet, les différents acteurs de l'immunité peuvent intervenir à plusieurs niveaux – initiation, progression, métastases - et influencer la balance anti et pro-tumorale. On parle de balance car il existerait un processus, appelé en anglais *immunoediting*, selon lequel à l'initiation de la tumorigénèse, le SI est capable de combattre et

d'éliminer les cellules tumorales caractérisées par des signaux du non-soi. Cependant un équilibre entre élimination des cellules tumorales et progression de la tumeur s'installe, le SI va exercer une pression de sélection sur les clones tumoraux développant des mécanismes leur permettant d'échapper au SI : on parle alors d'évasion immunitaire (Figure 16).

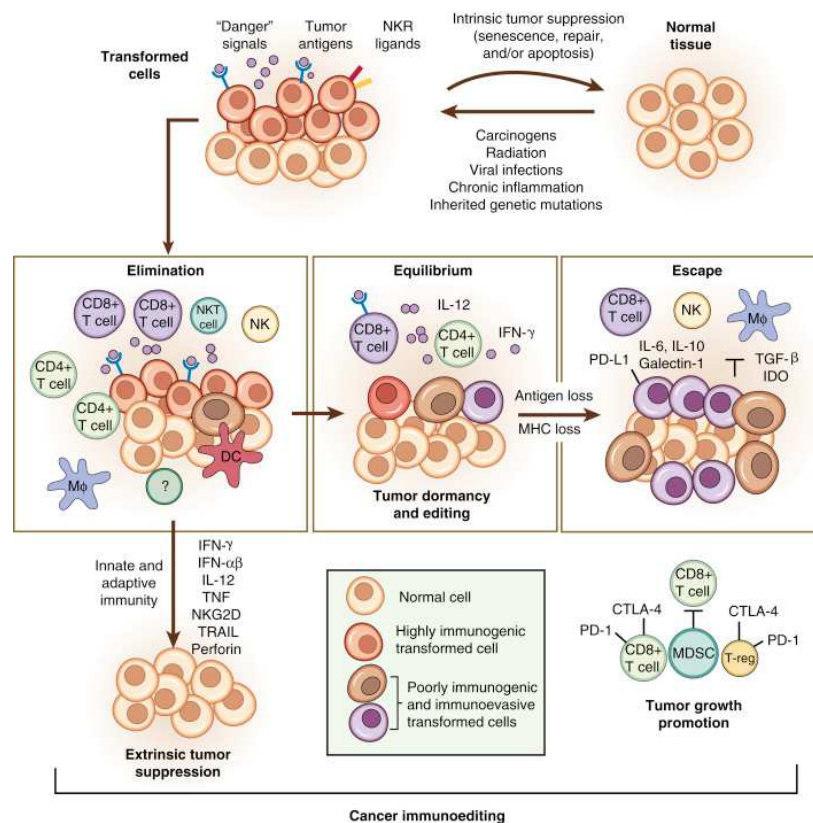


Figure 16. Immunoeediting

Source : (57)

La tolérance du SI vis-à-vis de la cellule tumorale (appelée *escape* sur la Figure 16) peut être expliquée par plusieurs mécanismes (58):

- Augmentation de l'expression des récepteurs inhibiteurs à la surface des LT (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4* (CTLA-4), *programmed cell death-1* (PD1), *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3* (TIM-3), *lymphocyte-activation gene-3* (LAG-3), etc). Ces récepteurs envoient des signaux d'inhibition de l'activation et de la prolifération des LT.
- Augmentation de l'expression des ligands interagissant avec les récepteurs inhibiteurs des LT tels que *programmed death-ligand 1* ou 2 (PD-L1, PD-L2), présents notamment sur les cellules tumorales.

- Présence de cellules immunosuppressives telles que les Treg et les cellules myéloïdes suppressives (*myeloid-derived suppressor cells* (MDSC)) dans le microenvironnement tumoral.
- Diminution de l'expression de ligands reconnus par les effecteurs cytotoxiques tels que les NK et les LT CD8⁺ (perte d'expression ou clivage de molécules composant le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)-I, perte d'expression de molécules de stress cellulaire)

Il est important de noter, toutefois, que les différents types de tumeur ne se comportent pas de la même façon vis-à-vis du SI. L'immunogénicité, qui est la capacité d'induire une réponse immunitaire, peut être très différente en fonction du type de cellule tumorale et du stade d'évolution du processus tumoral.

2.2.2.2. Immunogénicité de la tumeur

L'immunogénicité de la tumeur est la capacité de déclencher une réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses. Elle intervient à trois niveaux (58):

- Propriétés intrinsèques de la cellule tumorale

Des anomalies de réplication de l'ADN et du système de réparation de l'ADN entraînent des mutations multiples qui vont être traduites par l'expression de néo-antigènes propres à la tumeur et/ou par la modification du niveau d'expression d'un antigène préexistant ou encore de son expression ectopique. Le niveau de néo-antigènes doit être suffisamment élevé pour induire une réponse du SI. En effet, des études ont montré qu'il faut un certain seuil d'expression d'antigènes pour pouvoir déclencher une réponse antitumorale immunitaire spécifique (59).

- Microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral inclut la matrice extracellulaire et les cellules stromales, les cellules de l'immunité innée (macrophages, neutrophiles, mastocytes, MDSC, les NK et les DC) et les cellules de l'immunité adaptative (LB et LT). Selon leur phénotype ou polarité, chaque type de cellules immunitaires peut participer à un processus antitumoral ou pro-tumoral.

- Barrières physiques

La sécrétion de molécules composant la matrice extracellulaire telles que le collagène et le fibrinogène par les fibroblastes limite l'accessibilité vers la tumeur pour les différents acteurs du SI. La dérégulation angiogénique limite également la diapédèse des cellules immunitaires.

La caractérisation du SI intratumoral dans différents types de cancer est de plus en plus décrite et offre des éléments pronostiques et prédictifs de la réponse aux chimiothérapies et/ou immunothérapies. En effet il a été montré dans de nombreuses tumeurs solides colorectales, mélanomes, cancer du sein, des ovaires, de la tête et cou, qu'une forte infiltration lymphocytaire était associée à une survie prolongée (60) et particulièrement une infiltration de T cell de type Th1 (61). Une récente méta-analyse s'est intéressée tout particulièrement à la valeur pronostic des Treg dans la tumeur ; l'analyse de 59 études regroupant 12563 patients atteints de cancers divers indique que la densité de Treg est associée à une survie globale plus courte (62).

2.2.2.3. Immunothérapie

L'immunothérapie agit sur le SI du patient pour (r)établir une immunité antitumorale. Elle est de plus en plus utilisée ou testée dans différents cancers. Elle regroupe les vaccins thérapeutiques, la thérapie cellulaire, la virothérapie et les anticorps immunomodulateurs. Parmi ces derniers, les plus couramment utilisés sont les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (*immune checkpoint blockers* - ICB) tels que les anticorps antagonistes anti-CTLA-4, anti-PD1 et anti-PD-L1. Comme vu précédemment, les cellules tumorales sont capables de détourner l'action des cellules immunitaires en inactivant les LT *via* une interaction avec les points de contrôle. Cette nouvelle classe thérapeutique est considérée comme une révolution thérapeutique et a fait l'objet du prix Nobel de physiologie ou médecine en 2018 décerné à James P. Allison et Tasuku Honjo.

Brièvement les anticorps anti-CTLA-4 sont les premiers de cette classe thérapeutique. Le CTLA-4 est exprimé sur les LT CD8⁺, les LT Th et les Treg. En 2011 l'ipilimumab a reçu l'AMM par la FDA et l'European Medicine Agency (EMA) pour le traitement du mélanome métastatique. Il a montré une amélioration de la survie globale avec une bonne tolérance (63).

La deuxième génération d'ICB mise sur le marché est l'ensemble des anticorps dirigés contre PD1. Comme le CTLA-4, le PD1 est exprimé au niveau des LT CD4⁺, des LT CD8⁺ et des Treg. Elle est principalement représentée par les deux molécules suivantes : le nivolumab et le pembrolizumab. Ces anticorps ont montré une efficacité antitumorale dans plusieurs cancers ; cancer du poumon non à petites cellules métastatiques, le mélanome, le carcinome à cellules rénales, le lymphome de Hodgkin, le cancer épidermoïde de la tête et du cou, du carcinome urothélial. Le ligand du PD1, présent à la surface des cellules tumorales, est également une cible thérapeutique qui a mené au développement d'anticorps dirigés vers PD-L1 ou PD-L2 : l'atezolizumab, durvalumab et l'avelumab sont utilisés respectivement dans le cancer de la vessie et du poumon, dans le cancer du poumon et

dans le carcinome de Merkel. Les grands avantages des ICB sont leur bonne tolérance en comparaison avec la chimiothérapie conventionnelle, la stabilité de la réponse et leur large spectre d'activité antitumorale.

Les ICB utilisés aujourd'hui en clinique ciblent les points de contrôle inhibiteurs des LT. La complexité et l'hétérogénéité du microenvironnement immunosuppresseur tumoral conduit à chercher d'autres cibles d'action de l'immunothérapie anticancéreuse. De nouvelles cibles ont été découvertes et font l'objet de développements thérapeutiques. En effet, il existe de nombreux autres points de contrôle immunitaires qui vont activer les LT (comme l'OX40) ou encore qui se trouvent sur d'autres cellules du SI telles que les NK qui peuvent être ciblés par des anticorps. C'est le cas des anticorps anti-KIR et anti-NKG2A pour réactiver les NK, les anticorps anti-CD40 qui vont favoriser la présentation d'antigène par les DC ou encore les macrophages immunosuppresseurs qui peuvent être ciblés par des anticorps anti-*colony stimulating factor 1 receptor* (CSF1R) (64). Les macrophages sont en effet une cible prometteuse car ils représentent une proportion majoritaire dans le microenvironnement tumoral parmi les cellules du SI (65, 66) (Figure 17).

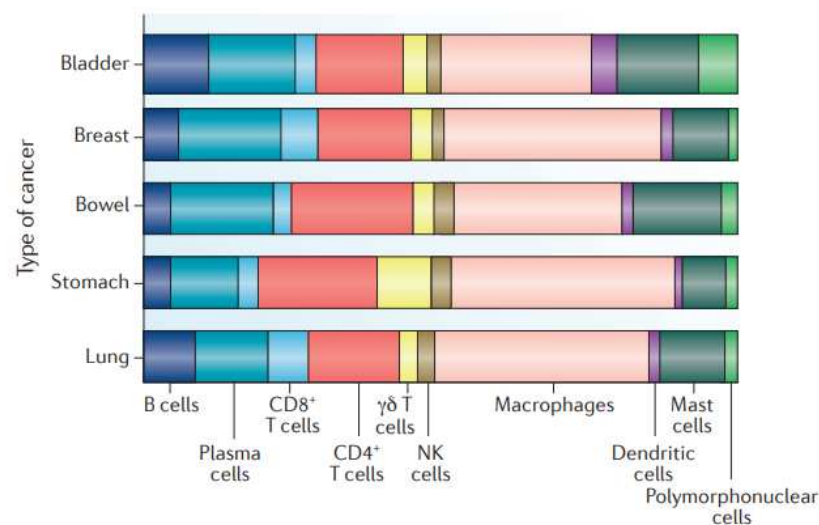


Figure 17. Distribution des différents acteurs immunitaires intratumoraux selon les cancers.

Source : (66)

L'installation ou la restauration de l'immunité antitumorale est un défi thérapeutique majeur car elle offre une activité cytotoxique et aussi un ciblage spécifique des cellules cancéreuses avec une efficacité prolongée grâce à l'obtention d'une mémoire immunitaire. Dans la partie suivante, nous

allons rappeler la dualité d'action de certains anticancéreux qui ont une action directe cytotoxique et une action indirecte *via* l'activation immunitaire.

2.2.3. Chimiothérapie : agent cytotoxique et immunomodulateur

2.2.3.1. Rationnel

Les agents antinéoplasiques peuvent agir en synergie avec le SI par différents mécanismes et à différents niveaux de l'immunogénéicité de la tumeur. Ils peuvent agir directement sur les propriétés intrinsèques de la cellule tumorale ; en effet, de par leur propriété cytotoxique, la chimiothérapie va permettre la libération d'antigènes lors de la mort de la cellule tumorale qui pourront donc être reconnus par les acteurs du SI et entraîner la cascade immunitaire de défense. Par ailleurs, la plupart des chimiothérapies induisent une mort de la cellule tumorale par apoptose, qui est généralement « immunologiquement silencieuse ». En effet la mort par apoptose est une mort dite « propre » qui implique la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire, la genèse de corps apoptotiques qui vont être reconnus et phagocytés rapidement par les macrophages. Cependant certaines chimiothérapies peuvent induire une mort par apoptose qualifiée d'immunogène, favorisant ainsi l'action du SI antitumoral ; on parle alors de mort immunogénique. Par exemple il a été démontré que l'oxaliplatine induisait une mort immunogénique dans le cadre du cancer du côlon (67).

Les agents cytotoxiques peuvent également agir au niveau du microenvironnement tumoral, c'est à dire directement sur les acteurs du SI : on parle de chemoimmunomodulation (68). En effet, ils peuvent interagir avec les différents acteurs du SI pour les activer ou favoriser leur différenciation ou leur maturation (LT Th1, macrophages M1, DC) ou les inactiver (MSDC, Treg, macrophages M2). De plus, il a été démontré que des doses non cytotoxiques de ces agents permettait la plupart de temps d'induire ces effets immunologiques (69).

2.2.3.2. Agents cytotoxiques immunomodulateurs autres que les Oxazaphosphorines

De nombreux agents antitumoraux possèdent des propriétés immunomodulatrices. Ils peuvent impacter de façon quantitative ou qualitative les différents acteurs du SI, à des doses cytotoxiques et/ou à faibles doses (Tableau 6).

Diminution des cellules immunosuppressives

La gemcitabine est un agent cytotoxique, antimétabolite, largement décrit dans la littérature pour ces propriétés immunomodulatrices. Une étude murine menée sur une différents types de tumeurs a montré qu'une injection unique de gemcitabine à 120 mg/kg (dose cytotoxique couramment utilisée chez le petit animal, équivalente à celle utilisée chez l'homme (70)) réduit fortement le nombre de MDSC dans la rate mais préserve le nombre de LT, LB, NK et macrophages (71). Le 5-Fluorouracile (5-FU), antimétabolite de l'ADN, est également sélectivement cytotoxique pour les MDSC ; en effet il a été montré dans un modèle murin de lymphome que le 5-FU à faible dose, 50 mg/kg (injection unique en IP) diminue le nombre de MDSC dans la rate et la tumeur, sans effet sur le nombre de LT, NK et LB (72). Comparé à la gemcitabine, le 5-FU serait même plus cytotoxique sur les MDSC. Dans un modèle murin de cancer du sein, il a été démontré également qu'une administration IV de doxorubicine à 2,5 (faible dose) et 5 mg/kg (dose cytotoxique), entraînait une diminution des MDSC dans la rate, le sang et la tumeur avec une augmentation de la proportion de NK et LT CD8⁺ ainsi que de l'expression de perforine et granzyme, et de la sécrétion d'IFN γ par les LT CD8⁺ (73). Le docetaxel a également été étudié pour ses propriétés immunomodulatrices dans un modèle *in vivo* de cancer murin du sein ; après deux injections IP de 33 mg/kg (dose cytotoxique) à J14 et 21 post implantation de la tumeur, les MDSC splénique diminuent de manière très significative, cette diminution est accompagnée d'une augmentation de l'activité cytotoxique des LT CD8⁺ (74).

La fonctionnalité et la densité des Treg sont aussi modulées par l'action de chimiothérapies administrées en faible dose. Dans un modèle de gliome chez le rat, le témozolomide faible dose administré de façon métronomique (0,5 mg/kg/jour, 5 jours sur 7 pendant 3 semaines en comparaison avec la dose standard de 30 mg/kg/jour pendant 5 jours), le nombre de Treg spléniques et intratumoraux diminuent alors qu'à forte dose le pourcentage de Treg est inchangé (75).

Maturation des DC et polarisation des macrophages

Il a été montré que les agents administrés à faible dose tels que la vinblastine favorisent la maturation fonctionnelle des DC *via* l'augmentation de l'expression de CD40, CD80 et CD86 ainsi que

de CMH-II, IL-1 et IL-6 conduisant à l'activation des LT (76). Le paclitaxel, doxorubicine et le méthotrexate à faible dose améliore la présentation des antigènes par les DC aux LT (77).

Les macrophages sont aussi des cibles de modifications, phénotypiques notamment, par différents agents antitumoraux. Dans un modèle murin de cancer du sein, le docetaxel (deux injections IP de 33 mg/kg) favorise la polarisation des MDSC spléniques en macrophages M1 ; cette propriété serait due à une action sur la voie de signalisation du *signal transducer and activator of transcription* (STAT) 3 (74).

Une étude *in vitro* a montré que le cisplatine n'est pas cytotoxique pour les macrophages mais, à travers son action d'inducteur de cassures d'ADN, il active la protéine kinase ATM menant à la transcription d'*interferon regulatory factor 5* (IRF5), facteur favorisant la polarisation des macrophages en phénotype M1 (78).

Augmentation du phénotype Th1 et des LT CD8⁺

Certaines chimiothérapies telles que les dérivés de platine améliorent l'activité des LT Th1 *via* l'inhibition de l'expression des ligands de PD1 (79). Les anthracyclines telles que la doxorubicine (2 mg/kg IV) améliore la prolifération des LT CD8⁺ et favorise leur infiltration au sein de la tumeur dans des modèles de fibrosarcome, carcinomes mammaires murins (80).

Agent	Indications	Notes
Carboplatin	Ovarian carcinoma, lung cancer, head and neck cancer	<ul style="list-style-type: none"> Inhibits PDL2 expression
Cisplatin	Sarcoma, lymphoma, germ cell tumour, lung cancer, ovarian cancer	<ul style="list-style-type: none"> Inhibits PDL2 expression Increases the permeability of tumour cells to granzyme B
Cyclophosphamide	Lymphoma, leukaemia, solid tumours	<ul style="list-style-type: none"> Immunosuppressive at high doses Increases class I HLA expression on cancer cells Selectively inhibits T_{reg} cells and MDSCs, perhaps with a preferential activity on intratumoural populations Favours the differentiation of IL-17-producing CD4⁺ cells Stimulates the expansion of CD8α⁺ DCs Restores T cell and NK cell functions Inhibits IL-4, IL-10 and IL-13 production Induces immunogenic cell death
Daunorubicin	AML, neuroblastoma	<ul style="list-style-type: none"> Exacerbates antigen expression by cancer cells, thus promoting IL-2 and IFNγ synthesis by local T cells
Docetaxel	NSCLC, breast cancer, ovarian cancer, prostate cancer	<ul style="list-style-type: none"> Depletes MDSCs, possibly by inhibiting STAT3-dependent gene expression Induces MCP1 expression on tumour cells, in turn driving the establishment of an immunosuppressive stroma
Doxorubicin	Several solid and haematopoietic tumours	<ul style="list-style-type: none"> Favours the proliferation of tumour-specific CD8⁺ T cells Promotes tumour infiltration by IL-17-secreting $\gamma\delta$ T cells and activated IFNγ-secreting CD8⁺ T cells Induces immunogenic cell death Stimulates antigen presentation by DCs Increases the permeability of tumour cells to granzyme B Induces MCP1 expression on tumour cells, in turn driving the establishment of an immunosuppressive stroma
Gemcitabine	NSCLC, pancreatic cancer, bladder cancer, breast cancer	<ul style="list-style-type: none"> Increases class I HLA expression Enhances tumour antigen cross-presentation Selectively kills MDSCs
Methotrexate	Several solid and haematopoietic tumours	<ul style="list-style-type: none"> Immunosuppressive at high doses Stimulates DC maturation and function
Mitoxantrone	Breast cancer, AML, non-Hodgkin's lymphoma	<ul style="list-style-type: none"> Induces immunogenic cell death
Oxaliplatin	Colorectal cancer	<ul style="list-style-type: none"> Increases class I HLA expression Inhibits PDL2 expression Induces immunogenic cell death
Paclitaxel	Kaposi's sarcoma, lung cancer, ovarian cancer, breast cancer, head and neck cancer	<ul style="list-style-type: none"> Specifically impairs cytokine production and viability in FOXP3⁺ T_{reg} cells but not in FOXP⁻ CD4⁺ effector cells Stimulates antigen presentation by DCs Increases the permeability of tumour cells to granzyme B Induces MCP1 expression on tumour cells, in turn driving the establishment of an immunosuppressive stroma
Vincristine	Non-Hodgkin's lymphoma	<ul style="list-style-type: none"> Increases the abundance of CD83⁺ DCs and type I DCs Stimulates antigen presentation by DCs
Vinorelbine	Breast cancer	<ul style="list-style-type: none"> Vinorelbine-treated tumour cells facilitate the bystander death of immune cells

AML, acute myeloid leukaemia; DC, dendritic cell; HLA, human leukocyte antigen; IFN γ , interferon- γ ; IL-2, interleukin-2; MCP1, monocyte chemoattractant protein 1; MDSC, myeloid-derived suppressor cell; NK, natural killer; NSCLC, non-small-cell lung cancer; PDL2, programmed death ligand 2; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; T_{reg}, regulatory T cell (forkhead box P3 (FOXP3)⁺ immunoregulatory lymphocyte).

Tableau 6. Tableau récapitulatif des principales chimiothérapies immunomodulatrices.

Source: (79)

2.2.3.3. Les Oxazaphosphorines : agents immunomodulateurs

Concernant les Oxazaphosphorines, de nombreuses études menées sur le CPM ont démontré ses propriétés immunomodulatrices. Cependant, concernant son analogue chimique, l'IFO, peu d'investigations ont été menées dans le domaine de l'immunomodulation.

Cyclophosphamide

De nombreuses études pré-cliniques et cliniques ont démontré l'effet immunomodulateur du CPM. La première expérience démontrant l'activité du CPM vis à vis du SI a été conduite par une équipe anglaise en 1964 ; elle a démontré la propriété très lymphodéplétante du CPM pour les LB à doses estimées non toxiques (81). Très vite le CPM fut testé dans les rhumatismes articulaires de type inflammatoire pour ses propriétés immunosuppressives et anti-inflammatoires à la dose de 1 mg/kg/jour per os (82).

Concernant le domaine de l'oncologie, la première étude trouvée dans la littérature scientifique qui a prouvée l'effet du CPM sur l'immunogénéicité de la tumeur a été menée en 1973 dans un modèle de sarcome murin (MCA-2), après l'injection IP d'une dose unique de CPM 200 mg/kg (dose cytotoxique) chez des souris immunodéprimées (ID) ou immunocompétentes (IC). Après une injection de 200 mg/kg en même temps que l'implantation tumorale, soit la prise de la tumeur (tumeur palpable) était retardée d'une dizaine de jours, soit aucune prise tumorale n'était observée chez les souris IC alors que chez les souris ID, le CPM n'avait pas d'effet sur la prise tumorale. Cette expérience démontre que chez l'hôte IC, les facteurs immunitaires contribuent considérablement à l'activité antitumorale de la chimiothérapie par CPM (83). L'année suivante, en 1974, l'équipe de Steele et Pierce pose le concept pour lequel le CPM possède une double action antitumorale : une action cytotoxique directe et une action indirecte induite par l'activation de l'immunité antitumorale (84). Polak *et al.* ont montré dans un modèle chez le cochon, la capacité du CPM à « casser » la tolérance immunologique après l'injection unique IP à 250 mg/kg trois jours avant la sensibilisation, à travers une inhibition de l'activité des cellules immunosuppressives (85). De plus, le CPM présente une sélectivité pour les lymphocytes T et est donc aujourd'hui fréquemment utilisé dans les protocoles de vaccination des tumeurs afin de contrôler l'allo-réactivité post-transplantation dans la moelle osseuse. Le schéma posologique est particulièrement important pour l'effet immunologique ; la notion de dose immunomodulatrice a été mise en avant après l'étude de Mokyr *et al.* qui a testé les doses de CPM de 15 et 200 mg/kg. Dans un modèle murin de myélome multiple, les auteurs ont montré que les deux doses injectées en dose unique IP avait une action antitumorale différente ; celle induite par le CPM à 200 mg/kg était seulement due l'action cytotoxique de la molécule sur les cellules tumorales alors que celle induite par le CPM à 15 mg/kg était seulement due à l'immunité

antitumorale induite par le CPM car un blocage de la réponse immunitaire cellulaire entraîne une inefficacité du traitement à cette dose (86). Dans une étude clinique sur des patients atteints de différents types de cancer, il a été démontré que le prétraitement par une unique faible dose de CPM administrée en IV (300 mg/m²) augmentait la réponse immunitaire humorale et cellulaire sans être lymphopénisante sur les LB contrairement à la dose de 1000 mg/m², la dose recommandée (87). Quelques années plus tard, l'équipe de Berd *et al.* a démontré que le CPM faible dose (300 mg/m² en IV, injection unique chez l'adulte) réduit la fonction des Treg sans modification des LT CD8⁺ (88). Le nombre de Treg est également affecté par le mafosfamide (forme pré-activée du CPM) à faibles doses ; 24h après post-traitement, le Treg montre un taux élevé de γ H2AX, marqueur du dommage de l'ADN, contrairement au LT CD8⁺ et LT Th (89). Dimeloe *et al.* proposent une explication sur la sensibilité des Treg à faible dose de CPM par rapport aux autres cellules CD4⁺. Le Treg n'exprime pas le transporteur ABC1B or le CPM est un substrat de ce dernier. L'absence de ce transporteur au niveau des Treg empêche l'efflux du CPM hors de la cellule et ainsi entraîne une accumulation intracellulaire plus importante (90). Ghiringhelli *et al.* confirment en 2007 qu'une faible dose de CPM administrée chez l'homme régulièrement à savoir 50 mg per os 2/j (soit 1,5 mg/kg/j) pendant une semaine puis une semaine off pendant un mois ou plus diminue le taux de Treg. Une dose supérieure de 100 mg per os 2/j pendant une semaine puis une semaine off a été également testée par cette même équipe de recherche qui a conclu à une diminution non spécifique des lymphocytes (91). Cependant, il est à noter que le CPM peut également augmenter le nombre de cellules suppressives dérivées de myéloïdes (92). Par ailleurs, Binotto *et al.* ont démontré qu'une faible dose de CPM potentialise la synthèse et l'action d'IL-2 et IFN γ . Ces deux dernières cytokines favorisent la différenciation des LT vers un type Th1 (93). L'action immunomodulatrice du CPM impliquerait également la notion de mort immunogène, précédemment décrite ; une injection IP à 100 mg/kg dans un modèle murin, entraîne une translocation de la calréticuline, qui est un signal de phagocytose de « mangez-moi » et une sous régulation du CD31 qui au contraire est un signal de « ne me mangez pas », ainsi que la libération de la *high-mobility group box1 protein* (HMGB1) dans le milieu extracellulaire qui se lie au *Toll like receptor 4* (TLR4) des DC (94). En effet, l'effet du CPM sur les DC a été démontré ; dans un modèle murin, le nombre de DC était significativement augmenté dans la moelle osseuse de souris 3 jours après avoir reçu une injection de CPM (4 mg/souris soit environ 200 mg/kg). L'effet quantitatif du CPM est également accompagné d'une augmentation de l'activation de ces DC après stimulation par des agonistes des TLR. Le nombre de cellules mononucléées a quant à lui diminué suite au traitement par CPM (95).

Concernant les métabolites du CPM, seules quelques études sont disponibles sur leur effet immunomodulateur. Le 4-hydroperoxycyclophosphamide, métabolite libérant de HO-CPM sans

métabolisation hépatique, possède également des propriétés immunomodulatrices en favorisant la réponse immunitaire médiée par les LT (96). Une autre étude a montré que l'ACR avait des effets immunomodulateurs ; après injection de 100 µmol/kg d'ACR par voie IV dans un modèle murin la veille de l'exposition à un antigène spécifique, il a été observé une augmentation de 50% de la réponse d'hypersensibilité de type retardée. Il a été également montré *in vitro* que l'ACR entraînait une augmentation de la réponse cellulaire T-dépendante à la différence de la moutarde phosphoramidate (97).

Ifosfamide

Peu d'études rapportent l'effet immunomodulateur de l'IFO. Une première étude clinique allemande a décrit une population de patients atteints d'un cancer testiculaire non séminomateux métastatique ayant reçu de l'IFO : 15% des patients présentaient une diminution des concentrations sériques d'IgM ainsi qu'une augmentation du nombre de macrophages (98). Par la suite Issels *et al.* ont démontré en 1993 qu'*in vitro* le HOO-IFO, prodrogue de la moutarde isophosphoramidate ne nécessitant pas une métabolisation par les CYP, était responsable d'une déplétion en GSH intracellulaire entraînant ainsi une inhibition de la prolifération des lymphocytes circulants malgré la stimulation par l'IL-2, sans altération de la viabilité (99). Botzler *et al.* confirment ces données avec le HOO-IFO, mais ils ajoutent que la concentration nécessaire pour diminuer le taux de GSH intracellulaire de 50% est largement supérieure à la concentration pouvant être atteinte chez l'homme. Cependant, ils montrent que le CAA diminue également le taux de GSH intracellulaire, et à des concentrations similaires atteinte chez les patients ; le CAA serait donc la principale origine de la déplétion *in vivo* du GSH (100). L'inhibition de la prolifération des lymphocytes est IFO dose-dépendante (93) et est réversible à l'introduction concomitante de Mesna ou de GSH-OEt qui permettent une rapide reconstitution du taux intracellulaire de GSH (101, 102). De plus, ces auteurs mettent en évidence l'absence d'action de l'IFO sur les NK, en effet l'IFO ne semble pas influencer les taux de GSH et donc l'activité et la prolifération de ces dernières (101). L'explication proposée par l'équipe de Kuppner est que les NK possèdent une réserve initiale plus importante de GSH ainsi qu'un rendement de régénération plus élevé (103) et sont donc insensibles aux variations du taux de GSH.

La place du SI antitumorale en fait une cible rationnelle pour le traitement des cancers. L'utilisation de chimiothérapies conventionnelles offre une opportunité de moduler ce SI par modulation des schémas posologiques. De plus, la chimiothérapie conventionnelle est non spécifique et cible principalement les cellules à division cellulaire rapide entraînant des effets indésirables pouvant conduire au décès du patient. La possibilité de diminuer la dose d'agents cytotoxiques avec une amélioration de la défense immunitaire antitumorale permet de diminuer voire d'éliminer les effets indésirables liés à l'utilisation des chimiothérapies.

Mettre à profit le SI pour une double action antitumorale de la chimiothérapie est très clairement une stratégie thérapeutique à explorer pour améliorer de la balance efficacité/toxicité des traitements du cancer.

3. Objectifs de la thèse

Paracelsus citait « Toutes les choses sont poison, et rien n'est sans poison ; seule la dose fait qu'une chose n'est pas poison » (XV^{ème} siècle). Cette expression souligne parfaitement le concept de la relation entre dose et effets et la limite entre efficacité et toxicité. Dans le domaine de l'oncologie, il est d'autant plus important de parler de dose ; l'étroite fenêtre thérapeutique des agents cytotoxiques est due notamment à leur manque de spécificité pour la tumeur. En effet, il faut i) cibler le tissu tumoral pour éviter les toxicités sur les tissus sains, ii) pendant un temps optimal afin d'éliminer les cellules tumorales et iii) à la bonne dose pour être efficace. Ces trois aspects définissent le concept de *drug delivery system* (DDS). Les développements de DDS font l'objet de nombreuses recherches parmi lesquelles figurent principalement les modifications chimiques et les optimisations galéniques (104). L'application de ces développements à l'agent thérapeutique IFO est une stratégie très prometteuse. En effet l'IFO est un alkylant de l'ADN présentant un profil pharmacocinétique très complexe limitant son utilisation en clinique malgré l'importante efficacité antitumorale de sa moutarde azotée. Le développement d'analogues de l'IFO permettant de contourner la voie toxicogène et de favoriser la voie activatrice promet l'amélioration de son utilisation en clinique. Notre équipe a synthétisé des dérivés terpéniques pré-activés ne nécessitant plus de métabolisation hépatique pour être actifs (54). L'ajout d'une chaîne à cinq carbones (pentyloxy-IFO), dix carbones (G-IFO), quinze carbones (F-IFO) ou encore trente carbones (SQ-IFO) a permis d'apprécier l'efficacité *in vitro* en l'absence de CYP et de confirmer la preuve de concept de pré-activation.

Le premier objectif de ce travail de thèse a porté sur l'étude pharmacocinétique et pharmacologique de ces analogues de l'IFO. Cependant ces études ont souligné des problématiques de stabilité en solution, de biodistribution et de tolérance veineuse post-injection IV. Plusieurs stratégies d'optimisation ont été évoquées et explorées ; elles composent le deuxième objectif de cette thèse. La propriété d'autoassemblage de trois de ces analogues, le G-IFO, F-IFO et SQ-IFO, ont permis d'exploiter le concept de « *Magic Bullet* » de Paul Ehrlich, par la formulation de nano-objets. La forme dite « libre » a, quant à elle, été également exploitée afin d'améliorer la biodisponibilité ainsi que la tolérance de l'administration parentérale.

Aux développements et optimisations, chimiques et galéniques, de l'IFO, s'ajoute également la meilleure connaissance du rôle de l'immunité dans le processus tumoral. Depuis plusieurs décennies, les chercheurs ont élargi la stratégie thérapeutique anticancéreuse en ciblant non plus la cellule tumorale directement mais le système immunitaire afin de l'aider à éliminer les cellules tumorales.

En effet, certaines chimiothérapies conventionnelles sont dotées de propriétés dites immunomodulatrices lorsqu'elles sont utilisées à faible dose c'est à dire à dose non cytotoxique. A la citation de Paracelsus, pourrait être ajoutée la notion de dose immunogène pour définir la limite entre immunomodulation et cytotoxicité. Cette dualité est largement décrite pour l'isomère de position de l'IFO, le CPM ; à faible dose le CPM se comporte comme agent immunomodulateur dans le traitement des divers cancers et dans les maladies inflammatoires telles que rhumatologiques, alors qu'à forte dose, il est utilisé en tant qu'immunosuppresseur dans le cadre de conditionnement de greffe de moelle osseuse. Concernant l'IFO à forte dose, il est utilisé en tant qu'agent alkylant. Son utilisation à faible dose n'a pas encore été exploitée (Figure 18). Le troisième objectif de ce travail de thèse a porté sur l'étude des propriétés immunomodulatrices de l'IFO et de l'analogue pré-activé G-IFO sous forme libre. L'émergence des immunothérapies en cancérologie ainsi que l'immunomodulation due aux les cytotoxiques, nous ont suggérés qu'il serait pertinent d'étudier la combinaison entre ces deux types de thérapies.

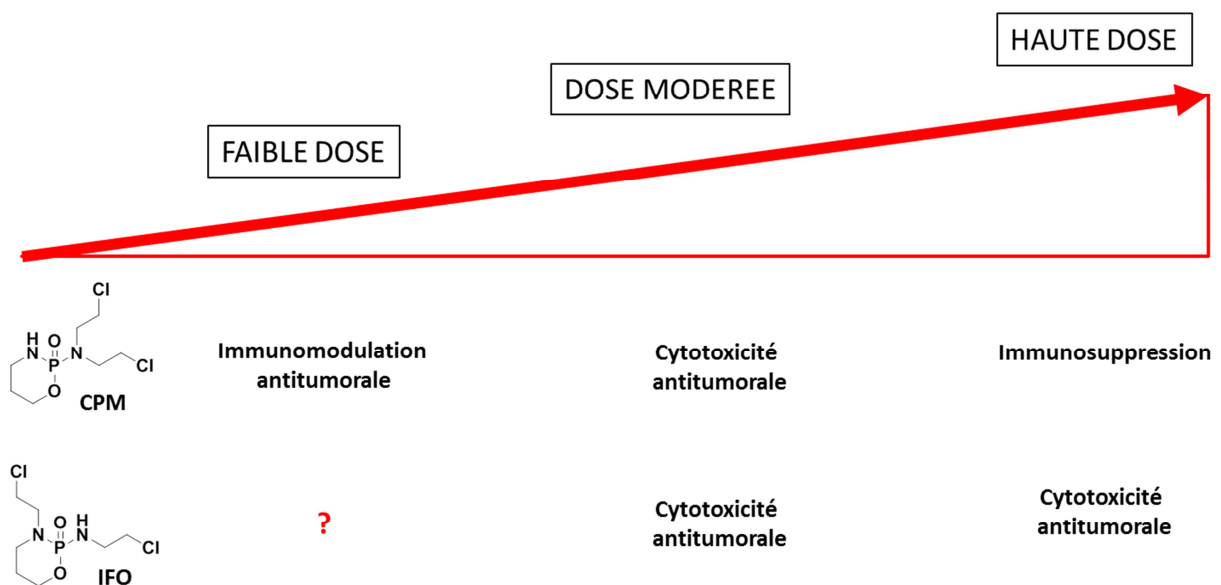


Figure 18. Comparaison entre CPM et IFO sur leur activité en fonction de la dose

L'action des Oxaza relève de la relation dose-effet. Le CPM et l'IFO à dose modérée présente une action cytotoxique alkylante. A doses plus élevées, le CPM est utilisé en tant qu'immunosuppresseur notamment dans les conditionnements myéloablatif tandis que l'IFO est utilisé comme traitement antitumorale. A de plus faibles doses, le CPM est utilisé comme agent immunomodulateur. L'IFO à faibles doses n'a pas été étudié à l'heure actuelle.

Ce travail de thèse a porté sur l'optimisation pharmacologique (chimique et galénique) et immunologique de l'IFO pour une amélioration de l'utilisation clinique tant du point de vue de l'efficacité que de la toxicité (Figure 19). Les propriétés immunomodulatrices de ces Oxaza permettent d'envisager de nouvelles perspectives dans l'utilisation de ces dérivés en association avec l'ensemble des traitements médicamenteux du cancer.

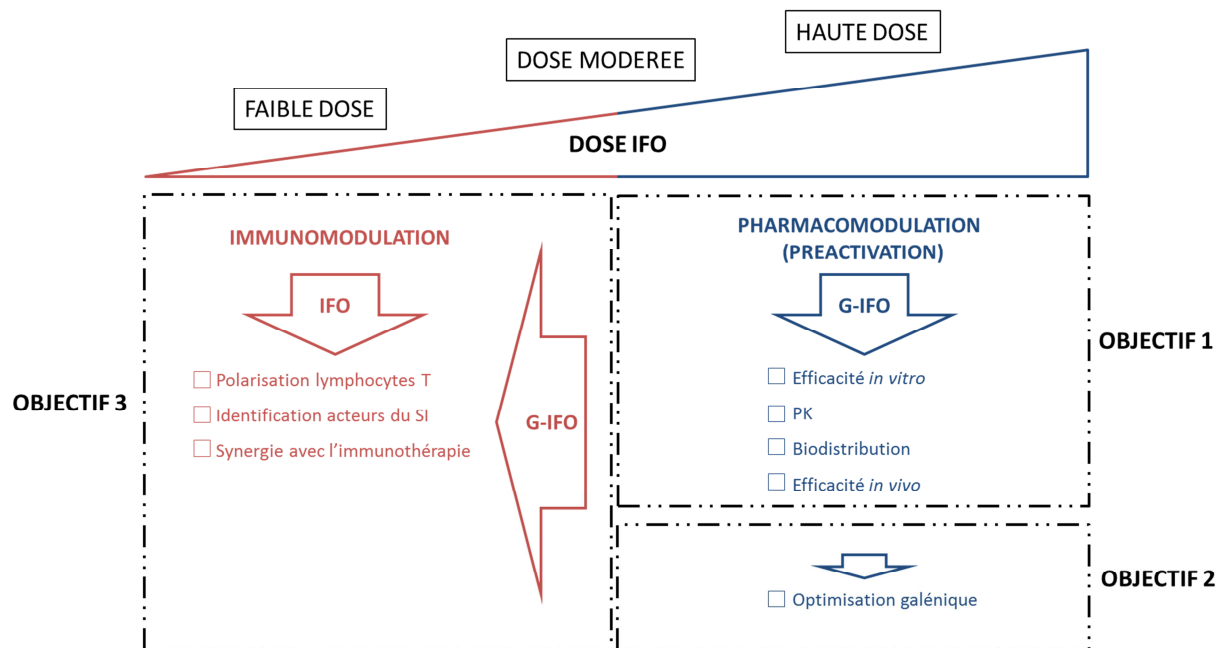


Figure 19. Objectifs de la thèse

L'objectif de ce travail de thèse est triple. L'objectif 1 consiste à étudier le nouvel analogue pré-activé de l'IFO, le G-IFO, synthétisé pour diminuer les effets indésirables principalement présents lors des protocoles « haute dose ». Le profil pharmacocinétique et l'efficacité antitumorale *in vivo* sont étudiés. L'objectif 2 porte sur l'optimisation galénique du G-IFO. L'objectif 3 porte sur le potentiel immunomodulateur du G-IFO et de la molécule parente, l'IFO, à faibles doses.

1. Publication 1 “Poly-isoprenylated ifosfamide analogs: Preactivated antitumor agents as free formulation or nanoassemblies”

Précédemment, notre équipe a proposé une stratégie de pharmacomodulation permettant d’obtenir la forme oxydée de l’IFO en position 4 du cycle d’oxazaphosphorine sans intervention des CYP. Elle consiste à synthétiser des analogues présentant déjà l’oxygène en cette position. Elle a été initiée en 2001 (51) par la mise au point d’un protocole par oxydation anodique menant au MeO-IFO puis elle a été complétée en 2015 (54) par le couplage avec de chaînes aliphatiques, saturées ou insaturées, comportant 1 à 30 carbones. Ces composés ont été évalués *in vitro* sur seize lignées cellulaires tumorales humaines afin de démontrer la preuve de concept et ont montré une activité cytotoxique en absence de CYP. Les analogues à chaînes insaturées (G-IFO, F-IFO et SQ-IFO) ont montré une capacité de s’auto-assembler et ces formes présentent également une activité cytotoxique.

Nous avons par la suite confirmé l’activité antitumorale de G-IFO, F-IFO et SQ-IFO sous forme dite « libre » et sous forme de NA sur un plus large panel de lignées cellulaires tumorales. Puis nous avons cherché à mettre en évidence l’avantage de la formulation en NA sur la stabilité chimique des composés en comparaison avec leur forme libre. A la suite de ces résultats, nous avons sélectionné le G-IFO pour les premières études *in vivo*, études ayant pour but de caractériser son profil pharmacocinétique et de déterminer la dose maximale tolérée. Ces analyses sont présentées dans l’article intitulé « Poly-isoprenylated ifosfamide analogs : Preactivated antitumor agents as free formulation or nanoassemblies ».



Poly-isoprenylated ifosfamide analogs: Preactivated antitumor agents as free formulation or nanoassemblies



Charles Skarbak^a, Julia Delahousse^{a,e}, Catherine Pioche-Durieu^b, Sonia Baconnais^b, Alain Deroussent^a, Patrice Renevret^c, Michael Rivard^c, Didier Desmaele^d, Thierry Martens^c, Eric Le Cam^b, Patrick Couvreur^d, Angelo Paci^{a,e,f,*}

^a Vectorologie des anticancéreux et des acides nucléiques, UMR 8203, CNRS, Université Paris-Sud, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, 94805 Villejuif, France

^b Signalisations, Noyaux et Innovations en Cancérologie, UMR 8126, CNRS, Université Paris-Sud, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, 94805 Villejuif, France

^c Institut de Chimie et des Matériaux Paris Est Créteil (ICMPE), UMR 7182, CNRS, Université Paris Est (UPEC), 94320 Thiais, France

^d Institut Galien Paris-Sud, UMR 8612, CNRS, Université Paris-Saclay, Faculté de Pharmacie, 92296, Châtenay-Malabry, France,

^e Service de Pharmacologie, Département de Biologie et Pathologie médicales, Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France

^f Département de Pharmacocinétique & Pharmacie Clinique, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Faculté de Pharmacie, 92296 Châtenay-Malabry, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 January 2017

Received in revised form 19 May 2017

Accepted 20 May 2017

Available online 22 May 2017

Keywords:

Cancer drug delivery

Ifosfamide

Nanoassemblies

Prodrug

ABSTRACT

Oxazaphosphorines including cyclophosphamide, trofosfamide and ifosfamide (IFO) belong to the alkylating agent class and are indicated in the treatment of numerous cancers. However, IFO is subject to limiting side-effects in high-dose protocols. To circumvent IFO drawbacks in clinical practices, preactivated IFO analogs were designed to by-pass the toxic metabolic pathway. Among these IFO analogs, some of them showed the ability to self-assemble due to the use of a poly-isoprenyloxy chain as preactivating moiety. We present here, the *in vitro* activity of the nanoassembly formulations of preactivated IFO derivatives with a C-4 geranyloxy, farnesyloxy and squalenoxy substituent on a large panel of tumor cell lines. The chemical and colloidal stabilities of the geranyloxy-IFO (G-IFO), farnesyloxy-IFO (F-IFO) and squalenoxy-IFO (SQ-IFO) NAs were further evaluated in comparison to their free formulation. Finally, pharmacokinetic parameters and maximal tolerated dose of the most potent preactivated IFO analog (G-IFO) were determined and compared to IFO, paving the way to *in vivo* studies.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

During the last decades, the study of nanomedicine in medical applications has rose exponentially (Owen et al., 2014; Kruke-meyer et al., 2015). The majority of current nanomedicine platforms for chemotherapy have focused on the repacking of old and still used anticancer compounds (Brigger et al., 2002;

Chitkara et al., 2013; Maksimenko et al., 2014; Estanqueiro et al., 2015; Landesman-Milo et al., 2015; Shi et al., 2015). Nowadays, a large variety of nanosized drug delivery systems (DDS) is in development and studied in advanced clinical trials to manage the release of the compound at the target site. Polymeric nanoparticles, self-assembling amphiphilic compounds or polymeric vesicles (liposomes, micelles) are the most common DDS used in the development of nanomedicine strategies (Tong et al., 2012). Nevertheless, only few of them have obtained food and drug administration approval (Miele et al., 2009; Barenholz, 2012; Alphandery et al., 2015).

The property of these compounds to self-assemble into nanoassemblies (NAs) would bring more specificity to the tumor thanks to the so-called Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect (Gerlowski and Jain, 1986). It is now well described in literature that DDS systems have the advantage, at least for NAs up to 150–200 nm, to target the tumor vessels by EPR effect, taking the

Abbreviations: AUC, Area under the curve; CAA, Chloroacetaldehyde; DMSO, Dimethyl sulfoxide; DNA, Deoxyribonucleic acid; DDS, Drug delivery system; EPR, Enhanced permeability and retention; FF, Free formulation; IFO, Ifosfamide; IP, Intraperitoneal; IV, Intravenous; LC-MS/MS, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; MTD, Maximal tolerated dose; NA, Nanoassembly; NAs, Nanoassemblies; Pdl, Polydispersity index; TEM, Transmission electron microscopy.

* Corresponding author at: Université Paris-Saclay, Vectorologie des anticancéreux et des acides nucléiques, UMR CNRS 8203, Université Paris-Sud, Gustave Roussy, Villejuif 94805, France.

E-mail address: angelo.paci@gustaveroussy.fr (A. Paci).

advantage to accumulate and, consequently, to target the tumor (Maeda et al., 2000; Yin et al., 2014). Besides the passive targeting, NAs could be “decorated” by nanoprecipitation of specific ligands at the surface of the NAs, bringing specificity for tumor receptors or integrins (Gref et al., 2003; Muro, 2012).

The use of these new DDS is developed in many clinical applications but they brought significant advances in the cancer therapy field. Among the anticancer chemotherapy regimens, oxazaphosphorines are indicated in clinical practices to treat several cancers from soft-tissue tumor to lymphoma (Van Winkle et al., 2005; Wang and Wang, 2012). Oxazaphosphorines include cyclophosphamide, trofosfamide and ifosfamide (IFO) and belong to the class of alkylating agents. As prodrugs, they require a metabolic activation in position C-4 of the ring. This bioactivation process leads to a hydroxylated metabolite, which after a ring opening mechanism releases the active nitrogen mustard responsible for the cell death due to DNA cross-links (Boddy et al., 1993; Giraud et al., 2010). However, in the case of IFO, the active species is released in reduced amounts (10–20%). The relationship between dose and antitumor effect led pediatricians to the development of high-dose regimens. (Kurowski and Wagner, 1993; Le Cesne et al., 1995). Unfortunately, during high-dose protocols, up to 80% of IFO undergo a dealkylation reaction due to a competitive bioactivation pathway (Boddy et al., 1993; McCune et al., 2005). This second pathway oxidizes IFO side-chains leading to the release of inactive compounds such as deschloroethylated metabolites and a toxic one, the chloroacetaldehyde (CAA) (Bruggemann et al., 1997; Hanly et al., 2009; Giraud et al., 2010). Thus, as the key entity, HO-IFO is an unstable compound showing a very short half-life (about 10 min) in plasma at 37 °C and a rapid degradation (less than 20 min) at room temperature (Kerbusch et al., 1998), it cannot thus be directly administered. This administration would result in a spontaneous release of the active compound, the alkylating mustard at the administration point leading to a low activity at the action site and an increased local toxicity.

To circumvent the toxicity related to the release of CAA, we have designed IFO analogs by engraftment of saturated or unsaturated moieties on the C-4 carbon of the oxazaphosphorine ring in order to by-pass the low-yielding metabolic oxidation pathway. This strategy was established with the synthesis of methoxy-IFO as a biomimetic analog of IFO (Paci et al., 2001). The concept was extended in 2015 to poly-isoprenyloxy moieties as a DDS strategy based on this preactivated oxazaphosphorine (Skarbek et al., 2015). Thus, we have previously demonstrated that the engraftment of poly-isoprenyloxy moieties (i.e.: geraniol, farnesol and squalenol) led to new conjugates embedding self-assembling properties in aqueous media (Skarbek et al., 2015).

In the present work, we investigated the *in vitro* activities on a panel of human tumor cell lines of three poly-isoprenyloxy preactivated IFO analogs to assess their IC₅₀ (lung, ovarian, sarcoma, breast...). We fulfilled biopharmaceutical studies including chemical and colloidal stability investigations of these new chemical entities and a complete physical characterization of these NAs. Before moving to *in vivo* efficacy experiments, we explored the pharmacokinetic aspects of these new chemical entities.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Ifosfamide (HoloXan[®], IFO) was provided with 99.5% purity from Baxter Healthcare SA (Maurepas, France). 4-OH-IFO was prepared by reduction of 4-hydroperoxyifosfamide (4-HOOIFO) obtained by Niomech (Bielefeld, Germany) with 99% purity. Geranyloxy-ifosfamide (G-IFO), farnesyloxy-ifosfamide (F-IFO),

squalenyloxy-ifosfamide (SQ-IFO) and 13,17-dimethyloctanyloxyifosfamide (DMO-IFO) were synthesized with 99% purity as previously described (Skarbek et al., 2015). Their structures were assigned by ³¹P, ¹H and ¹³C-nuclear magnetic resonance and high resolution mass spectrometry. Hydrochloride semicarbazide (SCZ), hexamethylphosphoramide (HMPA), methyl *tert*-butyl ether (MTBE) dimethyl sulfoxide (DMSO), LC-MS grade solvent and polysorbate 80 (Tween 80[®]) were supplied by Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). For cell culture, Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), Roswell Park memorial institute medium (RPMI), fetal calf serum (FCS), penicillin, streptomycin and trypsin-EDTA were provided by Gibco (Paisley, UK) and MTS ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)) was provided by Promega (Charbonnières-les-Bains, France). Deionised water was prepared using a Milli-Q[®] (Millipore, Guyancourt, France). Solutions of dextrose 5% for infusion (Proamp[®]) were supplied by Aguettant (Lyon, France).

2.2. Nanoassembly formulation

All NAs were prepared by nanoprecipitation as follows. The purified product was dissolved in acetone (8 or 16 mg/mL). The acetonic solution was then added dropwise into magnetic stirring dextrose 5% solution for the physical and chemical stability study or deionized water for the *in vitro* investigation. The ratio between the aqueous media and acetone was optimized to 4 (v/v). After solvent evaporation *under vacuum* (Rotavapor[®] Buchi, France) the aqueous suspensions of NAs were obtained at a final concentration of 4 mg/mL for the colloidal and chemical stability study and 2 mg/mL for *in vitro* studies.

2.3. Free formulation

The preactivated compounds were also formulated as free formulation (FF) at the concentration of 4 mg/mL. Considering their poor solubility, these compounds were formulated in a solution of Tween[®]80/DMSO/dextrose 5% (5/5/90 v/v/v). The product was dissolved in Tween 80 and vigorously vortexed. The DMSO was then added and the solution was then vortex-mixed and finally the dextrose 5% was added to obtain the compound in its free formulation (FF).

2.4. Cell lines and cell culture

Many cancer cell lines have been used for the *in vitro* evaluation of G-IFO compound. These cell lines were chosen based on IFO's therapeutic indications. Sixteen cancer cell lines were selected for the cytotoxicity assay as follows: RMS-1 (Rhabdomyosarcoma), RD (Rhabdomyosarcoma), A673 (Ewing sarcoma), SK-N-MC (Ewing sarcoma), TC71 (Ewing sarcoma), UW-479 (Glioma), Lan-5 (Neuroblastoma), MiaPaCa-2 (Pancreatic Cancer), SAOS-2 (Osteosarcoma), IGROV-1 (Ovarian cancer), MCF-7 (Breast Cancer), MCF-7 MDR (Breast Cancer), A549 (Lung carcinoma), M109 (Lung Carcinoma), KB3.1 (Lung Cancer) and B16F10 (Skin Cancer). These cells were grown in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) or RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS) and 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin at 37 °C in presence 5% CO₂ and 95% hygrometry.

2.5. Cytotoxicity assay

Cytotoxicity of all compounds in their NAs form has been investigated using the MTS ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium))

method (Promega). The cells were seeded in 96-well plates at optimal cell density determined previously and incubated with 100 μ L of DMEM or RPMI containing 10% of FBS and 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin at 37 °C in presence 5% CO₂ and 95% hygrometry. After 24 h, the cells were treated with 100 μ L of NAs at different concentrations (i.e., 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 200 μ M) for all the cell lines. After 72 h, 20 μ L (1/10) of MTS reagent were added in each well. Depending on the cell line, 2 to 5 h incubations were needed to obtain the optimum optical density which was measured at 490 nm wavelength using a microplate reader (EL808, Biotek Instrument). Untreated cells were used as control. Each pre-activated drug concentration was tested in six replicates. The concentration inhibiting 50% of the cell proliferation (IC₅₀) of each compound regarding the tested cell line was determined using Prism 5 (Graph Pad Software Inc, San Diego, CA, USA).

2.6. Colloidal and chemical stability

The colloidal stability of each NA suspension at a concentration of 4 mg/mL in dextrose 5% was established at 5 °C (\pm 3 °C) and at 22 °C (\pm 3 °C) for a period of up to 21 days. Once formulated, the NAs size was measured during 4 consecutive days and then once a week. NAs were stored at 4 °C during all the study. 50 μ L of the suspension was diluted in 1950 μ L of Milli-Q water for the analysis of the NAs properties. The hydrodynamic diameter of these NAs was measured at 25 °C by dynamic light scattering using a NanoBrook 90Plus PALS particle analyzer (Brookhaven Instruments, NY, USA). The results give the median hydrodynamic diameter in number of the dispersed NAs after the accumulation of a 5 min measurement. Moreover, the standard deviation and the polydispersity index were also given.

The chemical stability of NAs was studied for further *in vivo* studies. The experiment was assessed at 22 °C (\pm 3 °C) to simulate the duration between the NAs formulation and the injection to mice. The stability was studied for 4 h period using time points of 0, 15, 30, 60, 120, 180 and 240 min. The quantification of preactivated IFO and HOIFO compounds was determined after dilution of the NAs in ACN using a previously published LC-MS/MS method (Deroussent et al., 2015).

2.7. Transmission electron microscopy processing

Three microliters of sample were deposited on a 300-mesh copper grid with a collodion membrane covered with a carbon film activated by conventional glow-discharge (adapted for negative staining). Grids were washed with aqueous uranyl acetate 2% (w/v), dried, and observed in zero loss bright field mode, using a Zeiss 902 transmission electron microscope. Images (\times 30,000) were captured with a MegaView III camera (1k \times 1k) and analyzed with iTEM software (Olympus Soft Imaging Solution).

2.8. Pharmacokinetic study of G-IFO versus IFO

The pharmacokinetic study was approved by the CEEA26 Ethic Committee Minister for National Education, Higher Education and Research, higher education and research and carried out under conditions established by the European Community. Male Swiss nude mice (7–8 weeks old) were used according to the European Union guidelines. The study involved six time points (5, 10, 15, 30, 60 and 120 min) with three mice per time-point and all compounds were administrated either by intraperitoneal (IP) or intravenous (IV) route. The tested compounds were: G-IFO as free formulation (FF), G-IFO as NAs form compared to IFO. Mice were divided into six groups (IFO IV, IFO IP, G-IFO NAs IV, G-IFO free formulation IP, G-IFO free formulation IV) of 18 mice before treatment. Mice received an equivalent IFO dose of 25 mg/kg by IP or IV route of 10 mL/kg from solutions at concentration of 4 mg/mL. These solutions were prepared either in dextrose 5% for IFO and G-IFO (NAs), or in a mixture of DMSO/Tween[®]80/NaCl (5/5/90, v/v/v) for G-IFO in free formulation. These solutions were then injected into mice according to their weight using either IV or IP route according to the group. At each time point, the whole blood was withdrawn using intracardiac puncture. 600 μ L of fresh blood was immediately added to 60 μ L of 2 M SCZ reagent and kept at 4 °C for at least 30 min for the derivatization of HO-IFO. Then, samples were centrifuged at 4 °C for 3 min at 10,000 rpm. The plasma was then drawn and stored at –80 °C for further drug analysis. Thus, after addition of internal standards DMO-IFO and HMPA at 100 ng/mL ($v = 50 \mu$ L), a 55 μ L aliquot of plasma was extracted using 1 mL of MTBE. The final residue was dissolved in the HPLC mobile phase. Based on the described LC-MS/MS method (Deroussent et al.,

Table 1
In vitro activities of HO-IFO as FF and G-IFO, F-IFO and SQ-IFO as FF and as nanoassemblies (NAs) on a panel of cancer cell lines.

Cell line	<i>In vitro</i> activity (IC ₅₀ μ M)						
	HO-IFO	G-IFO		F-IFO		SQ-IFO	
	FF	FF	NAs	FF	NAs	FF	NAs
RMS-1	19.0 \pm 2.2	9.3 \pm 4.2	0.6 \pm 0.2	6.3 \pm 1.5	12.3 \pm 2.0	16.6 \pm 5.0	11.4 \pm 5.0
RD	18.3 \pm 3.5	13.3 \pm 3.2	23.8 \pm 1.0	20.3 \pm 4.9	23.3 \pm 1.3	34.6 \pm 3.1	37.0 \pm 1.0
A673	22.7 \pm 5.9	25.3 \pm 1.5	14.7 \pm 5.0	29.3 \pm 4.9	18.7 \pm 3.6	24.3 \pm 3.5	22.0 \pm 5.0
SK-N-MC	2.8 \pm 0.5	19.0 \pm 2.5	21.3 \pm 0.9	22.3 \pm 2.3	21.8 \pm 2.1	45.3 \pm 5.7	31.5 \pm 1.1
TC71	20.6 \pm 1.2	22.6 \pm 2.2	24.0 \pm 4.4	23.2 \pm 1.8	24.7 \pm 1.6	12.3 \pm 2.3	5.0 \pm 1.0
UW-479	23.0 \pm 4.4	69.0 \pm 2.6	59.7 \pm 1.0	21.6 \pm 4.0	20.5 \pm 1.7	64.6 \pm 3.1	65.2 \pm 1.1
Lan-5	23.0 \pm 2.6	26.0 \pm 2.0	19.6 \pm 1.0	24.0 \pm 2.0	18.6 \pm 1.1	20.6 \pm 3.1	22.4 \pm 1.6
MiaPaCA-2	6.6 \pm 0.6	24.6 \pm 2.3	23.6 \pm 0.8	20.3 \pm 2.1	21.3 \pm 1.7	>200	165.3 \pm 7.0
SAOS-2	19.0 \pm 4.4	70.5 \pm 3.5	86.3 \pm 0.9	25.7 \pm 2.5	24.2 \pm 2.1	>200	139.1 \pm 0.9
IGR-OV1	20.6 \pm 2.2	>200	134.7 \pm 8.1	22.6 \pm 0.9	22.1 \pm 0.7	70.6 \pm 3.2	68.1 \pm 14.5
MCF-7	32.3 \pm 6.8	69.6 \pm 3.0	>200	24.3 \pm 2.5	33.7 \pm 3.3	>200	183.0 \pm 3.6
MCF-7 MDR	20.3 \pm 4.9	74.6 \pm 5.5	>200	23.6 \pm 2.5	26.5 \pm 0.9	>200	>200
A549	16.6 \pm 5.1	68.3 \pm 4.5	>200	24.0 \pm 3.0	20.7 \pm 3.7	>200	>200
M109	27.0 \pm 4.3	70.0 \pm 2.0	121.3 \pm 27.4	21.6 \pm 2.5	26.5 \pm 0.9	>200	>200
KB 3.1	61.3 \pm 1.6	60.3 \pm 6.0	76.5 \pm 28.2	21.0 \pm 1.0	11.6 \pm 1.2	>200	154.7 \pm 7.4
B16F10	33.0 \pm 8.6	53.6 \pm 8.1	114.5 \pm 1.1	23.6 \pm 5.5	20.8 \pm 1.3	>200	155.0 \pm 10.6

2015), the compounds were quantified using the following MRM transitions: m/z 261 \rightarrow 259 for IFO, m/z 413 \rightarrow 259 for G-IFO and m/z 334 \rightarrow 221 for 4-SCZ-O-IFO. Pharmacokinetic parameters were calculated using PK Function for Excel software (www.pharmpk.com/soft.html).

2.9. Maximal tolerated dose determination

The toxicity study was approved by the CEEA26 Ethic Committee of the Minister for National Education, Higher Education and Research and carried out under conditions established by the European Community. Preclinical toxicology

study was evaluated on healthy male Swiss athymic mice (6–8 weeks old) and randomized according to their weight. For this study, nine groups of five mice were studied. IFO and G-IFO as free formulation were evaluated at four doses ranging from 117 to 524 mg/kg (117, 195, 325 and 524 mg/kg) or 25 to 117 mg/kg (25, 42, 70 and 117 mg/kg), respectively. The selected doses were chosen according to the literature and to the pharmacokinetic results. The last group was the control corresponding to the injection of the vehicle. The administrations were achieved by a single IP bolus injection with a volume of 10 mL/kg. The mice were regularly monitored for difference of weight and survival over 21 days.

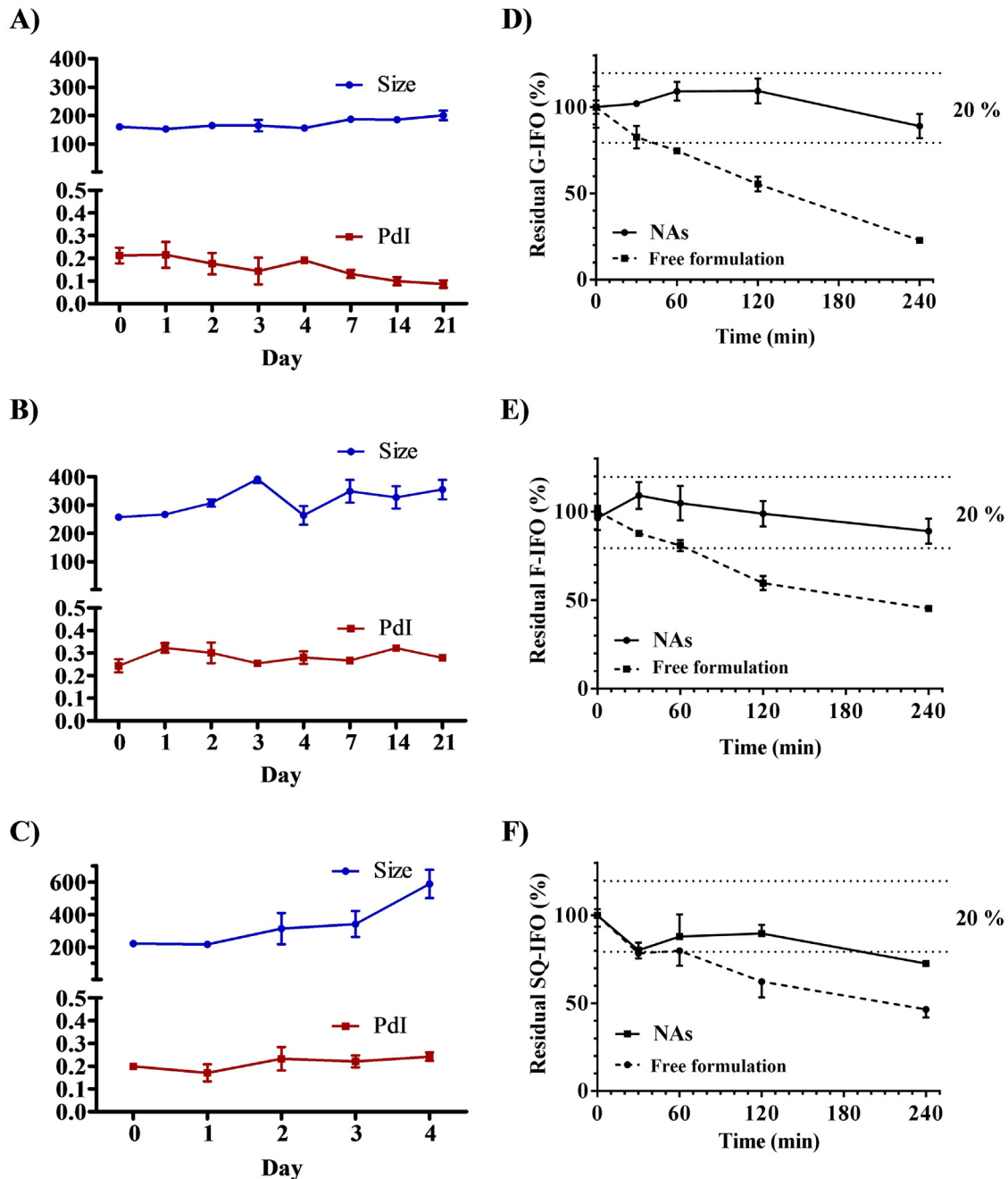


Fig. 1. Physical stability of G-IFO (A), F-IFO (B) and SQ-IFO (C) NAs at 5 °C (± 3 °C) and chemical stability of G-IFO (D), F-IFO (E) and SQ-IFO (F) NAs compared to their FF at 22 °C (± 3 °C).

3. Results

3.1. Cytotoxicity assay

In vitro cytotoxicity of HO-IFO as Free Form (FF) and G-IFO, F-IFO and SQ-IFO as FF and NAs has been tested on several human cancer cell lines by MTS assay, using IFO as a control. The results are presented in Table 1. In the absence of cytochrome, IFO showed no activity as it needs to be metabolized to be active. Regarding the active moiety, HO-IFO, its *in vitro* activity was evaluated and its activity was established around 20 μM for all major cell lines except for the KB 3.1 cell line for which HO-IFO was found inactive ($\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{M}$). All engrafted lipidic groups were evaluated and revealed no activity on all tested cell lines (not shown in the table).

The tested compounds were found active on various cancer cell lines. G-IFO NAs demonstrated cytotoxic activities with IC_{50} ranging from 0.6 to 134.7 μM . Considering that IC_{50} above 50 μM revealed poorly sensitive or resistant cells, G-IFO FF and NAs showed activity on the following cell lines: RMS-1, RD, A673, SK-N-MC, TC71, Lan-5 and MiaPaCa-2. The other cell lines were considered to be resistant to G-IFO.

F-IFO FF and NAs showed activities on all the tested cell lines with IC_{50} ranging from 6.3 to 33.7 μM . Finally, SQ-IFO NAs exhibited activities with IC_{50} values ranging from 5.0 to 183.0 μM . Among all the tested cell lines, six demonstrated sensitivity to SQ-IFO as FF and as NAs (RMS-1, RD, A673, SK-N-MC, TC71 and Lan-5). The other cell lines showed no sensitivity to SQ-IFO neither as FF nor as NAs. Taken together, these results validate the proof of concept of preactivation of these compounds as they are in general active in absence of metabolic enzyme.

3.2. Colloidal and chemical stabilities

The colloidal stability at 5 °C (± 3 °C) of G-IFO, F-IFO and SQ-IFO NAs, and their chemical stability compared to their FF at 22 °C (± 3 °C) are shown in Fig. 1. The colloidal stability of NAs at 22 °C (± 3 °C) was also studied. However, these NAs were stable less than 24 h as the suspension of NAs became limpid and had lost all its colloidal properties in less than 24 h. As depicted in Fig. 1A and B, G-IFO and F-IFO NAs formulations at 4 mg/mL kept at 5 °C (± 3 °C) were shown to be stable for over three weeks with mean particle size ranging from 185.7 to 319.1 nm and from 257.4 to 354.8 nm, respectively. Their polydispersity index (Pdl) ranged from 0.09 to 0.249 and 0.244 to 0.323, respectively. Regarding the chemical stability study, it was assessed by quantifying the preactivated compound. The decrease of the quantified concentration was attributed to the hydrolysis of the covalent bond between the IFO cycle and the linked moiety leading to the release of HO-IFO predominantly. As depicted in Fig. 1D–E, G-IFO and F-IFO NAs were found chemically stable up to 4 h, with the loss of less than 20% of

the initial quantity of drug, whereas their respective free formulation showed a poor stability with the loss of 80% and 60% of the initial drug after 4 h. Free formulations could only be stable for less than 1 h. SQ-IFO NAs formulations (Fig. 1C) showed lower colloidal stability since the size increased rapidly over a few days. However, the Pdl was found stable around 0.250 during this time. The chemical stability study of SQ-IFO (Fig. 1F) showed little difference between the stability of both formulations. Thus, the NA formulation of preactivated IFO derivatives was more useful with short poly-isoprenyl appendages such as geranyl chain.

3.3. Transmission electron microscopy characterization

The characterization of the G-IFO, F-IFO and SQ-IFO NAs formulated in dextrose 5% at the final concentration of 4 mg/mL was assessed by transmission electron microscopy (TEM). We applied a conventional negative staining method. This technique allowed to characterize individual particles, their shape and size. We observed spherical shape with sizes in agreement with those obtained by DLS just after nanoprecipitation as shown in Fig. 2.

3.4. Pharmacokinetic study of G-IFO versus IFO

The pharmacokinetic parameters of the tested compounds (IFO, G-IFO) according to their administration route (IV and IP) and formulation (free formulation (FF) and NAs) are presented in Table 2.

In addition, the pharmacokinetic profiles of each quantified compound according to their formulation type and administration route are depicted in Fig. 3. The areas under the curve (AUC) values of each quantified compound (IFO, G-IFO and HO-IFO as derivatized HO-IFO-SCZ) were established. For each compound, the AUC was estimated from AUC_{0-t} . The total AUC was calculated by adding the AUC of (X-)IFO and the respective HO-IFO AUC. Moreover, the ratio of HO-IFO was also calculated by dividing the value of HO-IFO AUC by the total AUC value.

These results underline the importance of the administration route as the AUCs of the parent compounds are all increased by IV administration of the drug, with overall AUC doubled for IFO (24.5

Table 2
Pharmacokinetic parameters of HO-IFO, IFO and G-IFO (NAs and FF) after IP and IV administration of an equivalent dose of 25 mg/kg.

	IP injection			IV injection		
	IFO	G-IFO FF	G-IFO NAs	IFO	G-IFO FF	G-IFO NAs
(X-)IFO AUC ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$)	20.6	0.8	0.7	45.0	6.4	3.2
HO-IFO AUC ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$)	3.9	2.8	2.8	5.6	10.2	6.7
Total AUC ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$)	24.5	3.6	3.5	50.6	16.6	9.9
% HO-IFO	15.9	77.8	80.0	11.1	61.4	67.7

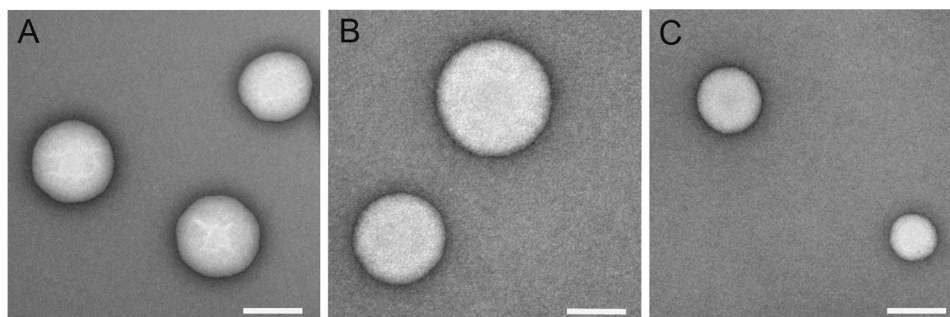


Fig. 2. G-IFO (A), F-IFO (B) and SQ-IFO (C) suspended in dextrose 5% observed by Transmission Electron Microscopy using negative staining method by uranyl acetate dye. Magnification: 30,000; scale bar: 200 nm.

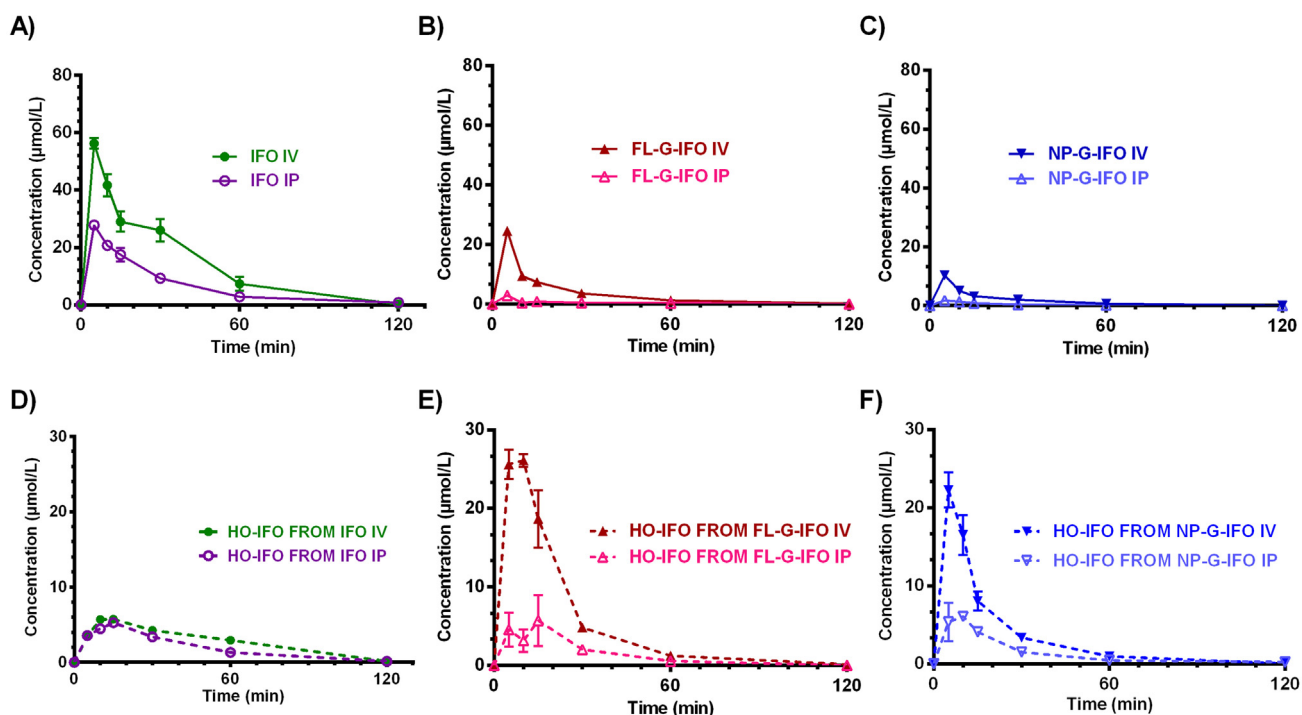


Fig. 3. Pharmacokinetic profile of the IFO (A), G-IFO (B and C) and HO-IFO (D–F) according to the formulation and administration type.

vs. 50.6) (Fig. 3A), quadrupled (3.6 vs. 16.6) and tripled (3.5 vs. 9.9) for G-IFO FF (Fig. 3B) and NAs (Fig. 3C), respectively. Moreover, the release of HO-IFO ranges around 10 to 15% for IFO (Table 2) whereas it is much higher for G-IFO ranging from 60 to 80% (Table 2), which is clearly observed on the compound profiles (Fig. 3D–F). This important increase of HO-IFO release from G-IFO validates the concept of preactivation. Additionally, it has been observed a very low exposition of G-IFO (FF and NAs) (Fig. 3B–C), as their total AUC are much lower than for IFO (Fig. 3A). Moreover, a semi-quantitation of the deschloroethylated compounds shows an important release of deschloroethylated-IFO metabolites for IFO. Regarding the G-IFO compound, no deschloroethylated compounds were observed which suggests that the preactivated compound was mainly metabolized into HO-IFO, thus by-passing the deschloroethylation pathway and thus preventing the release of toxic chloroacetaldehyde.

3.5. Maximal tolerated dose determination of G-IFO versus IFO

According to the pharmacokinetic results, and as no suitable formulation of G-IFO NAs at high concentrations was possible, the

Table 3

Determination of the maximal tolerated dose of IFO and G-IFO, as free formulation after a single intravenous injection. NS: not studied.

Dose (mg/kg)	Deaths/total	
	IFO	G-IFO as Free formulation
25	NS	0/5
42	NS	0/5
70	NS	0/5
117	0/5	4/5
195	0/5	NS
325	0/5	NS
524	5/5	NS

free form was chosen for the maximal tolerated dose determination as it showed the highest exposition and as it is suitable for high concentration formulations. This study was fulfilled on non-tumor-bearing athymic nude mice at dose levels up to 524 mg/kg for IFO and up to 117 mg/kg for G-IFO as FF. Mice received a single IV administration of IFO or G-IFO. Toxicity was assessed by weight loss (Fig. 4) and survival over 21-day period as depicted in Table 3.

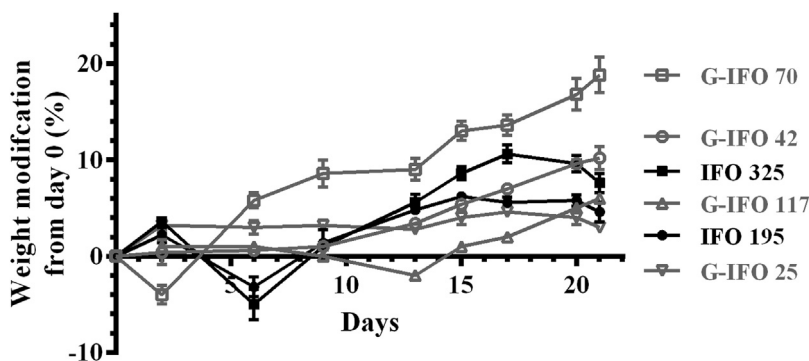


Fig. 4. Curves showing the weight modification in time post injection of the drug.

Regarding the results of IFO, the dose of 524 mg/kg showed important adverse effects, with increased heart rate and death at the end of the injection. The lower doses of 325, 195 and 117 mg/kg showed no adverse effect due to the injection or any weight loss during the 21-day period (Fig. 4). Regarding the determination of G-IFO FF MTD, the dose of 117 mg/kg led to the death of 80% (4/5) of mice after single injection of the dose. Regarding the lower doses (70, 42 and 25 mg/kg), no adverse effects or significant weight loss was observed (Fig. 4). In addition, an increased weight over time was observed for the dose of 70 mg/kg (Fig. 4). Taken together, these results led us to establish the MTD at 325 and at 70 mg/kg for IFO and G-IFO as FF, respectively. Moreover, the lethal dose 20 (LD₂₀), corresponding to the dose inducing 80% of death, was established at 117 mg/kg for G-IFO as FF.

4. Discussion

HO-IFO, the key metabolite leading to the release of the active nitrogen mustard, is known to be an unstable compound in human plasma or blood. The direct injection of this metabolite would generate the immediate release of the active entity at the injection site bringing local toxicity through immediate activity surrounding the injection point. Taking this into account, this compound has never been tested for its pharmacological activity. This issue led us to design new preactivated IFO analogs in order to bypass the two metabolic pathways that lead to the release of toxic by-products during IFO metabolism (Skarbek et al., 2015). These analogs demonstrate modified release of the HO-IFO according to the engrafted moieties. Some of these analogs, those bearing poly-isoprenyl moieties, were able to self-assemble into NAs. The objective of this work was to deepen our knowledge on the 4-poly-isoprenyloxy compounds (i.e. G-IFO, F-IFO and SQ-IFO), conducting preclinical *in vitro* and *in vivo* experiments prior to antitumor efficacy studies.

The evaluation of their cytotoxic activities on a large panel of cancer cell lines has strengthened the proof of concept of preactivation as they demonstrated cytotoxic activity without the need of CYP450-mediated bioactivation. This agreed with the previously reported results for G-IFO as free formulation (Skarbek et al., 2015). Generally speaking, the *in vitro* activities obtained for the self-assembly and free form were similar, except in the case of G-IFO compound. For this compound, the NAs demonstrated an increased activity especially for the RMS-1 cell line (Table 1, increased activity of 20-fold). This finding suggest that the cell line has an influence in the cytotoxicity results, as the self-repairing DNA system is different and unique for each cell lines and could explain these cytotoxic activities differences between the tested cell lines (Kondo et al., 2010). Another explanation for this increased activity of the NAs could be the internalization pathway of the NAs within the cell. As suggested by the work published by Bildstein et al. for similar terpenoid compounds (Bildstein et al., 2010, 2011), the NAs internalization could lead to the release of HO-IFO from the preactivated compound within the cell. In the case of the free form, the preactivated compound is diluted in the media with probably less preactivated IFO reaching the intracellular compartment compared to the NAs form. Studies are scheduled to investigate the internalization of these NAs.

To decipher the best candidate for *in vivo* experiments, biopharmaceutical and pharmacokinetics studies were conducted. The colloidal and chemical stability studies have shown that the linked moiety played an important role on the NAs stability. First, the NAs were shown to be stable only in the case of storage at 5 °C (± 3 °C). The stability study of these same NAs was also performed at 22 °C (± 3 °C), however, their stability was reduced, i.e. less than 24 h. This reduced stability can be accountable to the hydrolysis of the O-bound between the oxazaphosphorine and the moiety

leading to the destabilization of the physical property of these NAs, as the amphiphilic attribute is lost. Regarding the stability study performed at 5 °C (± 3 °C), the NAs prepared from SQ-IFO, which were first evaluated at 2 mg/mL (Skarbek et al., 2015) turned out to be unstable at higher concentration (4 mg/mL). This limitation, together with the high molecular weight of the squalene carrier, drastically reduced the interest of this formulation for oxazaphosphorines as the useful dose for antitumor activity is high *in vivo*. Surprisingly, SQ-IFO NAs did not show an improved chemical stability compared to its free form. This result could be explained by the steric hindrance induced by the bulky lipophilic squalene chain and its ability to cower both leading to the protection of the C—O bond from the hydrolysis. Therefore, the hydrolysis rate was not further reduced by the nanoformulation. In contrast, the G-IFO and F-IFO NAs had an increased chemical stability compared to their respective free formulation, highlighting the advantage of the NAs formulation in protecting preactivated oxazaphosphorines (X-IFO) from degradation. This was confirmed by the colloidal stability which was established up to 21 consecutive days with neither significant variation in mean diameter nor in PDI. These results indicate that a correlation can be observed between the linked moiety length and the stability of the free formulation: The longer is the poly-isoprenyl moiety, the more stable is the preactivated IFO analog. The chemical bounding of poly-isoprenyl moieties to anticancer drugs (Maksimenko et al., 2013; Wu et al., 2014; Fumagalli et al., 2016) has shown great increase of activity due to the generation of a self-assembling property showing an increased specificity of action. These findings lead us to believe that the engraftment of terpenoid chains could give promising candidate for anticancer drug development. Furthermore, more recently the interest of IFO vectorization has been demonstrated by its encapsulation within lipid-core nanocapsules (Wang et al., 2016). This new vectorized form of IFO underlines the interest in the development of old drug vectorization, as in the case of these IFO lipid-core nanocapsules interesting results in mean of cytotoxic activity and internalization properties were revealed. However, this strategy does not circumvent the metabolization issue of IFO. Other strategies using chemical modification of the isophosphoramidate mustard by engraftment of different moieties has also been fulfilled leading to two major compounds: the glufosfamide (Pohl et al., 1995) and the palifosfamide (Hingorani et al., 2009). Both reached phase III clinical trials recently (Ciuleanu et al., 2009; Shimizu et al., 2010; Ryan et al., 2016).

Considering the overall results, G-IFO seemed to be the best candidate for further *in vivo* investigations as it showed the highest *in vitro* activity (0.6 μ M) combined with the advantage to give stable high drug-loading NAs. In addition, the pharmacokinetics study stressed important results and findings. First, the IV administration seems to be the most appropriate route for both NAs and FF. Indeed, the IFO AUCs were doubled using the IV route compared to IP. For G-IFO, a 3 and 4-fold increase of the AUC was observed for the NAs and FF administered by IP route, respectively, compared to AUCs for G-IFO given intravenously. However, the total AUC of G-IFO (AUC_{HO-IFO} + AUC_{G-IFO}) was lower for both FF and NAs compared to IFO. Indeed, a 6-fold increase of the HO-IFO release was established at equal dose with 11% release estimated for IFO compared to 61% and 68% for G-IFO FF and G-IFO NAs, respectively. This important increase of HO-IFO release from G-IFO validates again, here *in vivo*, the concept of preactivation. Additionally, it has been observed a very low exposition of G-IFO (FF and NAs), as their total AUC were much lower than for those after IFO administration. To explain this low exposition to G-IFO, it can be thought that the IV route lead to an immediate release of HO-IFO after injection with direct consumption of HO-IFO by the proximal proteins. Regarding the IP route, the hypothesis could be that the drug diffuses poorly through the peritoneum, leading to

the progressive liberation of G-IFO into the systemic compartment. Prior to antitumor efficacy study on G-IFO, we decide to determine the maximal tolerated dose of G-IFO as free formulation. The free form was selected to fulfill this maximal tolerated dose determination study as the formulated NAs are naked and release rapidly the HO-IFO locally. To address this issue, further developments of these NAs are ongoing to obtain optimized G-IFO NAs. This could be reached through a pegylated formulation able to protect more efficiently these preactivated compounds from degradation and better address them to the tumor.

5. Conclusion

These results show that IFO limiting toxic effects can be countered using preactivated analogs which avoid side-chain metabolism and improve drastically the transformation rate into HO-IFO leading to a complete benefit/risk ratio inversion. Indeed, preactivated IFO analogs led mainly to HO-IFO without production of deschloroethylated compounds avoiding the deschloroethylation pathway and thus the release of chloroacetaldehyde responsible for the toxic side-effects. Moreover, the use of poly-isoprenyl chains embedding self-assembling properties as preactivating groups allowed obtaining stable X-IFO NAs. These latter were chemically stable up to 2 h at room temperature and up to 21 days at 5 °C (± 3 °C). They demonstrated to be active *in vitro*, without the need of bioactivation on many human tumor cell lines. G-IFO, especially as nano-assemblies seems to be the most potent compound. The pharmacokinetic results demonstrate that G-IFO, and probably more generally X-IFO, release the active entity in a large amount compared to IFO. This study also demonstrates that IV administration is the best route but nanoparticle formulation must be optimized for further antitumor efficacy studies. To address this issue, further developments of these NAs are ongoing to obtain optimized G-IFO NAs protecting more efficiently these preactivated compounds from degradation and better address them to the tumor.

Funding acknowledgments

The research leading to these results has received funding from the National Research Agency for NanoSqualOnc project: Program P2N, Grant N° NANO 00301.

A three-year PhD scholarship has been granted by the Ministry of Higher Education and Research through Doctoral school 425 (Therapeutic innovation: from the fundamental to the applied, University of Paris Sud). Part of this study was granted by Gustave Roussy Foundation thanks to Gustave Roussy Transfer. A four-year residence funding has been granted by APHP (Assistance Publique des Hopitaux de Paris).

Acknowledgments

We thank the animal facility of Gustave Roussy Institute (PFEP), and we are also grateful to Estelle Daudigeos-Dubus, Karine Ser-Leroux and Mélanie Polrot for their helpful assistance for animal experiment during the pharmacokinetic study.

References

- Alphandery, E., Grand-Dewyse, P., Lefevre, R., Mandawala, C., Durand-Dubief, M., 2015. Cancer therapy using nanoformulated substances: scientific, regulatory and financial aspects. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 15, 1233–1255.
- Barenholz, Y., 2012. Doxil(R)—the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J. Controlled Release* 160, 117–134.
- Bildstein, L., Dubernet, C., Marsaud, V., Chacun, H., Nicolas, V., Gueutin, C., Sarasin, A., Benech, H., Lepetre-Mouelhi, S., Desmaele, D., Couvreur, P., 2010. Transmembrane diffusion of gemcitabine by a nanoparticulate squalenoyl prodrug: an original drug delivery pathway. *J. Controlled Release* 147, 163–170.
- Bildstein, L., Dubernet, C., Couvreur, P., 2011. Prodrug-based intracellular delivery of anticancer agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 3–23.
- Boddy, A.V., Yule, S.M., Wyllie, R., Price, L., Pearson, A.D.J., Idle, J.R., 1993. Pharmacokinetics and metabolism of ifosfamide administered as a continuous infusion in children. *Cancer Res.* 53, 3758–3764.
- Brigger, I., Dubernet, C., Couvreur, P., 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 631–651.
- Bruggemann, S.K., Kiro, J., Wagner, T., 1997. Ifosfamide cytotoxicity on human tumor and renal cells: role of chloroacetaldehyde in comparison to 4-hydroxyifosfamide. *Cancer Res.* 57, 2676–2680.
- Chitkara, D., Mittal, A., Behrman, S.W., Kumar, N., Mahato, R.I., 2013. Self-assembling, amphiphilic polymer-gemcitabine conjugate shows enhanced antitumor efficacy against human pancreatic adenocarcinoma. *Bioconjug. Chem.* 24, 1161–1173.
- Ciuleanu, T.E., Pavlovsky, A.V., Bodoky, G., Garin, A.M., Langmuir, V.K., Kroll, S., Tidmarsh, G.T., 2009. A randomised Phase III trial of glufosfamide compared with best supportive care in metastatic pancreatic adenocarcinoma previously treated with gemcitabine. *Eur. J. Cancer* 45, 1589–1596.
- Deroussent, A., Skarbek, C., Maury, A., Chapuis, H., Daudigeos-Dubus, E., Le Dret, L., Durand, S., Couvreur, P., Desmaële, D., Paci, A., 2015. Simultaneous quantification of preactivated ifosfamide derivatives and of 4-hydroxyifosfamide by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in mouse plasma and its application to a pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 992, 30–35.
- Estanqueiro, M., Amaral, M.H., Conceicao, J., Sousa Lobo, J.M., 2015. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 126, 631–648.
- Fumagalli, G., Marucci, C., Christodoulou, M.S., Stella, B., Dosio, F., Passarella, D., 2016. Self-assembly drug conjugates for anticancer treatment. *Drug Discov. Today* 21, 1321–1329.
- Gerlowski, L.E., Jain, R.K., 1986. Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues. *Microvasc. Res.* 31, 288–305.
- Giraud, B., Hebert, G., Deroussent, A., Veal, G.J., Vassal, G., Paci, A., 2010. Oxazaphosphorines: new therapeutic strategies for an old class of drugs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 6, 919–938.
- Gref, R., Couvreur, P., Barratt, G., Mysiakine, E., 2003. Surface-engineered nanoparticles for multiple ligand coupling. *Biomaterials* 24, 4529–4537.
- Hanly, L., Chen, N., Rieder, M., Koren, G., 2009. Ifosfamide nephrotoxicity in children: a mechanistic base for pharmacological prevention. *Expert Opin. Drug Saf.* 8, 155–168.
- Hingorani, P., Zhang, W., Piperdi, S., Pressman, L., Lin, J., Gorlick, R., Kolb, E.A., 2009. Preclinical activity of palifosfamide lysine (Z10-201) in pediatric sarcomas including oxazaphosphorine-resistant osteosarcoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 64, 733–740.
- Kerbusch, T., Huitema, A.D., Kettenes-van den Bosch, J.J., Keizer, H.J., Ouwerkerk, J., de Kraker, J., Beijnen, J.H., 1998. High-performance liquid chromatographic determination of stabilized 4-hydroxyifosfamide in human plasma and erythrocytes. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 716, 275–284.
- Kondo, N., Takahashi, A., Ono, K., Ohnishi, T., 2010. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *J. Nucleic Acids* 2010, 543531.
- Krukemeyer, M.G., Krenn, V., Huebner, F., Wagner, W., Resch, R., 2015. History and possible uses of nanomedicine based on nanoparticles and nanotechnological progress. *J. Nanomed. Nanotechnol.* 6.
- Kurowski, V., Wagner, T., 1993. Comparative pharmacokinetics of ifosfamide, 4-hydroxyifosfamide, chloroacetaldehyde, and 2- and 3-dechloroethylifosfamide in patients on fractionated intravenous ifosfamide therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 33, 36–42.
- Landesman-Milo, D., Ramishetti, S., Peer, D., 2015. Nanomedicine as an emerging platform for metastatic lung cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 34, 291–301.
- Le Cesne, A., Antoine, E., Spielmann, M., Le Chevalier, T., Brain, E., Toussaint, C., Janin, N., Kayitalire, L., Fontaine, F., Genin, J., et al., 1995. High-dose ifosfamide: circumvention of resistance to standard-dose ifosfamide in advanced soft tissue sarcomas. *J. Clin. Oncol.* 13, 1600–1608.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K., 2000. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Controlled Release* 65, 271–284.
- Maksimenko, A., Mougín, J., Mura, S., Sliwinski, E., Lepeltier, E., Bourgaux, C., Lepeltier, S., Zouhri, F., Desmaële, D., Couvreur, P., 2013. Polyisoprenoyl gemcitabine conjugates self assemble as nanoparticles, useful for cancer therapy. *Cancer Lett.* 334, 346–353.
- Maksimenko, A., Dosio, F., Mougín, J., Ferrero, A., Wack, S., Reddy, L.H., Weyn, A.A., Lepeltier, E., Bourgaux, C., Stella, B., Cattel, L., Couvreur, P., 2014. A unique squalenoylated and nonpegylated doxorubicin nanomedicine with systemic long-circulating properties and anticancer activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E217–226.
- McCune, J.S., Rislér, L.J., Phillips, B.R., Thummel, K.E., Blough, D., Shen, D.D., 2005. Contribution of CYP3A5 to hepatic and renal ifosfamide N-dechloroethylation. *Drug Metab. Dispos.* 33, 1074–1081.
- Miele, E., Spinelli, G.P., Miele, E., Tomao, F., Tomao, S., 2009. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer. *Int. J. Nanomed.* 4, 99–105.
- Muro, S., 2012. Challenges in design and characterization of ligand-targeted drug delivery systems. *J. Controlled Release* 164, 125–137.
- Owen, Andrew, Davide Moscatelli, C.D.s., Mayes, Eric, Lovell, Jonathan F, Katti, Kattesh V, Sokolov, Konstantin, Mazza, Mariarosa, Fontaine, Olivier, Rannard,

- Steve, Stone, Vicki, 2014. The application of nanotechnology in medicine-treatment and diagnostics. *Nanomedicine* 9, 1291–1294.
- Paci, A., Martens, T., Royer, J., 2001. Anodic oxidation of ifosfamide and cyclophosphamide: a biomimetic metabolism model of the oxazaphosphorinane anticancer drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 1347–1349.
- Pohl, J., Bertram, B., Hilgard, P., Nowrousian, M.R., Stüben, J., Wießler, M., 1995. D-19575—a sugar-linked isophosphoramidate mustard derivative exploiting transmembrane glucose transport. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 35, 364–370.
- Ryan, C.W., Merimsky, O., Agulnik, M., Blay, J.-Y., Schuetze, S.M., Van Tine, B.A., Jones, R.L., Elias, A.D., Choy, E., Alcindor, T., Keedy, V.L., Reed, D.R., Taub, R.N., Italiano, A., Garcia del Muro, X., Judson, I.R., Buck, J.Y., Lebel, F., Lewis, J.J., Maki, R.G., Schöffski, P., 2016. PICASSO III: a phase III, placebo-controlled study of doxorubicin with or without palifosfamide in patients with metastatic soft tissue sarcoma. *J. Clin. Oncol.* 34, 3898–3905.
- Shi, Y., Lammers, T., van Nostrum, C., Hennink, W.E., 2015. Long circulating and stable polymeric micelles for targeted delivery of paclitaxel. *J. Controlled Release* 213, e127–128.
- Shimizu, T., Okamoto, I., Tamura, K., Satoh, T., Miyazaki, M., Akashi, Y., Ozaki, T., Fukuoka, M., Nakagawa, K., 2010. Phase I clinical and pharmacokinetic study of the glucose-conjugated cytotoxic agent D-19575 (glufosfamide) in patients with solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65, 243–250.
- Skarbak, C., Lesueur, L.L., Chapuis, H., Deroussent, A., Pioche Durieu, C., Daville, A., Caron, J., Rivard, M., Martens, T., Bertrand, J.R., Le Cam, E., Vassal, G., Couvreur, P., Desmaële, D., Paci, A., 2015. Preactivated oxazaphosphorines designed for isophosphoramidate mustard delivery as bulk form or nanoassemblies: synthesis and proof of concept. *J. Med. Chem.* 58, 705–717.
- Tong, R., Tang, L., Cheng, J., 2012. Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery 31 Applications: Imaging, Targeting, and Delivery. *Nanostructure Science and Technology*. Svenson, S., Prud'homme, R.K. (Eds.), Dev. App. Anticancer Nanomed. 31–46.
- Van Winkle, P., Angiolillo, A., Krailo, M., Cheung, Y.K., Anderson, B., Davenport, V., Reaman, G., Cairo, M.S., 2005. Ifosfamide, carboplatin, and etoposide (ICE) reinduction chemotherapy in a large cohort of children and adolescents with recurrent/refractory sarcoma: the Children's Cancer Group (CCG) experience. *Pediatr. Blood Cancer* 44, 338–347.
- Wang, D., Wang, H., 2012. Oxazaphosphorine bioactivation and detoxification The role of xenobiotic receptors. *Acta Pharm. Sin. B* 2, 107–117.
- Wang, S.-Q., Zhang, Q., Sun, C., Liu, G.-Y., 2016. Ifosfamide-loaded lipid-core-nanocapsules to increase the anticancer efficacy in MG63 osteosarcoma cells. *Saudi J. Biol. Sci.*
- Wu, J.Y., Kuo, C.D., Chu, C.Y., Chen, M.S., Lin, J.H., Chen, Y.J., Liao, H.F., 2014. Synthesis of novel lipophilic N-substituted norcantharimide derivatives and evaluation of their anticancer activities. *Molecules* 19, 6911–6928.
- Yin, H., Liao, L., Fang, J., 2014. Enhanced permeability and retention (EPR) effect based tumor targeting the concept, application and prospects. *JSM Clin. Oncol. Res.* 2, 1010.

2. Mise en perspective

Après un premier article décrivant la synthèse organique des différents composés pré-activés de l'IFO ainsi que la propriété de s'auto-assembler (54), l'article publié dans IJP a poursuivi la preuve de concept de pré-activation. La sélection du G-IFO est argumentée dans le paragraphe suivant. Les travaux *in vivo* présentés dans cet article sont confirmés et complétés par des études pharmacocinétiques et d'efficacité antitumorale. L'optimisation de la formulation galénique est également développée et discutée dans les parties suivantes.

2.1. Choix du géraniol

Le G-IFO est le X-Oxaza sélectionné pour les études pré-cliniques car il présente de nombreux avantages par rapport aux autres dérivés. En effet, c'est la plus petite chaîne à partir de laquelle les X-Oxaza possèdent la capacité de s'auto-assembler. L'injection d'une dose équivalente en masse d'IFO permet d'injecter une plus petite quantité avec G-IFO qu'avec le F-IFO ou SQ-IFO : par exemple, la dose équivalente de l'IFO à 100 mg/kg (eq. 100 mg/kg) est d'environ 160 mg/kg pour le G-IFO (ratio masse molaire de G-IFO/IFO \approx 1,6), de 180 mg/kg pour le F-IFO (ratio masse molaire de F-IFO/IFO \approx 1,8) et de 260 mg/kg pour le SQ-IFO (ratio masse molaire de SQ-IFO/IFO \approx 2,6). Lors des études *in vitro*, le G-IFO est le composé ayant montré des activités cytotoxiques notables sur un large panel de lignées cellulaires tumorales ainsi qu'un gain d'efficacité lorsque celui-ci est formulé sous forme de NA (IC₅₀ de 0,6 μ M sur la lignée de rhabdomyosarcome humaine RMS-1).

De plus, la revue de la littérature montre que le géraniol présente des propriétés biologiques intéressantes pour le développement de molécules anticancéreuses.

Le géraniol est décrit comme une molécule dont l'utilisation *in vivo*, et donc chez l'homme, est sans danger même à de fortes doses et sur une longue période (105). Il présenterait des propriétés antitumorales ; il agit sur les différents *hallmarks* du cancer en inhibant l'angiogénèse ainsi que la prolifération cellulaire, en favorisant l'apoptose et en dérégulant la voie métabolique du mévalonate (106). Il a été observé dans un modèle cellulaire de cancer humain du colon une augmentation de la sensibilisation des cellules tumorales aux agents cytotoxiques par dépolarisation de la membrane cellulaire entraînant une diminution de la résistance membranaire (107) et améliorant également la pénétration intracellulaire d'agent cytotoxique comme le 5-FU (107). En plus de son activité antitumorale, le géraniol (100 et 200 mg/kg per os) agirait également sur le SI. En effet, il a été

montré qu'il augmente la réponse Th1 *via* une augmentation de la cytokine pro-inflammatoire IFN γ et diminue la réponse Th2 (108). Il est à noter que le géraniol est décrit comme agent anti-oxydant en augmentant le facteur de transcription *nuclear factor erythroid-2-related factor 2* (Nrf2) et en régulant positivement la GSH (109).

2.2. Profil pharmacocinétique et biodistribution tissulaire

L'article intitulé « Poly-isoprenylated ifosfamide analogs : Preactivated antitumor agents as free formulation or nanoassemblies » décrit des résultats pharmacocinétiques (PK). La pharmacocinétique est une science qui a toute son importance dans le développement de nouveaux médicaments. La différence de comportement pharmacocinétique est très liée aux propriétés physicochimiques de l'agent thérapeutique. Comme attendu, le G-IFO, molécule amphiphile, n'a pas le même comportement PK que l'IFO, molécule plus hydrophile, et le mode d'administration (IV ou IP) ajoute de la variabilité PK. Lors d'une injection en IP, une phase d'absorption a lieu afin que le produit atteigne la circulation sanguine. Ici l'aire sous la courbe (*Area Under the Curve* – AUC) du G-IFO est nettement diminuée après une injection IP par rapport à une injection en IV, respectivement 0,8 $\mu\text{mol/L.h}$ et 6,4 $\mu\text{mol/L.h}$, ce qui signifie que l'absorption par voie IP n'est pas satisfaisante ; il faudrait envisager i) augmentation de la dose injectée en IP, ii) éliminer cette voie d'administration et en tester d'autres telles que IM, sous-cutanée ou la voie orale, iii) optimiser la forme pharmaceutique afin d'améliorer le passage péritonéal. Cependant il est à noter que la voie orale n'est pas privilégiée car il est décrit que l'administration d'IFO par voie orale entraîne des neurotoxicités très importantes (110).

Dans cet article, seul l'analogue pré-activé G-IFO a été évalué ; nous avons dans un second temps également étudié le comportement PK du F-IFO par voie IV. De plus, nous avons étudié la biodistribution de l'IFO, G-IFO, F-IFO et de leurs métabolites dans les principaux organes : rein, foie, rate, cerveau. Le choix de ces organes est argumenté de la façon suivante : le rein est l'organe de la voie d'élimination de l'IFO et c'est également un organe subissant les toxicités induites par l'IFO, le foie est le principal organe responsable de la métabolisation de l'IFO, la rate est l'organe de fin de vie des globules rouges, transporteurs principaux de l'IFO et de ses métabolites, et le cerveau car l'IFO et ses métabolites passent la barrière hémato-encéphalique (Ratio IFO LCR/plasma = 1.1 et Ratio moutarde isophosphoramide LCR/plasma = 4,5 (111)).

Le protocole de cette nouvelle étude PK est présenté en Figure 20. Dans cette expérience nous avons utilisé la même posologie que dans l'article publié dans IJP, à savoir 25 mg/kg en équivalent IFO. Nous avons choisi de ne faire que la voie IV aux vues des résultats de la voie IP de la précédente expérience. Les conditions pré-analytiques et analytiques sont les mêmes que décrites dans les articles JChromB (54) et IJP (112).

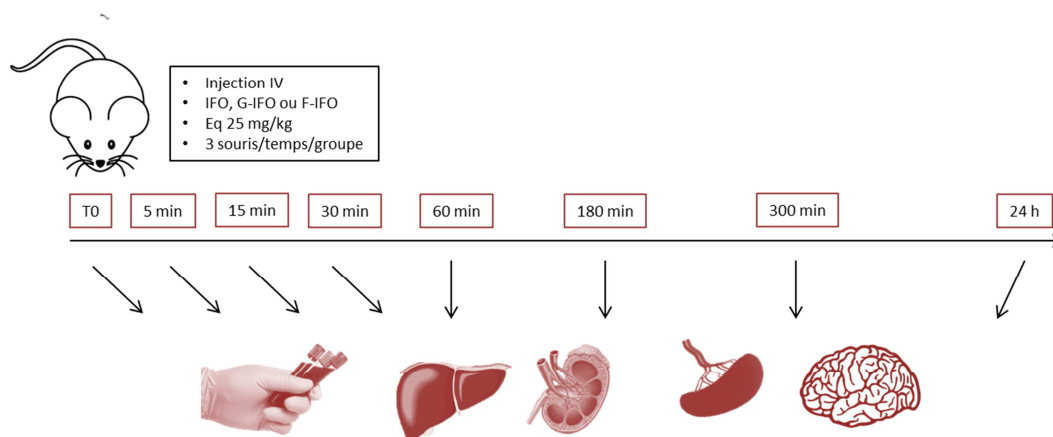


Figure 20. Protocole de l'étude PK et biodistribution

Une injection unique d'IFO 25 mg/kg, de G-IFO ou F-IFO eq. 25 mg/kg est administrée en IV. Trois souris de chaque groupe sont sacrifiées aux différents temps d'analyse (0, 5, 15, 30, 60, 180, 300 min et 24h post injection), et le sang intracardiaque ainsi que le foie, les reins, la rate et le cerveau sont prélevés.

Les résultats de la PK au niveau de l'exposition plasmatique de l'IFO et G-IFO confirment les résultats de l'article IJP : respectivement, les AUC de l'IFO sont de 47,2 et 45,0 $\mu\text{mol/L.h}$, et ceux du G-IFO sont 5,5 et 6,4 $\mu\text{mol/L.h}$ (Tableau 7).

	IFO		HO-IFO dérivé de l'IFO		G-IFO		HO-IFO dérivé du G-IFO	
	Article IJP	PK 2	Article IJP	PK 2	Article IJP	PK 2	Article IJP	PK 2
AUC _{0->∞} ($\mu\text{mol/L.h}$)	45	47,2	5,6	5,9	6,4	5,5	10,2	10,9
% HO-IFO libéré			11,1	9,2			61,4	66

Tableau 7. Confirmation du profil pharmacocinétique du G-IFO et de ses métabolites suite une administration unique en IV à la dose eq. 25 mg/kg

Comparaison entre (112) et la seconde étude pharmacocinétique concernant les AUC de l'IFO, du G-IFO ainsi que de celle de leur métabolite hydroxylé.

Concernant le F-IFO, cet analogue présente une AUC de 11 $\mu\text{mol/L.h}$ et une AUC du HO-IFO libéré de 12,7 $\mu\text{mol/L.h}$. De plus, le F-IFO semble avoir une demi-vie d'élimination plus longue que celle du G-IFO (45,5 min versus 26 min), ce qui est cohérent avec sa plus forte lipophilie qui augmente son volume de distribution et donc par conséquent sa demi-vie ($T_{1/2} = (Vd \cdot \ln 2) / \text{Clairance}$). Concernant le pourcentage de libération du métabolite hydroxylé, le F-IFO libère environ 54% de HO-IFO, ce qui est un peu plus bas que le taux d'HO-IFO libéré par le G-IFO (66%). Le G-IFO et F-IFO ne libère pas de composés déchloroéthylés. Les différentes expositions plasmatiques entre IFO, G-IFO et F-IFO ainsi que leur métabolite, et leurs caractéristiques de PK sont présentées dans la Figure 22.

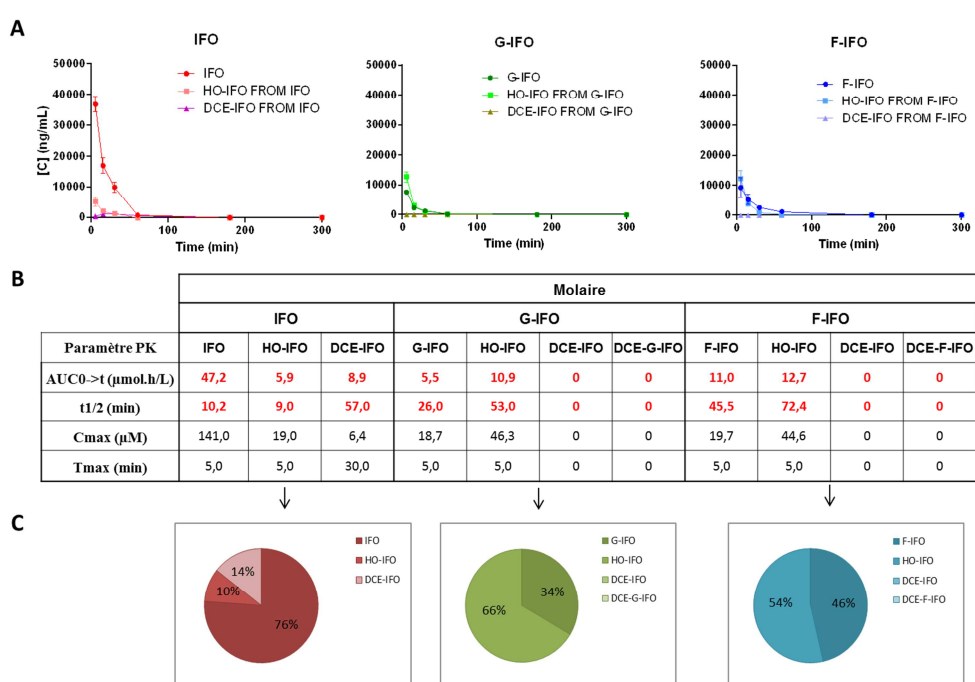


Figure 21. Exposition plasmatique de l'IFO, G-IFO et F-IFO et de leurs métabolites

Une injection unique d'IFO 25 mg/kg, de G-IFO ou F-IFO eq. 25 mg/kg est administrée en IV. N = 3 souris sacrifiées par point de prélèvement. (A) Profil de l'exposition plasmatique de (gauche) l'IFO, (milieu) du G-IFO et (droite) du F-IFO. (B) Paramètres pharmacocinétiques. (C) Distribution des métabolites libérés par (gauche) l'IFO, (milieu) du G-IFO et (droite) du F-IFO.

L'étude de la biodistribution de l'IFO, G-IFO et F-IFO dans les organes montre que la distribution tissulaire de l'IFO est plus importante au niveau du foie et du rein par rapport à la rate et au cerveau. Les analogues semblent plus être distribués au niveau du rein et du cerveau (Figure 22). La quantité de HO-IFO libéré par les analogues pré-activés est beaucoup plus importante dans les différents tissus par rapport à celui libéré à partir de l'IFO. La prédilection de l'IFO pour le foie et la rate sont

cohérents avec le fait que sa transformation métabolique soit effectuée par les CYP450 hépatiques et que son transport est principalement médié par les globules rouges. L'augmentation de la quantité de X-IFO et HO-IFO issus des X-IFO dans le cerveau peut être expliquée par une augmentation du passage de la barrière hémato-encéphalique due à une augmentation de la lipophilie des X-IFO. Il a été démontré dans la littérature que les monoterpènes avaient des effets neurologiques de sédation (113) et que le géraniol en particulier est décrit comme agent déprimeur du système nerveux central (114). Les résultats de la distribution des X-IFO au niveau cérébral sont donc cohérents avec la littérature. L'augmentation de la quantité des X-IFO au niveau rénal par rapport à l'IFO pourrait également être expliquée par une augmentation du passage du sang vers le tissu rénal en raison de cette lipophilie.

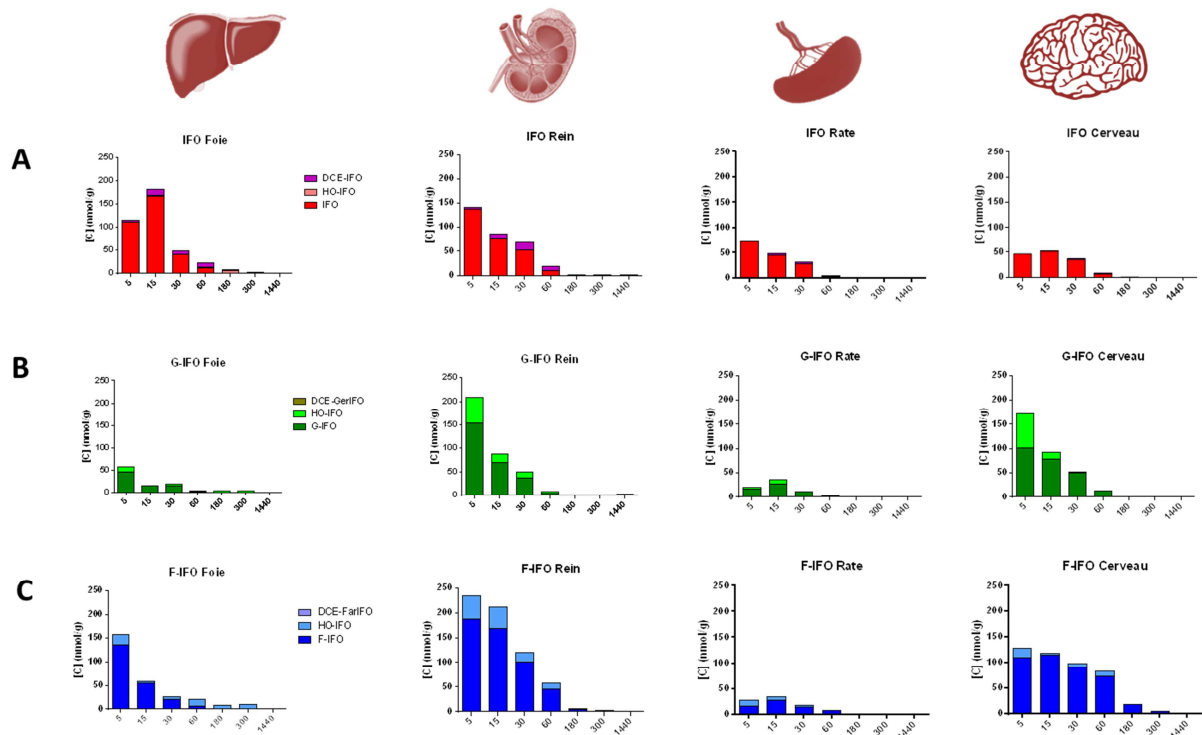


Figure 22. Biodistribution tissulaire de l'IFO, G-IFO et F-IFO et de leurs métabolites

Une injection unique d'IFO 25 mg/kg, de G-IFO ou F-IFO eq. 25 mg/kg est administrée en IV. N = 3 souris sacrifiées par point de prélèvement avec récupération du foie, du rein, de la rate et du cerveau. Biodistribution tissulaire de (A) IFO. (B) G-IFO. (C) F-IFO.

Perspectives et critiques

Il serait également intéressant d'explorer au niveau pulmonaire car les poumons sont très vascularisés et constituent une localisation où l'on retrouve des métastases dans le cas de nombreux cancers. De plus, mener une étude pharmacocinétique à partir de souris porteuses de tumeur permettrait de voir la différence du comportement des composés pré-activés et également d'estimer *in fine* la concentration qui atteint la tumeur. Pour des raisons à la fois de disponibilités du G-IFO et de temps, nous n'avons pas pu compléter cette étude de biodistribution à ce jour.

2.3. Efficacité *in vivo* du G-IFO

Nous avons étudié l'efficacité antitumorale sur un modèle de fibrosarcome murin (MCA205) chez la souris C57Bl/6 (modèle murin immunocompétent). Les cellules MCA205 ont été fournies par l'équipe du Pr Chaput. Après culture dans du RPMI supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 800 000 cellules sont injectées en sous-cutanée sur le flanc droit de chaque souris. Une semaine après, quand la taille de la tumeur atteint entre 80 et 200 mm³, les différents traitements sont administrés soit par IV, soit par IP. Le protocole de cette expérimentation est décrit en Figure 23. Nous avons choisi de tester la dose d'eq. 100 mg/kg (dose supérieure à la dose maximale tolérée de 70 mg/kg sélectionnée dans l'article (112)).

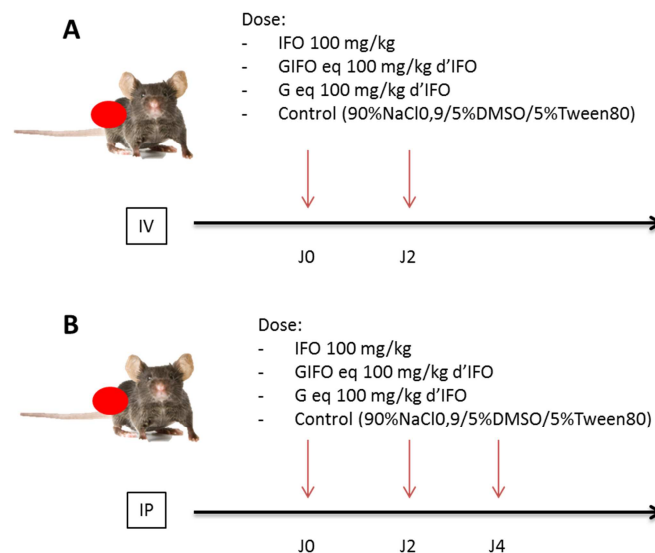


Figure 23. Protocole de l'étude d'efficacité après injections répétées de G-IFO

Administration de l'IFO 100 mg/kg ou G-IFO eq. 100 mg/kg en (A) IV et en (B) IP lorsque le volume tumoral atteint entre 80 et 200 mm³ (soit 7 à 10 jours post implantation sous cutanée de la tumeur - 800 000 cellules MCA205).

Après la première injection IV, les queues des souris présentaient des traces d'irritation. Après la seconde injection IV, l'état des queues n'était pas satisfaisant, une troisième injection n'était pas envisageable. Au cours de l'étude de croissance tumorale, l'état des queues a empiré avec un début de nécrose chez 100% des souris du groupe traité par IV. Plusieurs explications sont possibles : i) le métabolite hydroxylé était en quantité importante dans la solution d'injection, ii) Le G-IFO s'est transformé en HO-IFO très rapidement après son passage dans la circulation sanguine, iii) Il y a eu une extravasation du G-IFO au moment de l'injection, iv) La solution d'injection du G-IFO était légèrement trouble et non limpide ayant peut-être entraîné une embolie. Les résultats de l'expérimentation montrent une inefficacité du G-IFO sur le ralentissement de la croissance tumorale (Figure 24), ce qui est cohérent avec les problèmes de tolérance retrouvés au niveau du point d'injection : la molécule n'a probablement pas eu le temps d'être distribuée et par conséquent n'a pas atteint sa cible à savoir la tumeur.

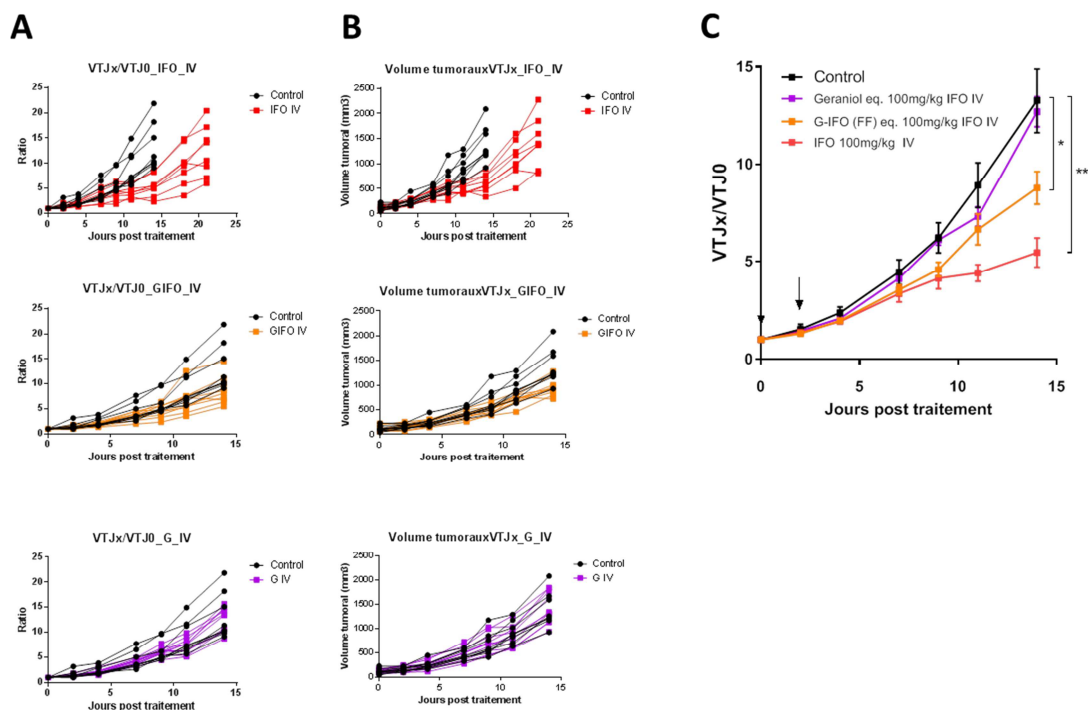


Figure 24. Efficacité antitumorale du G-IFO après administration IV

Suivi de la progression tumorale après deux injections IV de l'IFO 100 mg/kg ou G-IFO eq. 100 mg/kg. La tumeur est mesurée tous les deux-trois jours. VTJx est le volume tumoral mesuré au jour X, VTJ0 est le volume tumoral initial (jour de la première injection). Les données individuelles des six souris sont représentées sur le graphe (A) par le ratio VTJx/VTJ0 et sur le graphe (B) par le VTJx. (C) Ratio VTJx/VTJ0. La moyenne et l'erreur standard de la moyenne (Standard error of the mean (SEM)) sont indiquées. Les flèches noires représentent une injection. Le test statistique utilisé est le test 2-way ANOVA sans correction de la comparaison multiple du fait du caractère exploratoire de l'expérimentation. Intervalle de confiance de 95%. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

Concernant les injections IP, aucun signe clinique n'a été constaté lors des trois injections. A la différence de la voie IV, une efficacité similaire à l'ifosfamide 100 mg/kg avec trois injections a été retrouvée après trois injections de G-IFO eq. 100 mg/kg administrées en IP (Figure 25).

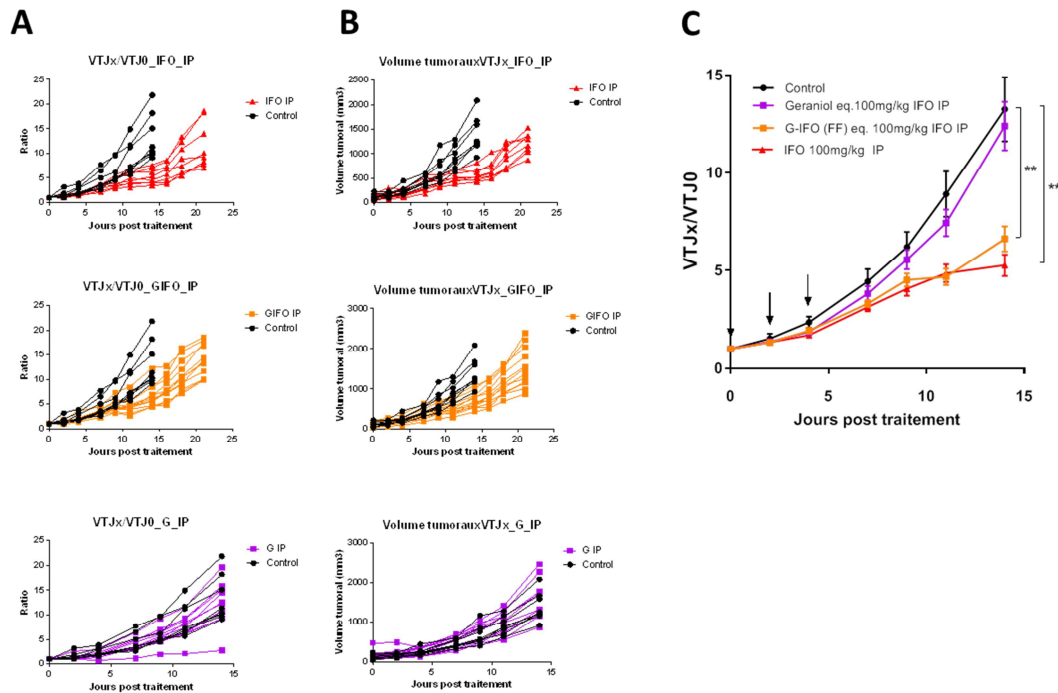


Figure 25. Efficacité antitumorale du G-IFO après administration IP

Suivi de la progression tumorale après trois injections IP de l'IFO 100 mg/kg ou G-IFO eq. 100 mg/kg. La tumeur est mesurée tous les deux-trois jours. VTJx est le volume tumoral mesuré au jour X, VTJ0 est le volume tumoral initial (jour de la première injection). Les données individuelles des six souris sont représentées sur le graphe (A) par le ratio VTJx/VTJ0 et sur le graphe (B) par le VTJx. C) Ratio VTJx/VTJ0. La moyenne et la SEM sont indiquées. Les flèches noires représentent une injection. Le test statistique utilisé est le test 2-way ANOVA sans correction de la comparaison multiple du fait du caractère exploratoire de l'expérimentation. Intervalle de confiance de 95%. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

Si on prend en compte la PK du G-IFO après une administration IP, 25% de la quantité se retrouvent dans la circulation sanguine par rapport à une injection IV, nous pouvons faire l'hypothèse qu'un passage de 100% permettrait de diminuer théoriquement d'un facteur quatre la posologie avec la même efficacité. C'est pourquoi nous avons décidé de nous intéresser à l'amélioration de la tolérance veineuse afin d'envisager des administrations en IV. Pour cela, nous avons décidé d'approfondir l'élaboration d'une formulation galénique.

3. Optimisation galénique

L'administration du G-IFO *in vivo* a souligné plusieurs problèmes d'ordre galénique : i) un problème de stabilité dans la solution d'injection (Diméthylsulfoxyde (DMSO)/Tween80/NaCl0,9% :v/v/v), ii) un problème de tolérance veineuse avec observation de nécrose au niveau du point d'injection.

3.1. Optimisation de la formulation des nano-assemblages

3.1.1. Matériels et Méthodes

La synthèse de NA de première génération par nanopréciipitation est décrite dans l'article (54). Brièvement, une solution de X-IFO dans de l'acétone est ajoutée goutte à goutte dans une phase aqueuse qui est sous agitation (Figure 26). Le solvant organique est éliminé dans un second temps par évaporation. Le contrôle de l'évaporation est réalisé par la pesée du ballon : l'évaporation est stoppée lorsque la masse du ballon (pesée à vide) contenant la suspension est égale à la masse du ballon plus la masse de la phase aqueuse.

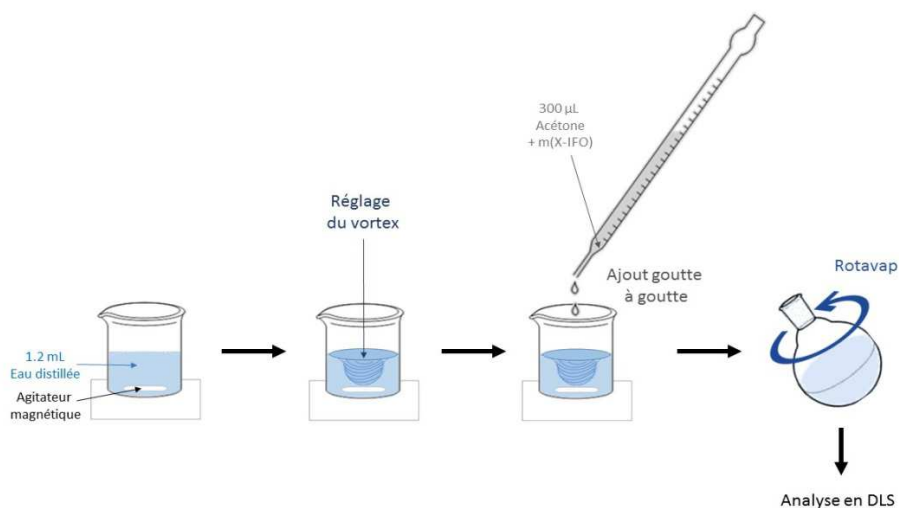


Figure 26. Protocole de nanopréciipitation

La solution organique de G-IFO (acétone) est ajoutée goutte à goutte dans la phase aqueuse sous agitation mécanique (agitation magnétique) à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé par évaporation à l'évaporation rotative.

Source : V. Gauthier

Les formulations sont ensuite analysées par diffraction dynamique de la lumière (DDL) afin de déterminer le diamètre des NA ainsi que l'indice de polydispersité (*Polydispersity index* (PDI)) qui nous informera sur la distribution de la taille des NA dans l'échantillon. Brièvement, la DDL, également appelée diffusion quasi élastique de la lumière ou encore spectroscopie par corrélation de photons, est une technique non destructive qui détermine la taille des NA par mesure des variations aléatoires d'intensité de la lumière diffusée dans l'échantillon (Figure 27). Les particules en suspension sont soumises à un mouvement thermique aléatoire appelé mouvement brownien ; plus la particule est grosse, plus son mouvement brownien est lent et, par conséquent, plus les fluctuations de l'intensité sont lentes (Figure 28).

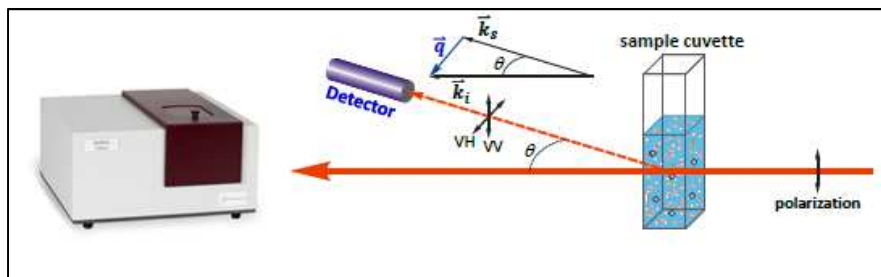


Figure 27. Appareil de mesure Brookhaven® et principe de la DDL

Le principe de la diffraction dynamique de la lumière repose sur la diffraction d'un laser par des NA en suspension et en mouvement continu dans un milieu donné.

Source : (115)

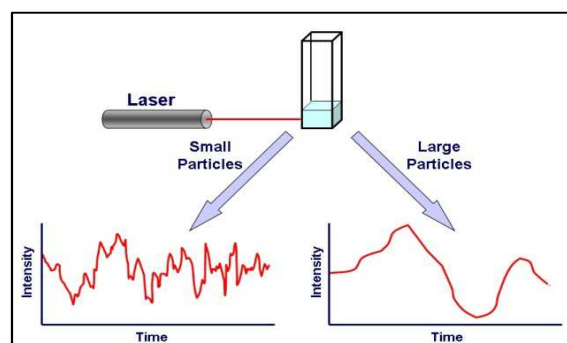


Figure 28. Corrélation entre le mouvement brownien et la fluctuation d'intensité

Les NA sont soumises à un mouvement thermique aléatoire appelé mouvement brownien ; les petites NA ont des mouvements plus rapides que les grosses NA et par conséquent les fluctuations d'intensité du laser diffracté sont plus rapprochées.

Source : (116)

Ce mouvement est modélisé par l'équation de Stokes-Einstein :

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t}$$

Équation 1. Equation de Stokes-Einstein

D_h représente le diamètre hydrodynamique

D_t est le coefficient de diffusion

K_b est la constante de Boltzmann

T est la température

η est la viscosité du milieu de mesure

Avec K_b , T et η connus, il est donc possible de déterminer le diamètre hydrodynamique à partir de la détermination du coefficient de diffusion. Le diamètre hydrodynamique est le diamètre d'une sphère qui aurait le même coefficient de diffusion que la particule analysée qui, elle, n'est pas forcément sphérique.

L'analyse par DDL est faite sur des échantillons dilués de telle sorte que le *count rate* – c'est-à-dire le nombre de photons détectés, nombre qui renseigne sur la concentration en NA – soit compris entre 50 et 400 *kilocounts per second* (kcps). En effet, si la suspension est trop concentrée alors la diffusion des multiples NA présents peuvent biaiser la mesure de la diffraction de la lumière.

Une analyse d'imagerie a complété les mesures par DDL, de taille et de forme : la microscopie électronique à transmission (MET). Brièvement, un faisceau d'électrons est transmis à travers l'échantillon d'intérêt déposé en couche très fine sur une grille métallique recouverte de carbone. Les électrons vont interagir avec les atomes constituant ce dernier et produire différents types de rayonnement dont la diffraction.

Le pré-analytique utilisé pour nos échantillons est le suivant : une goutte de l'échantillon (dilué ou non dilué) est déposée sur une grille métallique recouverte d'un film de carbone hydrophile, ensuite une goutte d'un agent contrastant (coloration négative avec l'acétate d'uranyl 2%) est déposée puis le film est séché. De par sa haute masse atomique, le contrastant dévie les électrons, ainsi l'échantillon apparaît plus clair que ce qui l'entoure, d'où le nom de coloration négative.

De très nombreux essais ont été effectués afin d'améliorer la taille, le PDI et la stabilité des NA en faisant varier les paramètres décrits ci-dessous.

3.1.2. Facteurs fixés et facteurs variables de la formulation par nano-précipitation

Plusieurs paramètres de la formulation sont fixes : i) le ratio acétone/phase aqueuse est de (1:4,v/v), ii) le volume de phase aqueuse est de 1,2 mL (par conséquent celui de la solution d'acétone est de 300 µL), iii) le vortex est formé à l'aide d'un agitateur magnétique de telle sorte qu'il aille le plus bas possible sans toucher le fond du vial, iv) la nano-précipitation et l'élimination du solvant sont effectuées à température ambiante.

A ces paramètres fixés s'ajoutent des paramètres variables : i) la phase aqueuse, ii) la concentration finale de G-IFO, iii) la technique d'évaporation du solvant, iv) l'ajout de surfactant, v) la technique de nano-précipitation.

La phase aqueuse

Différentes phases aqueuses ont été testées : eau MilliQ, eau pour préparations injectables, NaCl 0,9%, NaCl 0,9% TRIS 10mM, solution glucosée 5%. L'eau MilliQ est la solution donnant les meilleurs résultats. Dans les solutions de NaCl 0,9% et NaCl 0,9% TRIS 10mM, aucune turbidité apparaît à l'œil nu lors de la nanoprecipitation.

Concentration finale de G-IFO

La concentration finale de G-IFO : de 2 à 16 mg/mL : plus la concentration est élevée moins bonne est la nano-précipitation. En effet, après évaporation de l'acétone, des gouttes d'apparence huileuse apparaissent et une forte odeur de géranol se dégage.

Il est à noter que pour les expérimentations d'efficacité *in vivo*, il faudrait formuler des suspensions de NA à des concentrations supérieures à 8 mg/kg ce qui correspond à des injections de G-IFO supérieures à la dose d'eq. 50 mg/kg pour un volume d'injection de 10 mL/kg. Des essais de centrifugation ont été réalisés afin de concentrer les suspensions de NA : après centrifugation, un volume défini de surnageant est éliminé puis l'échantillon est de nouveau resuspendu (par vortex et/ou par sonication) mais ces essais n'ont pas été satisfaisants et ont montré une très forte hétérogénéité de taille en DDL ainsi que la présence de grosse NA (supérieures à 1 µm).

Technique d'évaporation du solvant

Parmi les techniques d'évaporation du solvant, nous avons testé le rotavapor®, le speedvac® et la dialyse. Ces deux derniers n'ont pas montré de résultats satisfaisants. Nous avons donc fixé la technique d'évaporation avec le rotavapor.

Ajout de surfactant

L'ajout de tensioactif – ou agent de surface ou encore surfactant – permet d'améliorer la stabilité de divers composés en augmentant leur solubilité. En effet, un tensioactif est une molécule amphiphile ayant la propriété de se concentrer aux interfaces entre l'eau et d'autres substances peu solubles dans l'eau. Nous avons testé trois surfactants : le Tween 80, le Pluronic® F-68 et le Pluronic® F-127.

Le Tween 80 est un surfactant composé de polysorbate 80 (ou monooléate de polyoxyéthylène sorbitane) constitué de deux blocs, une chaîne aliphatique hydrophobe et une tête éthoxylée hydrophile (Figure 29). Il est largement utilisé comme excipient dans des compositions galéniques de médicaments. Les Pluronic® F-68 (poloxamère 188) et F-127 (poloxamère 407) sont composés de poloxamères, des copolymères non ioniques constitués de trois blocs, un bloc central hydrophobe de polypropylène glycol entouré de deux blocs hydrophiles de polyéthylène glycol (Figure 29).

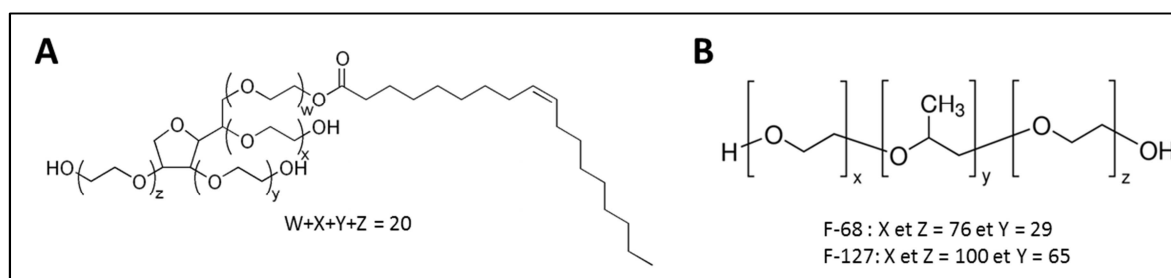


Figure 29. Structure chimique du A) Tween80 ou Polysorbate 80 et B) Pluronic® F-68 (poloxamère 188) et F-127 (poloxamère 407)

Plusieurs essais ont été réalisés en faisant varier les facteurs suivants : i) la concentration du surfactant (0,05 à 10%;m/m), ii) la concentration en G-IFO (2 à 20 mg/mL) - il est à noter que peu de test ont été effectués à des concentrations supérieures à 8 mg/mL, notamment pour des raisons de disponibilités du produit de synthèse G-IFO – et iii) la mise en solution du surfactant (dans la phase aqueuse ou dans l'acétone). Après des essais préliminaires, nous avons choisi de mettre le surfactant dans la phase aqueuse.

L'ajout de surfactant semble améliorer la stabilité des NA, cependant il existe encore une grande hétérogénéité de taille de NA au sein de l'échantillon. La Figure 30 présente un exemple de formulation d'une suspension de NA de G-IFO à 4 mg/mL avec soit 0,5% (m/m) de Tween 80 ou de Pluronic® F-68 avec des images faites par la MET sur un échantillon pur et un échantillon dilué au demi.

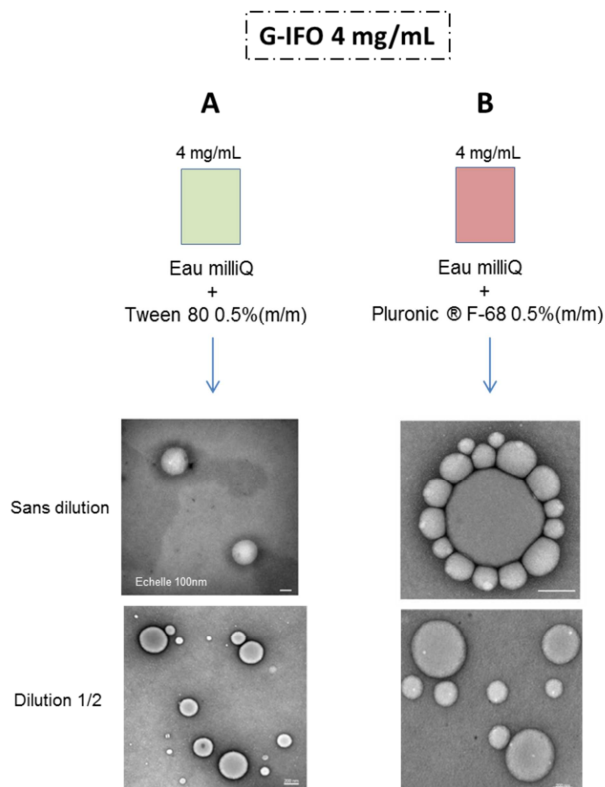


Figure 30. Exemple d'images MET de NA de G-IFO à 4 mg/mL avec un surfactant

Formation de NA de G-IFO à une concentration finale de 4 mg/mL dans de l'eau MilliQ avec (A) du Tween 80 à 0,5% (m/m) ou avec (B) Pluronic® F-68 à 0,5% (m/m). Haut : images sans dilution préalable ; Bas : images après dilution préalable au demi dans de l'eau MilliQ.

Microfluidique

Il existe différentes techniques de nanopréciptation pour former des NA, dont la technique par système microfluidique. Nous avons décidé de tester cette méthode avec la collaboration de la plateforme NanoAssemblr™ (Precision Nanosystems, Inc.). Cette plateforme permet de contrôler la formulation de NA grâce à un système microfluidique en utilisant des cartouches dans lesquelles sont gravés de fins canaux. La molécule X-IFO est dissoute dans un solvant organique (acétone) et est injectée dans une entrée de la cartouche, tandis qu'une solution aqueuse est injectée dans l'autre entrée de la cartouche. Les deux solutions subissent un flux laminaire contrôlé et viennent se rencontrer dans la cartouche. Le mélange entre la phase organique et la phase aqueuse se fait à l'échelle du nanolitre et de la milliseconde. Le principe est présenté dans la Figure 31.

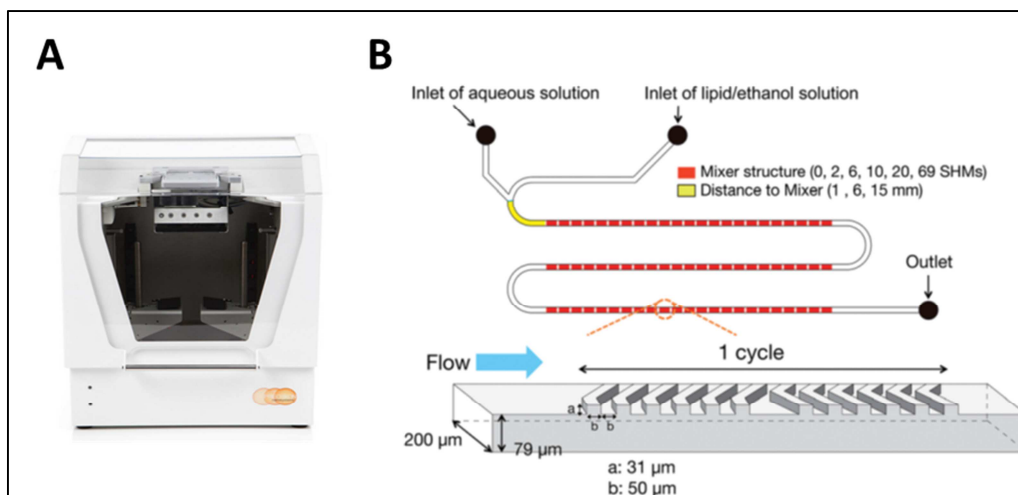


Figure 31. A) NanoAssemblr™. B) Principe de la microfluidique.

(A) Appareil réalisant la formation de NA par microfluidique. (B) La phase organique et la phase aqueuse sont mélangées dans un très fin canal à une vitesse préalablement choisie.

Source : (A) (117) et (B) (118)

L'automatisation permet de standardiser des paramètres tels que la vitesse de mélange des deux solutions et le rapport solution aqueuse/solvant et ainsi améliorer la reproductibilité de la méthode. Un autre avantage de cet appareil réside dans la possibilité de pouvoir formuler des NA à grande échelle. Il est donc intéressant de tester différents débits (6, 8 et 12 mL/min) et concentrations finales (2, 4, 8 mg/mL) afin d'optimiser la formulation des NA de X-Oxaza. Le rapport des phases (1 volume d'acétone pour 4 volumes de phase aqueuse), la température (température ambiante), la technique d'élimination du solvant (évaporation grâce à un rotavapor – évaporateur rotatif) restent des paramètres fixes. Les résultats n'ont pas été pas satisfaisants ; diamètres élevés (supérieur à 500 nm), faible stabilité en solution (Figure 32). L'ajout de surfactant tels que le Tween 80 et Pluronic® F-68 n'a pas amélioré la nanopréciipitation par microfluidique.

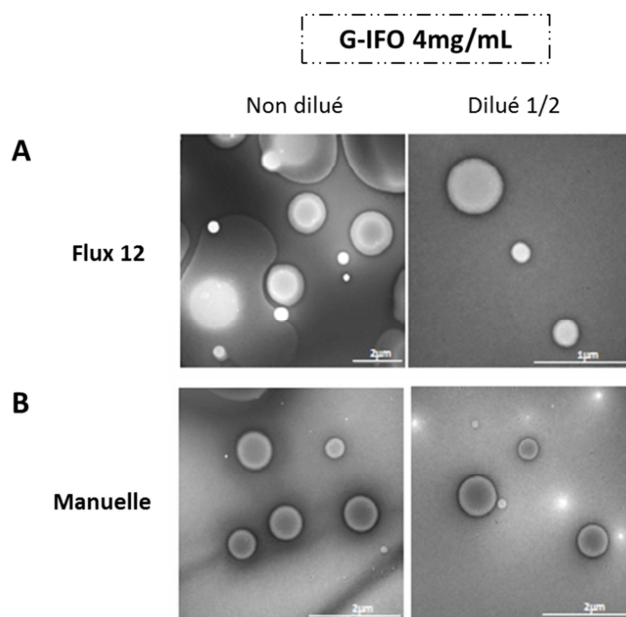


Figure 32. Exemple d'images MET de NA de G-IFO à 4 mg/mL

Formation de NA de G-IFO à une concentration finale de 4 mg/mL dans de l'eau MilliQ par (A) microfluidique avec un flux de 12 mL/min ou (B) nanopréciipitation manuelle. Gauche : images sans dilution préalable ; Droite : images après dilution préalable au demi dans de l'eau MilliQ.

Pégylation des NA ou synthèse de NA de deuxième génération

La pégylation est un processus apparu à la fin des années 1970 qui consiste à greffer chimiquement des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) sur des composés afin d'améliorer leur comportement pharmacocinétique et leur pharmacodynamie. Le PEG est un polymère constitué d'unités répétitives d'éthylène glycol, de formes linéaires ou ramifiées et de masses moléculaires différentes. La pégylation est un processus couramment appliqué aux NA ; on parle de NA de deuxième génération ou de NA furtives. Brièvement, la pégylation permet d'augmenter la solubilité dans l'eau d'un composé : chaque sous-unité d'éthylène glycol peut s'associer à deux ou trois molécules d'eau (119). Elle apporte une protection contre la destruction précoce par les dégradations enzymatiques et la reconnaissance par les opsonines ; on parle de furtivité du composé. En effet, sans opsonisation, les composés ne sont plus reconnus par le SI et notamment par les macrophages hépatiques (cellules de Küpffer) et leur demi-vie dans l'organisme est largement augmentée (119). Elle permet par conséquent de favoriser l'effet EPR par augmentation du temps de résidence du produit sous forme nanoparticulaire dans la circulation sanguine. Elle offre également la possibilité de ciblage par la suite : il est envisageable de greffer un ligand spécifique d'un antigène tumoral sur le motif PEG, permettant de cibler spécifiquement les cellules tumorales ; on parle de NA de troisième génération.

La pégylation engendre des changements de taille, de structure, de masse moléculaire et de propriétés physico-chimiques, ce qui va affecter l'activité biologique du composé. Plusieurs stratégies ont été adoptées afin de pégyler les NA : i) co-nanoprécipitation avec du cholestérol-PEG600 (Chol-PEG600), ii) co-nanoprécipitation avec du DSPE-PEG2000, iii) co-nanoprécipitation avec des dérivés terpéniques pégylés (PEG2000).

Les différents essais de co-nanoprécipitation avec le Chol-PEG600 et le DSPE-PEG2000 ont donné des résultats très variables et peu reproductibles. La co-nanoprécipitation avec le Chol-PEG600 donnant les meilleurs résultats (diamètre moyen aux alentours de 100 nm avec un PDI de 0,2 à J0 et 0,1 à J10) est celle formulée avec le surfactant Tween 80 selon les conditions suivantes :

- Concentration finale en G-IFO de 2 mg/mL
- Tween 80 à 0,5% (m/m) (dilué dans l'eau MilliQ)
- Chol-PEG600 à 0,5% (m/m) (dilué dans l'acétone avec le G-IFO)

Une option différente a été testée afin de faire des NA pégylés : co-nanoprécipitation des analogues X-Oxaza avec des chaînes terpéniques pégylées (X-PEG). La synthèse des X-PEG a été faite en collaboration de l'équipe CNRS UMR 7182 « Electrochimie et Synthèse Organique » à l'Institut de Chimie et des Matériaux Paris Est, Thiais. Brièvement, sont mélangés du géraniol avec du triphénylphosphine, de l'iode et de l'imidazole. Au niveau moléculaire, l'arrivée de la triphénylphosphine déforme le nuage électronique du diiode pour former un cation qui va réagir avec la fonction alcool du géraniol pour former un ion oxonium. Cet ion oxonium va être déprotoné par l'imidazole, ce qui permet à l'ion iodure d'attaquer la chaîne terpénique du géraniol pour former un complexe G-I. On obtient une huile brune de géraniol iodé avec un rendement de 30%. L'obtention du G-PEG est finalisée par l'ajout de méthyl-PEG2000 dans une solution d'hydrure de sodium. Au niveau moléculaire, il y a dans un premier temps, déprotonation de la fonction alcool du méthyl-PEG par l'hydrure de sodium, puis dans un second temps, une substitution nucléophile SN2 avec départ du groupe iodé pour former un composé de G-PEG ainsi que de l'iodure de sodium (Figure 33). Après extraction et purification, on obtient une poudre légèrement jaunâtre de G-PEG avec un rendement de 10%.

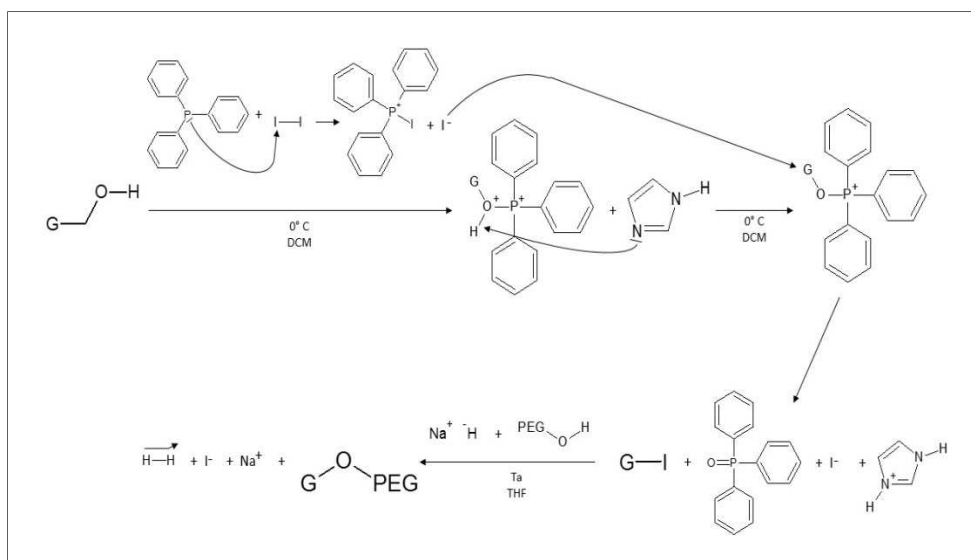


Figure 33. Synthèse du G-PEG2000

Synthèse organique du géraniol couplé à du PEG de masse molaire 2000 g/mol.

Source : V. Gauthier

Lors de la co-nanoprécipitation du G-IFO avec du G-PEG, nous nous sommes demandé si le G-PEG devait être ajouté dans le solvant organique (l'acétone) ou dans le solvant aqueux. Après quelques essais, nous avons remarqué que la turbidité se formait lorsque le G-PEG était dans la solution d'acétone.

Des essais ont été réalisés avec plusieurs concentrations finales de G-IFO (2,8 et 16 mg/mL), de G-PEG2000 (0,01 à 10 % (m/m)) et avec l'association du surfactant Pluronic® F-127 avec des concentrations variant de 0,001 à 0,5% (m/m).

Les meilleurs essais de formulation ont été obtenus avec l'ajout de Pluronic® F-127 0,01 et 0,001% (m/m) au G-PEG 0,1 et 1% (m/m). Aucune image MET n'a pu être réalisée à l'heure actuelle.

Par ailleurs, il a été mis en évidence une instabilité des formulations de G-IFO en association avec les dérivés pégylés et/ou les tensioactifs à fortes concentrations (supérieures à 10% (m/m)), qu'elles soient stockées à 4°C ou à température ambiante. En 24h à 48h, les suspensions se séparent en deux phases : une phase supérieure limpide et un culot poudreux blanchâtre. Ces deux phases ont été analysées en RMN à l'Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est (ICMPE) à Thiais : le culot est bien constitué de G-IFO. Ce phénomène semble se rapprocher de la sédimentation. Le culot ainsi formé est redispersible après agitation au vortex mais l'analyse en DDL montre la présence de NA supérieurs à 1 µm avec un PDI supérieur à 0,2.

3.1.3. Nano-émulsions ?

Plusieurs formulations de NA ont fait l'objet d'une étude visant à déterminer leur organisation supramoléculaire. L'équipe de P.Couvreur a montré que les NA de squalène-gemcitabine étaient organisées de manière spécifique (120). Deux méthodes différentes ont été testées : la diffusion des rayons X sous petit angle (*small-angle X-ray scattering* (SAXS)) et la microscopie électronique à transmission cryogénique (cryo-MET).

L'étude au SAXS a été faite avec le synchrotron SOLEIL et en collaboration avec C. Bourgaux. Malheureusement, après plusieurs essais à des concentrations différentes de NA de G- et SQ-IFO et l'ajout de surfactants, aucune organisation spécifique n'a été observée. Les premiers essais d'analyse au cryo-MET sur les NA de SQ-IFO à 4 mg/mL, n'ont pas pu non plus déterminer une structure supramoléculaire. Plusieurs hypothèses sont émises : i) il n'existe pas d'organisation supramoléculaire au sein des NA de X-Oxaza c'est-à-dire que ce sont des structures dites amorphes, ii) les NA formulées ne sont pas des NA « solides » mais seraient des NA de type nano-émulsion, iii) les conditions pré-analytiques ne sont pas suffisamment optimisées pour former une structure supramoléculaire organisée.

Malgré les différents essais d'optimisation de la formulation de NA de G-IFO, nous en sommes venus à l'hypothèse que l'autoassemblage de G-IFO menait à des structures de type nano-émulsion et non à des NA « solides ». En effet le manque de stabilité, de reproductivité et l'hétérogénéité de tailles confirmeraient cette hypothèse. Brièvement, une émulsion est le mélange de deux liquides non miscibles, l'un étant dispersé dans l'autre sous forme de fines gouttelettes. La stabilité d'une émulsion est temps-dépendant, c'est pourquoi l'ajout d'un ou deux surfactants est nécessaire pour maintenir l'intégrité de la dispersion. Il existe deux principaux types d'émulsions : huile dans eau et eau dans huile, ainsi que deux méthodes de préparations : haute et basse énergie. Dans notre cas, il s'agirait d'une émulsion type huile dans eau formulée lors d'une émulsification basse énergie (émulsification spontanée) (Figure 34).

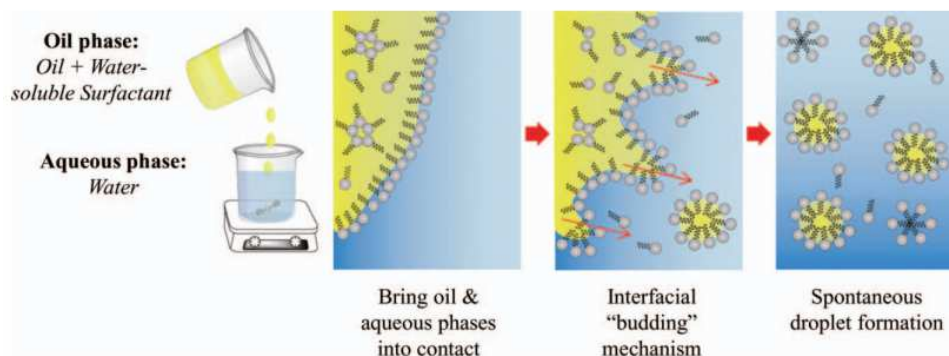


Figure 34. Emulsion spontanée.

Le composé lipophile est solubilisé dans un solvant organique miscible à l'eau. La phase organique est ajoutée à la phase aqueuse sous agitation magnétique : quand les deux phases entrent en contact une partie des composants miscibles dans les deux phases se déplace d'une phase à l'autre. En se déplaçant, elle entraîne une augmentation de la zone interfaciale huile-eau : il se forme spontanément des gouttelettes.

Source : (121)

Des études supplémentaires sont à faire afin d'explorer la formulation du G-IFO sous forme de nano-émulsions.

Dans la suite de ce travail, nous nous sommes intéressés uniquement à la forme dite libre du G-IFO.

3.2. Optimisation de la formulation du G-IFO sous forme libre

3.2.1. Nouvelle formulation

Lors des expérimentations *in vivo* précédentes, la formulation du G-IFO sous forme « libre » utilisée comporte du NaCl 0,9%, DMSO et Tween80, respectivement 90/5/5,v/v/v. Plusieurs inconvénients sont répertoriés pour une application pré-clinique et clinique :

- Une turbidité est rapidement observée dès de faibles concentrations en solution (> G-IFO eq. 50 mg/kg)
- La stabilité en solution est faible (elle est d'environ une quinzaine de minute à une concentration de 4 mg/mL, équivalente à la dose de 25 mg/kg injectée lors des études PK). Cette instabilité se traduit par une libération trop rapide de l'HO-IFO ; la mise en suspension du G-IFO doit donc être faite extemporanément ce qui entraîne des contraintes, organisationnelles notamment.

- Le problème de la tolérance veineuse observée sur la queue des souris avec apparition de nécrose au point d'injection.

Pour répondre ces problématiques, nous avons fait appel à une collaboration avec l'équipe de J. Vacus qui dirige la société spécialisée dans la formulation galénique : DrugAbilis®. Elle a fait plusieurs essais de formulations en testant plusieurs agents de surface déjà utilisés dans des formulations galéniques médicamenteuses : le Tween80, Cremophor EL, Solutol HS15 et *hydroxypropyl beta cyclodextrin* (HPBCD). Le G-IFO est tout d'abord solubilisé dans du DMSO avec une concentration finale de 33% de G-IFO. Ensuite cette solution mère est utilisée pour les différents tests de formulation.

Les essais de formulation du G-IFO dans une solution glucosée 5% avec du Tween 80 à 2,5% (m/v) ont montré la présence d'une turbidité à 12, 18, 24 et 30 mg/mL de G-IFO alors qu'aux concentrations à 4 et 6 mg/mL, la solution était macroscopiquement limpide. Cependant l'analyse microscopique a montré la présence de bulles ou de microémulsions même aux plus basses concentrations (Figure 35).

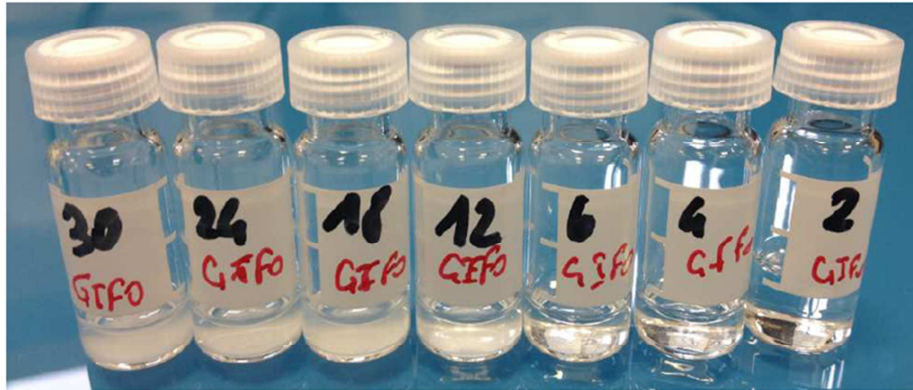
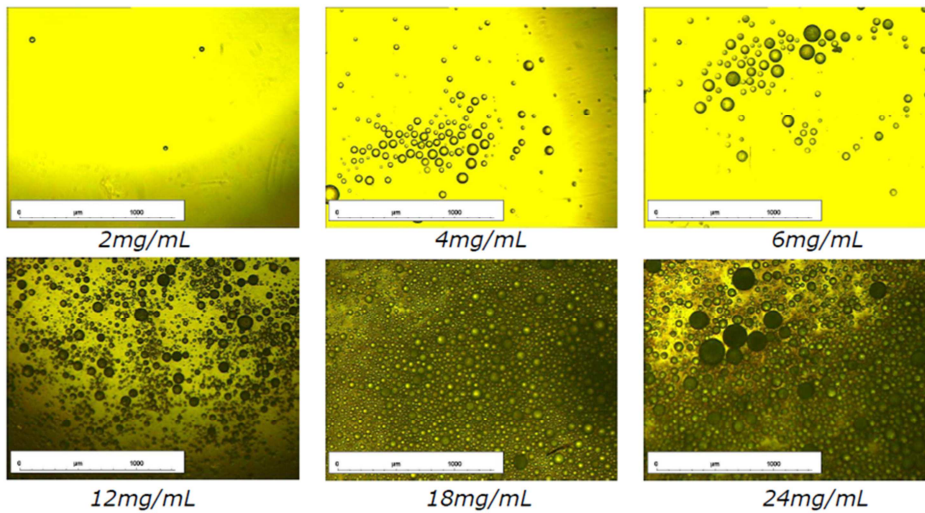
A**B**

Figure 35. A) Analyse macroscopique et B) microscopique de solutions glucosées Tween 80 2,5% (m/v) de G-IFO.

Etude de la solubilisation d'une concentration croissante de G-IFO (de 2 à 30 mg/mL) dans une solution glucosée 5% avec du Tween 80 à 2,5% (m/v). Analyses visuelles et microscopiques. Images fournies par DrugAbilis®.

Pour la formulation utilisée lors des études précédentes, nous avons dissous le G-IFO dans une solution de Tween 80 5% (m/m) ce qui est équivalent à environ Tween 80 5,4% (v/m) (la masse volumique du Tween 80 est d'environ 1082 kg/m³ à 25°C). Pour une dose de G-IFO eq. 100 mg/kg, il était injecté une solution concentrée à 15,8 mg/mL, c'est pourquoi nous observons une forte turbidité de la solution.

Concernant les essais dans les solutions glucosée 5% de Cremophor EL à 2,5% (m/v), Solutol HS15 à 2,5% (m/v) et HPBCD à 10% (m/v), elles semblent macroscopiquement limpides aux concentrations

de G-IFO à 2, 4, 6 et 12 mg/mL mais au niveau microscopique seule la solution de HPBCD montre une limpidité jusqu'à 6 mg/mL (Figure 36).

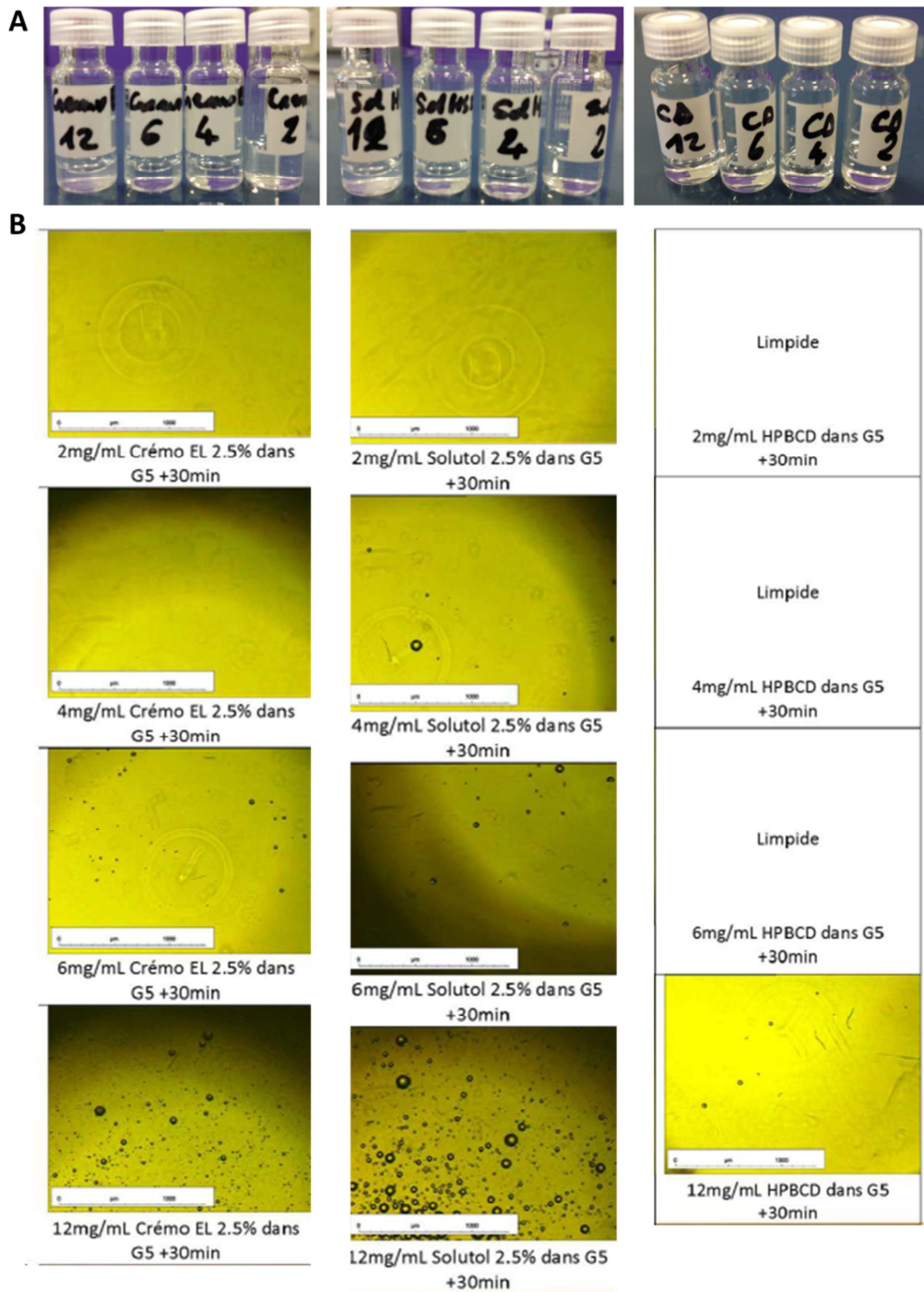


Figure 36. A) Analyse macroscopique et B) microscopique de solutions glucosées Cremophor EL à 2,5% (m/v), Solutol HS15 à 2,5% (m/v) et HPBCD à 10%(m/v) de G-IFO.

Etude de la solubilisation d'une concentration croissante de G-IFO (de 2 à 12 mg/mL) dans une solution glucosée 5% avec du (gauche) Cremophor EL à 2,5% (m/v), (milieu) Solutol HS15 à 2,5% (m/v) et (droite) HPBCD à 14% (m/v). Analyses visuelles et microscopiques. Images fournies par DrugAbilis®.

L'excipient HPBCD semble le plus adapté pour solubiliser le G-IFO en solution aqueuse. En effet le HPBCD est listé dans la pharmacopée européenne, et son utilisation a été décrite comme sûre en tant qu'ingrédient pharmaceutique inactif (122). Brièvement les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques composés d'un certain nombre d'unités de dextrose (7 unités pour la β -cyclodextrine) (Figure 37). Ces structures cycliques contiennent une cavité centrale lipophile et une surface extérieure hydrophile. De ce fait elles peuvent interagir avec des molécules médicamenteuses lipophiles afin d'améliorer leur solubilité.

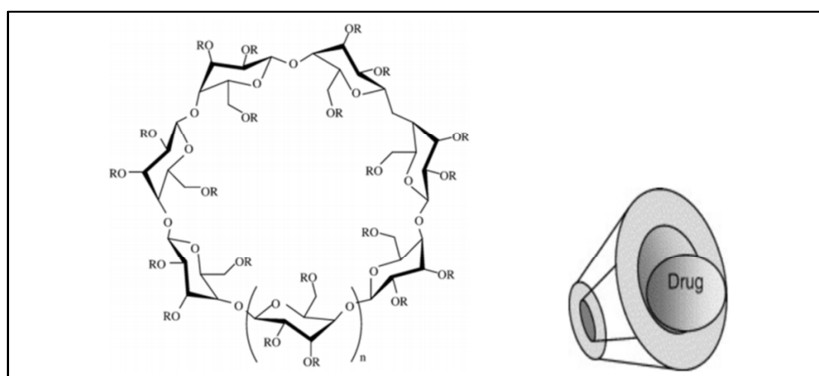


Figure 37. Structure de la β -cyclodextrine (n = 1 : HPBCD) et principe de l'interaction avec le médicament lipophile

Source : (122)

L'utilisation du HPBCD présente de nombreux avantages lors de la formulation galénique d'un médicament : elle est peu coûteuse, facile à manipuler (pas de nécessité de précautions d'emplois liés à son innocuité), son utilisation et les conséquences cliniques sont largement décrites dans la littérature (comportement pharmacocinétique, toxicités telles que des diarrhées, apparaissant à partir d'une dose orale quotidienne de 270 mg/kg)(122), et elle présente une élimination rénale rapide et est excrétée sans modification enzymatique, avec une $T_{1/2}$ variant de 20 à 100 min chez l'homme (122).

Des tests ont ensuite été effectués avec une concentration de G-IFO en solution égale à 8 mg/mL. Le choix d'étude à cette concentration n'est pas anodin : le volume d'injection IV chez une souris est habituellement 10 mL/kg (200 μ L pour une souris de 20g), avec une injection d'une solution de G-IFO à 8 mg/mL, on injecte donc une quantité équivalente à 80 mg/kg de G-IFO c'est-à-dire égale à 50 mg/kg en équivalent IFO. La formulation ne montrant pas de turbidité à l'œil nu ni de

microgouttelette au microscope correspond à celle composée d'un tampon phosphate pH 7,4 contenant 14% de HPBCD (m/v). Il est à noter que cette solution est légèrement hypertonique avec une osmolalité de 470 mosm/kg (l'osmolalité dans le sang se situe entre 270 et 300 mosm/kg). C'est pourquoi l'injection en IV doit être lente pour éviter le risque de déshydratation intracellulaire.

3.2.2. Etude de stabilité de la nouvelle formulation galénique

Une étude de stabilité en solution a, par la suite, été entreprise pour le suivi des concentrations en G-IFO par un dosage par chromatographie liquide haute pression couplée à de la spectrométrie de masse en tandem. Cette étude a été faite à la concentration de G-IFO à 8 mg/mL. Le G-IFO en solution a montré une stabilité chimique supérieure à 24h à température ambiante (Figure 38). Cette augmentation de la stabilité à température ambiante signe le potentiel de cette forme galénique pour une utilisation en pré-clinique et en clinique.

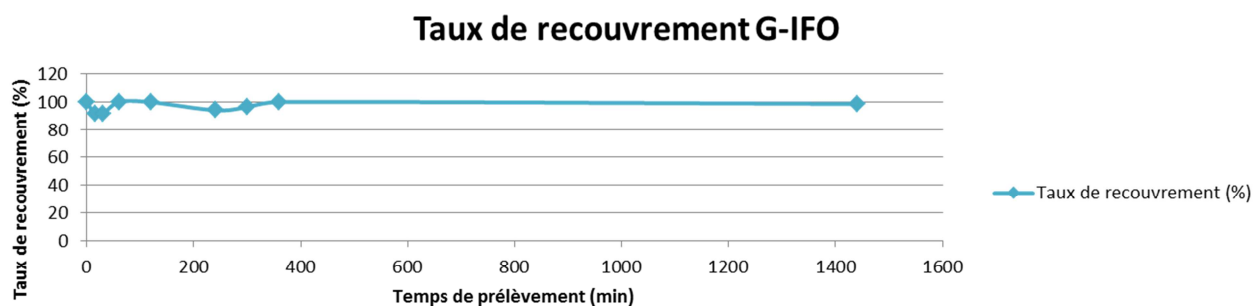


Figure 38. Taux de recouvrement en G-IFO lors de l'étude de stabilité en solution HPBCD 14% à température ambiante.

Etude de la stabilité du G-IFO à 8 mg/mL dans une solution HPBCD 14% (m/v) à température ambiante avec une analyse semi-quantitative par chromatographie liquide haute pression couplée à de la spectrométrie de masse en tandem. Le résultat est représenté par le taux de recouvrement qui correspond au ratio (%) de l'aire de G-IFO au temps de prélèvement par rapport à l'aire de G-IFO à t = 0 min.

3.2.3. Comparaison de la tolérance veineuse entre les deux formulations

La tolérance veineuse a été ensuite étudiée dans la souris C57Bl/6. Pour cette expérimentation, nous avons testé l'effet locale de l'administration IV du G-IFO eq 50 mg/kg solubilisé dans le véhicule DMSO/Tween80/NaCl0,9% (5/5/90,v/v/v) (n = 3 souris C56Bl/6) et dans le véhicule HPBCD 14% (n = 3 souris C56Bl/6). Quatre injections IV sont réalisées à J0, J1, J2 et J5. Suite à la première injection, des signes cliniques visuelles montrent une moins bonne tolérance veineuse dans le groupe ayant reçu le G-IFO formulé dans le véhicule DMSO/Tween80/NaCl0,9% (veines pâles pour deux souris sur trois dont une souris qui n'a pas pu recevoir la deuxième injection). Après la deuxième injection, les queues des souris du groupe ayant reçu le G-IFO formulé dans le véhicule DMSO/Tween80/NaCl0,9% sont en mauvais état (queue boursoufflée, veines pâles, troisième injection IV difficile). La quatrième injection IV dans le groupe ayant reçu la même formulation de G-IFO fut impossible. Dans le groupe des souris ayant reçu le G-IFO formulé dans le nouveau véhicule HPBCD, aucun signe clinique de toxicité locale, ni de problème d'injection IV ne sont présents. La Figure 39 illustre l'état des queues des souris 15 jours après la première injection IV chez la souris.

A Véhicule DMSO/Tween80/NaCl0,9%,v/v/v



B Véhicule HPBCD 14% (m/v)



Figure 39. Comparaison de la tolérance veineuse entre A) l'ancien (véhicule DMSO/Tween80/NaCl0,9%) et B) le nouveau (HPBCD 14%) véhicule du G-IFO

Observation visuelle de l'état de la queue de la souris quinze jours après la première administration IV de G-IFO à eq 50mg/mL. Parmi groupe ayant reçu le G-IFO formulé dans le véhicule DMSO/Tween80/NaCl0,9%, deux (n=1 souris) ou trois (n=2 souris) injections IV sont réalisées avec difficulté. Dans le second groupe, quatre injections IV sont réalisées (n = 3 souris) sans difficulté.

La formulation galénique développée en collaboration avec DrugAbilis® contenant l'HPBCD nous permet d'exploiter l'activité du G-IFO avec une formulation plus adéquate pour des applications pré-cliniques et cliniques.

3.2.4. Etude de l'efficacité antitumorale avec le véhicule DrugAbilis®

Nous avons ensuite étudié l'efficacité *in vivo* du G-IFO solubilisé dans la nouvelle formulation sur le modèle de fibrosarcome murin MCA205. Le design de cette expérimentation est présenté par la Figure 40 (n = 6 souris/groupe). La stabilité en solution étant été démontrée à la concentration de 8 mg/mL, nous avons décidé de ne travailler qu'à cette concentration et par conséquent de jouer sur les volumes d'injection pour administrer la quantité en G-IFO voulue. Pour l'administration de G-IFO eq. 200 mg/mL, le volume à injecter en IV était de 1200 μ L soit 60 mL/kg, ce qui n'est pas un volume envisageable ; nous avons donc décidé d'injecter les différentes doses de G-IFO ainsi que de géraniole et le véhicule seul en deux fois dans la même journée (matin et après-midi).

Les injections du matin se sont bien passées pour les différents groupes sauf dans les groupes de G-IFO eq. 150 et 200 mg/kg. Dans le groupe G-IFO eq. 150 mg/kg, les souris présentaient des signes de faiblesse mais elles se sont rétablies rapidement (en une dizaine de minutes). Cependant dans le groupe G-IFO eq. 200 mg/kg, le taux de mortalité a été de 100 % (seules trois souris ont été injectées). La toxicité semble être d'origine neurologique car les souris ont montré des signes de neurotoxicité tels qu'une paralysie d'un côté du corps (la souris tournait en rond dans un seul sens) et des mouvements incontrôlés des pattes. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette toxicité. La molécule HO-IFO est déjà présente en forte quantité dans la solution d'injection ; nous pensons à la faible probabilité de cette hypothèse au regard de l'étude de stabilité chimique faite précédemment. Le G-IFO se transforme très rapidement en HO-IFO lorsqu'il arrive dans la circulation sanguine ; la tolérance veineuse étant très satisfaisante, cette hypothèse est peu probable. La distribution du G-IFO administré est prioritairement orientée vers le cerveau. On a vu lors de l'étude de biodistribution que le G-IFO était largement distribué au niveau du cerveau très tôt après l'injection. De plus, il a été démontré que les β -cyclodextrines augmentaient la délivrance de principes actifs vers le cerveau (123). Cette hypothèse est par conséquent envisageable. Si cette dernière est validée, l'administration de G-IFO véhiculé dans le HPBCD pourrait être discutée dans le traitement de tumeurs localisées au niveau du cerveau. Une dernière hypothèse pouvant être émise serait que cette toxicité soit liée à l'administration d'une trop grande quantité de solution hypertonique ; cependant, le groupe contrôle a reçu le même volume d'injection que le groupe G-IFO eq. 200 mg/kg et les souris n'ont montré aucun signe clinique d'effet secondaire.

La poursuite des injections dans les groupes à doses inférieures à G-IFO eq. 200 mg/kg s'est très bien passée. Le suivi de la croissance tumorale a été réalisé avec une mesure tous les deux-trois jours. De manière inattendue, le G-IFO a montré une faible efficacité ; en effet, l'efficacité à J13 post traitement du G-IFO à eq. 50 mg/kg n'est pas significative et celle à eq. 100 et 150 mg/kg sont légèrement significatives, respectivement $p < 0,01$ et $p < 0,05$ (Figure 40). Différentes hypothèses peuvent être émises. Le lot de G-IFO utilisé serait mauvais ; cependant, la synthèse et la pureté du G-IFO sont vérifiées par RMN et par spectrométrie de masse et ces analyses montraient la présence de G-IFO pur à 99,4% (faible présence de HO-IFO et de MeO-IFO). Le G-IFO n'est pas distribué au niveau de la tumeur. L'une des causes pourrait être que le G-IFO serait « trop » stable dans la solution de cyclodextrine ; il y reste piégé et par conséquent il ne peut pas être distribué vers la tumeur. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que le coefficient de dissociation entre la HPBCD et la molécule qu'elle piège est principalement fonction du facteur de dilution appliqué à la solution. Stella *et al.* ont décrit que la libération optimale de la molécule piégée se situe dans un rapport de 1/2800, ce qui correspond à l'injection de 5 mL chez un adulte (le volume de distribution pour la HPBCD serait celui de l'eau extracellulaire, soit environ 20% du poids corporel ou 14 L pour un adulte de 70 kg) (124). Chez la souris, le volume de distribution pour la HPBCD serait d'environ 4 mL pour une souris de 20 g (125). Or, pour notre étude d'efficacité, nous avons fait des dilutions allant de 1/40^{ème} (100 µL dans 4 mL) à 1/7^{ème} (600 µL dans 4 mL), dilutions très inférieures au rapport de 1/2800 décrit dans la publication de Stella *et al.* (124). Dans le cadre de cette hypothèse, le G-IFO piégé dans les HPBCD ne serait donc pas libéré et serait éliminé par voie rénale en suivant la cinétique d'élimination de la HPBCD. Un moyen de confirmer cette hypothèse serait de récupérer des urines afin d'apprécier la présence de G-IFO (sachant que le G-IFO, au vu de sa lipophilie, ne serait pas éliminé par voie rénale). Un second moyen de tester cette hypothèse serait l'étude *ex vivo* de libération du G-IFO dans le plasma chauffé à 37°C.

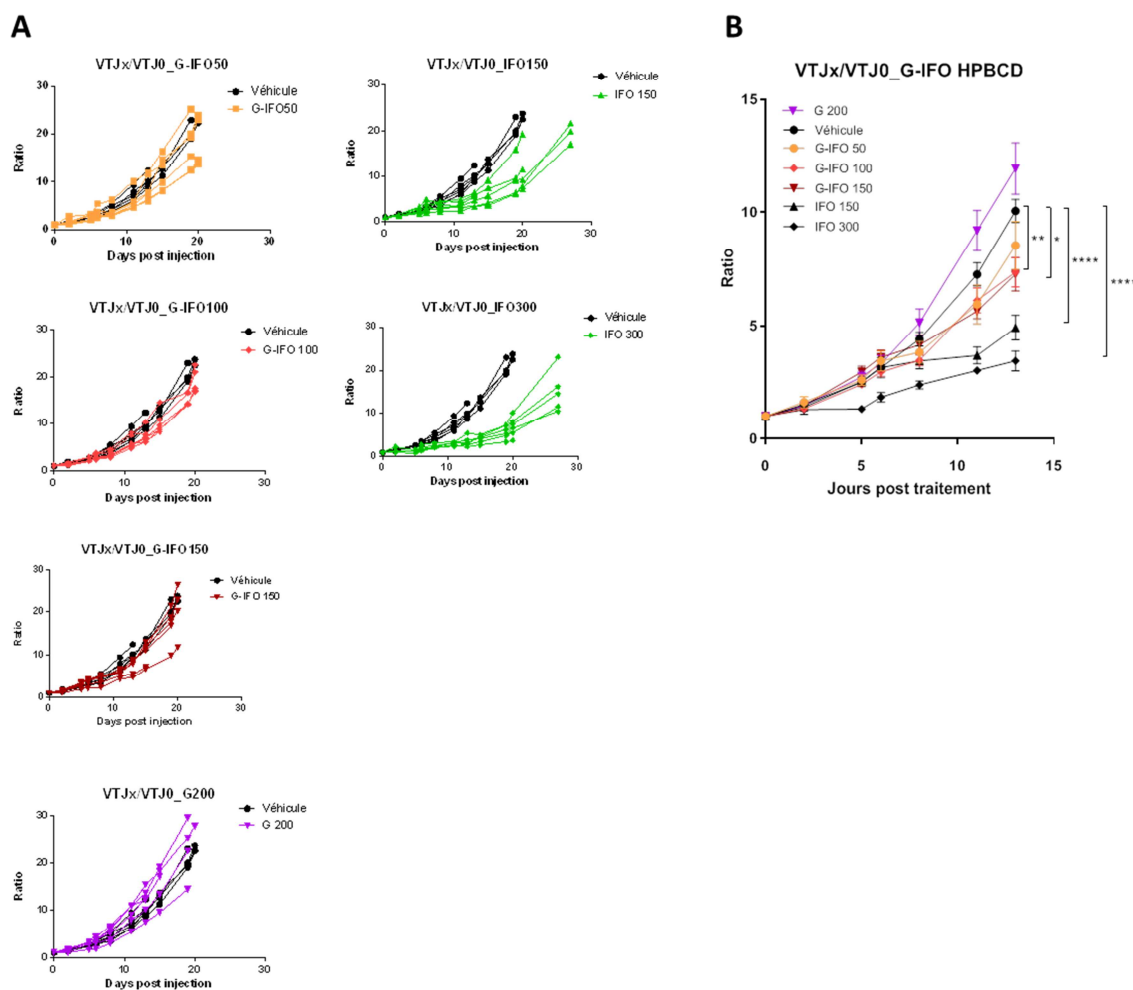


Figure 40. Efficacité antitumorale du G-IFO formulé avec le véhicule HPBCD

Suivi de la progression tumorale après une dose d'IFO 150 et 300 mg/kg, de G-IFO eq. 50, 100 et 150 mg/kg ou de géraniol (G) eq. 200 mg/kg. La dose a été injectée en IV en deux temps (matin et après-midi). La tumeur est mesurée tous les deux-trois jours. VTJx est le volume tumoral mesuré au jour X, VTJ0 est le volume tumoral initial. Les données individuelles des six souris sont représentées sur le graphe (A) par le ratio VTJx/VTJ0. (B) Ratio VTJx/VTJ0. La moyenne et SEM sont indiquées. Le test statistique utilisé est le test 2-way ANOVA sans correction de la comparaison multiple du fait du caractère exploratoire de l'expérimentation. Intervalle de confiance de 95%. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001.

4. Discussion et conclusion de la partie II « Pharmacomodulation de l'IFO »

La preuve de concept de pré-activation de l'IFO est confirmée *in vivo* : augmentation de la libération de HO-IFO, absence de libération de dérivés déchloroéthylés (et donc de CAA) et efficacité antitumorale sur un modèle de fibrosarcome murin. Cependant ces études *in vivo* ont mis en évidence un profil pharmacocinétique non optimal pour une délivrance du G-IFO dans la circulation

sanguine et *in fine* dans la tumeur. C'est pourquoi il a été indispensable de compléter ces études par le développement de systèmes galéniques adaptés au G-IFO. La complexité physico-chimique du G-IFO qui se présente sous une forme huileuse, oblige l'utilisation de solvants tels que l'acétone ou le DMSO pour disperser le produit. L'acétone, utilisée lors de la formulation de nano-objets, est évaporée par la suite et le faible pourcentage de DMSO utilisé n'entraîne pas de conséquence clinique (les souris ayant reçu le véhicule seul n'ont présenté aucun effet indésirable). La première formulation du G-IFO dite « libre » est composée de 5% DMSO, 5% Tween80 et 90% de NaCl, 9% (v/v). Elle présente une stabilité chimique en solution non satisfaisante pour une application en clinique (moins de 30 min à température ambiante) et ne permet pas d'administrer le G-IFO par voie IV (peu de G-IFO retrouvé dans la circulation sanguine et tolérance veineuse faible) ni par voie IP car il présente une faible biodisponibilité. La collaboration avec la société DrugAbilis® a permis d'ouvrir l'axe de recherche sur l'utilisation de β -cyclodextrine, excipient couramment utilisé dans les préparations pharmaceutiques, afin de piéger le G-IFO et de lui garantir une protection contre la dégradation rapide. En effet, la stabilité chimique du G-IFO dans la solution d'injection (tampon phosphate pH7,4 HPBCD 14%) est très satisfaisante (au moins 24h à température ambiante, stabilité compatible pour une application clinique) et la tolérance veineuse après administration du produit est largement améliorée. La faible efficacité antitumorale *in vivo* du G-IFO formulé dans ce nouveau véhicule est inattendue et nécessite de plus amples explorations afin de comprendre les raisons. L'hypothèse la plus plausible est l'absence de libération du G-IFO à partir de la cage de cyclodextrine. Elle reste à confirmer avec des expérimentations supplémentaires telles que le dosage du G-IFO dans les urines ou l'étude de la libération *ex vivo* du G-IFO.

Par ailleurs, la formulation par nano-précipitation est une stratégie prometteuse pour l'amélioration de la stabilité chimique du G-IFO en solution ainsi que pour l'optimisation de DDS. Cependant les développements galéniques menés sur l'amélioration de la nano-précipitation ont souligné que les nano-objets formés par cette méthode seraient des nano-émulsions préparées par émulsification spontanée. Les émulsions sont largement utilisées en cliniques dans les préparations parentérales telles que pour la nutrition parentérale avec l'administration d'acides gras et de vitamines liposolubles (Vitamines A, D, E et K). De récentes revues littérature rapportent les avantages d'utiliser les nano-émulsions en tant que DDS (126) (127): amélioration du profil pharmacocinétique, protection de la molécule de la dégradation, meilleur taux d'encapsulation que les liposomes, facilité de manipulation et de formulation. De futures investigations sont à réaliser afin d'optimiser la formulation et l'utilisation des émulsions de G-IFO.

Pour conclure ce chapitre, la pharmacomodulation par pré-activation de l'IFO offre une alternative à l'administration d'IFO avec une amélioration de la balance bénéfique/risque notamment lors de

l'utilisation de protocoles haute dose d'IFO. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour optimiser la formulation galénique du G-IFO tant sous la forme dite « libre » que sous la forme de nano-objets. Il serait également intéressant d'étendre ces travaux pour les autres dérivés terpéniques tels que le F-IFO et le SQ-IFO qui présentent une plus grande lipophilie et par conséquent un profil pharmacocinétique (biodistribution, vitesse de libération du métabolite HO-IFO) et d'autoassemblage différents.

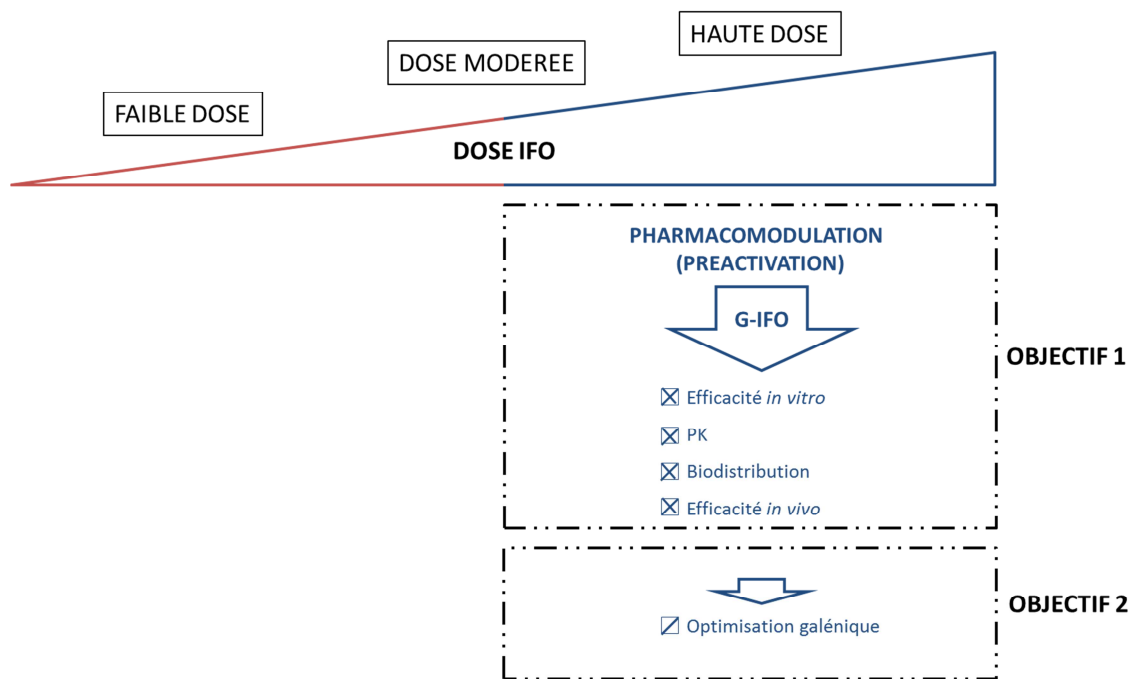


Figure 41. Avancement du projet : objectif 1 et 2

PARTIE III : IMMUNOMODULATION



1. Introduction de la publication 2

Le CPM est largement décrit dans la littérature en tant qu'agent immunomodulateur : immunoinducteur à faible dose et immuno-suppresseur à forte dose. Concernant son isomère de position, l'IFO, peu de publications analysent son effet sur le SI. Nous nous sommes donc intéressés aux propriétés immunomodulatrices de l'IFO à faibles et fortes doses. Nous avons démontré qu'il existait une relation entre la dose d'IFO et la réponse immunitaire antitumorale. De plus, le métabolisme complexe et toxigène de l'IFO nous a menés à également étudier l'influence de l'analogue pré-activé de l'IFO, le G-IFO, sur les acteurs du SI. Nous avons montré que la pré-activation préserve les propriétés immunomodulatrices mais semble passer par un mécanisme différent. En effet une forte synergie est observée lors de l'association de l'immunothérapie par un anticorps anti-PD1 avec le G-IFO en comparaison de l'association avec l'IFO.

Le protocole utilisé est présenté dans la Figure 42. Ce protocole a été réalisé avec la collaboration du Laboratoire d'Immunomonitoring en Oncologie (LIO) à Gustave Roussy, dirigée par le Pr N. Chaput.

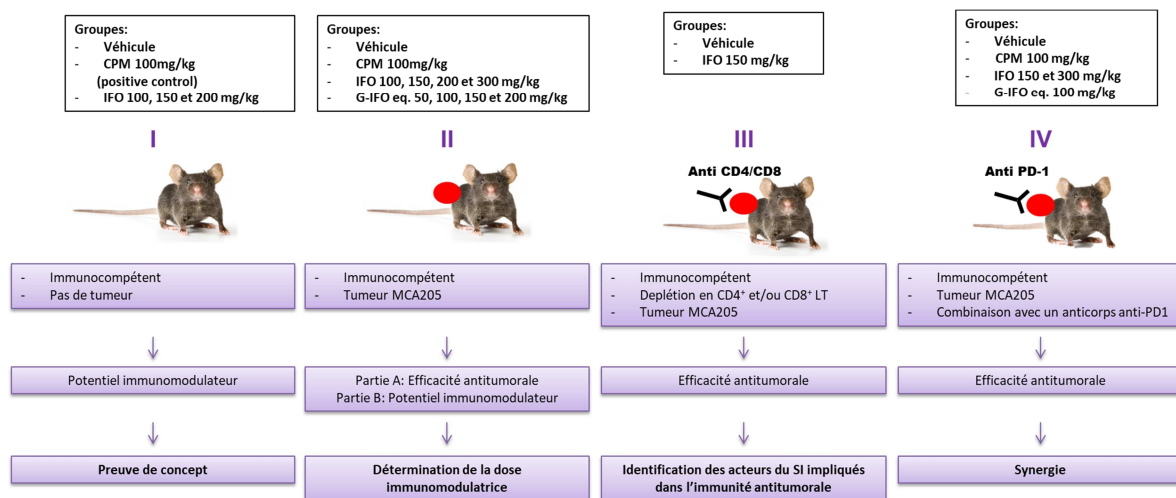


Figure 42. Planification du protocole démontrant les propriétés immunomodulatrices de l'IFO et de son analogue pré-activé, le G-IFO

Une première expérience sur la souris non porteuse de tumeur est faite afin de poser la preuve de concept d'immunomodulation de l'IFO. La seconde expérience se déroule chez la souris porteuse de tumeur (modèle MCA205). Une troisième expérience est réalisée chez la souris déplétée spécifiquement en LT CD4⁺ et/ou CD8⁺ afin de confirmer le rôle du SI dans l'efficacité de l'IFO à faible dose. La quatrième expérience met en évidence l'existence d'une synergie d'efficacité antitumorale avec ICB (anticorps anti-PD1).

Expérience I

Une première expérience a été réalisée chez la souris non porteuse de tumeur afin d'apporter la preuve de concept de l'immunomodulation de l'IFO (Figure 43). Due à la faible disponibilité du G-IFO, elle n'est réalisée qu'avec une escalade de dose d'IFO. Le CPM à la dose de 100 mg/kg est utilisé en tant que contrôle positif.

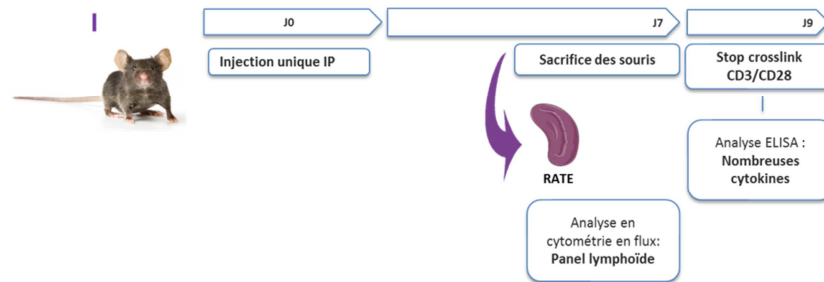


Figure 43. Détail de l'expérimentation n° I

L'expérience n° I est réalisée chez la souris naïve. Sept jours après administration IP des traitements, les souris sont sacrifiées et les rates sont récoltées afin d'identifier et quantifier les cellules lymphoïdes par cytométrie de flux. En parallèle les splénocytes sont stimulés par les anticorps anti-CD3ε plus ou moins avec costimulation avec des anticorps anti-CD28 pendant 48h à 37°C. Les surnageants sont ensuite collectés afin d'identifier et quantifier les modulations d'expression de cytokines.

Expérience II

Après une étude d'efficacité de doses croissantes d'IFO sur notre modèle d'étude, le fibrosarcome murin MCA205, les impacts de l'IFO et du G-IFO sur les cellules du compartiment lymphoïde et sur la sécrétion cytokinique sont étudiés. Le détail de l'expérimentation est présenté dans la Figure 44.

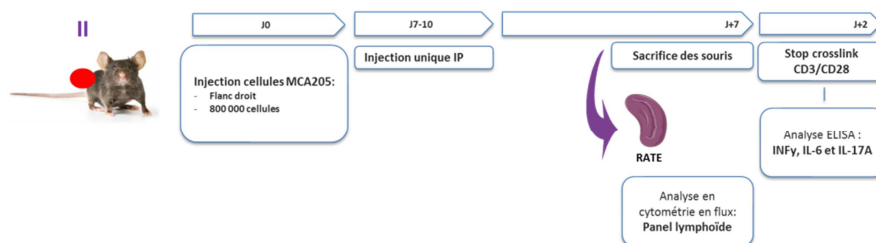


Figure 44. Méthodes d'étude pour démontrer le potentiel immunomodulateur de l'IFO et du G-IFO

L'expérimentation n° II est réalisée comme le protocole de l'expérimentation n° I mais chez la souris porteuse de tumeur (MCA205). L'injection IP des traitements est faite lorsque la tumeur atteint en moyenne un volume entre 80 et 200 mm³ soit entre 7 à 10 jours post implantation. Les cytokines INFγ, IL-6 et IL-17A sont quantifiées dans le surnageant.

Expérience III

Après sélection de la dose immunomodulatrice d'IFO, la confirmation de l'efficacité antitumorale de cette dose à travers une modulation immunitaire est faite dans un modèle de souris porteuse de MCA205 et déplétée en LT CD4⁺ et/ou en LT CD8⁺.

Expérience IV

Enfin, la synergie entre l'immunothérapie par un ICB et plus précisément par un anticorps anti-PD1 et l'IFO ou de son analogue pré-activé G-IFO, est appréciée.

A la suite à l'article, sont présentées les analyses complémentaires de l'article: analyse de l'infiltrat intratumoral immunitaire et du compartiment myéloïde (Figure 45). Enfin les résultats d'immunomodulation de l'IFO et du G-IFO seront discutés.

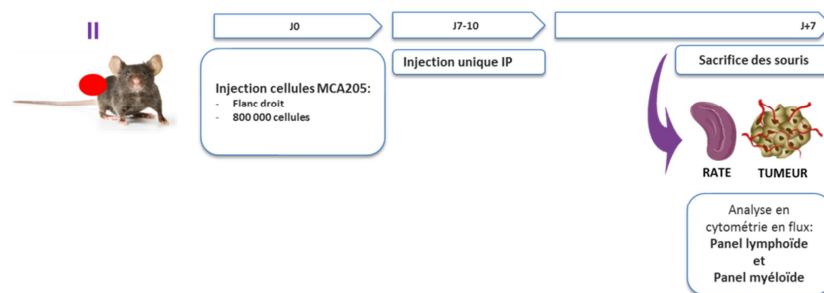


Figure 45. Complément de l'expérimentation II

L'expérimentation n°II est complétée par une étude du compartiment myéloïde par cytométrie en flux. Les tumeurs sont également récoltées pour réaliser une analyse des compartiments lymphoïde et myéloïde par cytométrie en flux.

2. Publication 2 “The two sides of Oxazaphosphorines: Dose-dependent tuning between immune and cytotoxic effects, a gate for immune checkpoint blockers synergy”

Oxazaphosphorines combined with immune checkpoint blockers: Dose-dependent tuning between immune and cytotoxic effects

Julia Delahousse^{1,2}, Charles Skarbek¹, Mélanie Desbois⁴, Jean-Luc Perfettini⁵, Nathalie Chaput^{3,4,6,*}, Angelo Paci^{1,2,3,*}

¹Vectorology and Anticancer Therapies, UMR 8203 CNRS, Gustave Roussy, Villejuif, F-94805, France

²Service de Pharmacologie, Département de Biologie et Pathologie médicales, Gustave Roussy, Villejuif, F-94805, France

³University Paris-Saclay, Faculté de Pharmacie, Chatenay-Malabry, F-92296, France.

⁴Laboratory of Immunomonitoring in Oncology, UMS 3655 CNRS/US 23 INSERM, Gustave Roussy, Villejuif, France

⁵Cell Death and Aging Team, INSERM U1030, Gustave Roussy, Villejuif, F-94805, France

⁶Laboratory of Genetic Instability and Oncogenesis, Unité Mixte de Recherche 8200 Centre National de la Recherche Scientifique, University Paris-Sud and Gustave Roussy, Villejuif, France.

*NC and AP contributed equally to this work.

Correspondence and reprint request to Professor PACI Angelo, 114 rue Edouard Vaillant, 94800 Villejuif, France.

E-mail address: angelo.paci@gustaveroussy.fr; Phone: +33 1 42 11 47 30

Abstract (350 mots max) 348 mots

Background

Oxazaphosphorines (cyclophosphamide CPA, ifosfamide IFO) are major alkylating agents of polychemotherapy protocols but limiting their toxicity and increasing their efficacy could be of major interest. Oxazaphosphorines are prodrugs that require a metabolic activation by cytochrome P450 (CYP). CPA is metabolized by CYP2B6 leading mainly (>80%) to the phosphoramidate mustard while only 10 to 50% of IFO is transformed in the alkylating entity, the isophosphoramidate mustard, and 50 to 90 % of IFO release chloroacetaldehyde (CAA), a nephrotoxic and neurotoxic metabolite. Geranyloxy-IFO (G-IFO) was reported as a pre-activated IFO to bypass the toxic pathway giving directly the isophosphoramidate mustard without CYP metabolization. The similar structure of CPA and IFO and the similar metabolic balance of CPA and G-IFO lead us to explore immunomodulatory effect of these components *in vivo* in mice and to investigate the combination of these three oxazaphosphorines with immune checkpoint blockers (ICB).

Methods

The investigation of immunomodulatory properties of IFO and G-IFO compared to CPA has been conducted through immune cells phenotyping by flow cytometry and analysis of the cytokine profile of T cells after *ex-vivo* re-stimulation. T cell-mediated antitumor efficacy was confirmed in CD4⁺ and CD8⁺ T cells-depleted mice. Combination of oxazaphosphorines with anti-PD1 antibody has been studied in MCA205 tumor-bearing mice.

Results

Studies on MCA205 mouse model have demonstrated a dose-dependent effect of IFO and G-IFO on T cell immunity. Particularly these components favored Th1 polarization when used at low dose (150 and eq. 100 mg/kg respectively). Antitumor activity at low dose was abolished in mice depleted in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. G-IFO at low dose (eq. 100 mg/kg) in combination with anti-PD-1 antibody showed high synergistic antitumor efficacy compared to IFO.

Conclusion

Oxazaphosphorines are thus characterized by a dual mechanism of antitumor action; low-dose schedules should be preferred in combination with ICB, while dose escalation finds better utility in polychemotherapy protocols where a conventional direct cytotoxic anticancer effect is needed. G-IFO, the new oxazaphosphorine drug, have shown a better metabolic index compared to IFO as its metabolization gives mainly the alkylating mustard as CPA (and not IFO) and a best potential in combination with ICB.

Introduction

Oxazaphosphorines (Oxaza; i.e. cyclophosphamide CPA, ifosfamide IFO) are antineoplastic agents widely used to treat various cancers from soft-tissue tumors to lymphomas and are still the corner stone of several polychemotherapy protocols. They are major alkylating agents of polychemotherapy protocols but limiting their toxicity and increasing their efficacy could be of major interest. For IFO, dose regimens range from 1 000 to 12 000 mg/m²/day in humans (128, 129) and 200 to 300 mg/kg in tumor-bearing mice (130) when used as cytotoxic agent; for CPA dose range from 200 to 1 000 mg/m²/day in human (131-133) and from 100 to 250 mg/kg in tumor-bearing mice (134-136). IFO is an isomeric form of CPA and differs chemically from CPA in the localization of one of the chloroethyl group leading to a different metabolization. Oxaza are prodrugs that require a metabolic activation by specific liver cytochrome P450 (CYP). CPA is mainly metabolized by CYP2B6 leading to 4-HO-CPA, the key intermediate for alkylating mustard which reacts with DNA. The bioactivation of IFO by CYP3A4 produces 4-hydroxy derivative (4-HO-IFO), a key intermediate for isophosphoramidate mustard release displaying cytotoxicity by DNA crosslinks. However, only 10 to 50% of IFO is transformed in this key entity, and 50 to 90 % of IFO release chloroacetaldehyde (CAA), a nephrotoxic and neurotoxic metabolite (137) (17). These toxicities are increased in high-dose setting; indeed there is a dose-response relationship for IFO, i.e., higher the dose lead to higher IFO plasma exposure (29). Several high-dose IFO protocols (HD IFO) were studied. Le Cesne et al. have studied the efficacy ("rescue") and safety profile of HD IFO administration (cumulative dose of 12 000 mg/m²) in patients with advanced refractory soft-tissue sarcomas which have not responded at standard doses of IFO: this study has demonstrated efficacy (20 patients out of 36 showed partial or stable disease response), but with major toxicities (30). In pediatrics, the incidence of toxicities is high mostly in HD protocols (23). A clinical study in children with osteosarcoma receiving after

HD IFO (cumulative dose of 14 000 mg/m²) has shown an increase of 30 % of progression-free survival, but with severe nephrotoxicities in a quarter of patients (31). The need to improve IFO therapeutic index is an important clinical issue. Pre-activated Oxazaphosphorines (X-Oxaza, patent EP3143032A1), based on the link to terpene chains, have been designed in order to bypass the metabolic pathways (54). As shown in Figure 1, geranyloxy-IFO (G-IFO) leads to release 4-HO-IFO without releasing CAA (Figure 1). Skarbek et al. have shown the cytotoxicity of G-IFO on a large panel of tumor model in vitro, validating the proof of concept of pre-activation (112). As CPA and G-IFO give high levels (66 to 80%) of the alkylating entity compared to IFO (10 to 50%), and CPA is known for its immunomodulatory properties, we decided to explore the immune properties of IFO and G-IFO compared to CPA.

Tumor microenvironment plays an important role in tumor development. Indeed, microenvironment cells such as endothelial cells and stroma, immune cells may contribute to both tumor progression or tumor regression (138). Tumor cells may also provide mediators of immune escape through the secretion of immunosuppressive factors such as transforming growth factor-beta (TGF- β) and through the expression of ligands for immune checkpoints establishing an immune tolerant landscape. Targeting the tumor cell environment seems to be a promising strategy to increase efficiency of “old” chemotherapy agents. Immune checkpoint blockers (ICB) such as anti-PD-1, anti-PD-L1 and anti-CTLA-4 monoclonal antibodies (mAbs) have also proved their efficacy in many tumors such as melanoma (139) and non-small-cell lung cancer treatment (140). Today, the combination of immunotherapy and conventional cancer therapy provides new and innovative antitumor strategies (141) (142).

Conventional antitumor chemotherapy is described as direct cytotoxic agent used for targeting the DNA integrity (alkylating agents), the DNA and RNA synthesis (antimetabolites and cytotoxic antibiotics), the DNA replication (topoisomerase inhibitors) or cytosolic compounds (anti-microtubule agents). In addition to this direct cytotoxicity, several studies also revealed that conventional antitumor chemotherapies could modulate antitumor immune-response (142). Indeed, some conventional chemotherapies can stimulate the immune system by depleting regulatory T cells (Treg), by subverting immunosuppressive mechanisms or exerting immunostimulatory activities (143). CPA has a direct cytotoxicity through DNA-binding at conventional doses and an indirect antitumor effect at low dose through the activation of antitumor immunity. Many reports have demonstrated the immunomodulatory effects of CPA through different mechanisms such as Treg cells depletion or inactivation (144-146) (147), (148), (149), the polarization of T cells toward Th1 and Th17 (150) (151),

the modulation of myeloid cells toward inflammatory cells (152). More recently, it has been suggested that induction of pathogenic Th17 cells after CPA treatment was the consequence of the modulation of intestinal microbiota composition in tumor-bearing mice (153). Studies have described the enhancement of antitumor efficacy for CPA combined with immunotherapy through induction of immunogenic tumor death (94, 154). Moreover, clinical studies have suggested that low myelosuppression in IFO-treated patients may have advantages over CPA in combination therapy (8, 155, 156). Very few publications deal with the influence of IFO on the immune system compared to CPA and most *in vitro* studies have reported a negative impact of IFO on immunity. Lind et al. showed that IFO and its metabolites (4-HO-IFO and CAA) decrease the intracellular-glutathione (GSH) amount in patient's lymphocytes treated with IFO at 5 g/m² (157). GSH is the major intracellular thiol reductant that acts as protector against oxidative injury, thus GSH decrease affects survival, proliferation and functions of lymphocytes. Issels et al. confirmed that IFO could diminish GSH in lymphocyte *in vitro* (99) and Multhoff and colleagues showed that IFO could decrease the cytotoxic activity of T cells (101). More recently, Kuppner et al. suggested that IFO could decrease IFN γ -production by T cells (103). These *in vitro* results seem in contradiction with data accumulated with CPA demonstrating an activation of T cell immunity. To our knowledge no study has explored the immunomodulatory activity of IFO *in vivo*.

In the current study, we studied the capacity of IFO and G-IFO to modulate T cell polarization in tumor-bearing mice. We demonstrated that low dose of IFO and G-IFO i) favor Th1 polarization, ii) induce T cell-dependent antitumor effect in mice and iii) increase the efficacy of anti-PD-1 antibodies in tumor-bearing mice. At high dose IFO and G-IFO induced lymphopenia and synergy with anti-PD-1 was completely lost. Altogether low dose of IFO and G-IFO could represent an efficient strategy to increase response rate in patients treated with immune checkpoint inhibitors.

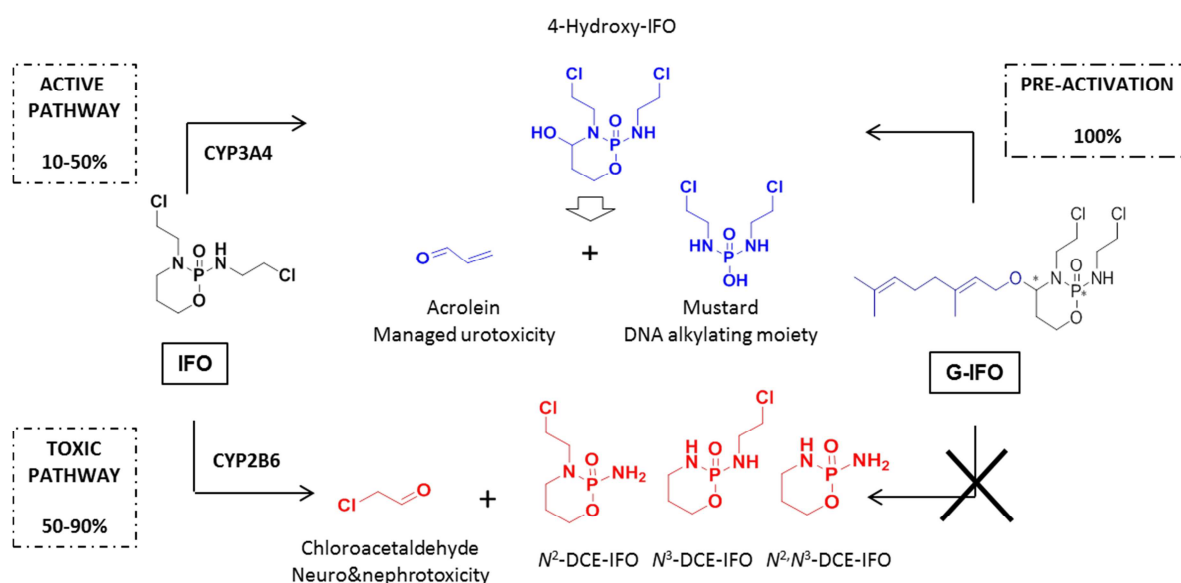


Figure 1. Pre-activation of IFO to bypass the toxic pathway. Metabolism of IFO and G-IFO leading to the intermediate metabolite 4-hydroxy-IFO and others metabolites including toxic metabolite (chloroacetaldehyde).

Materials and Methods

Chemical agents and reagents

Cyclophosphamide (CPA) (Endoxan[®]; Baxter) and ifosfamide (IFO) (Holoxan[®]; Baxter) were provided by Gustave Roussy Cancer Campus Grand Paris. Pre-activated analog of IFO, Geranyloxy-IFO (G-IFO) was synthesized with 99% purity as previously described in (54). For *in vivo* studies, CPA and IFO were dissolved in NaCl 0.9% or DMSO/Tween 80/NaCl 0.9% (5/5/90,v/v/v). G-IFO was dissolved in DMSO/Tween 80/NaCl 0.9% (5/5/90,v/v/v). Monoclonal anti-CD4 (GK1.5), anti-CD8 α (53-6.72), anti-PD1 (RMP1-14) and their isotype control rIgG2a (2A3) for *in vivo* experiments were purchased from BioXCell (West Lebanon, NH, USA) and dissolved in Phosphate-buffered saline (PBS). Monoclonal antibodies (mAbs) used for flow cytometry and immunohistochemistry analysis are described in Table S1.

Mice and tumor cell line

7-8 weeks-old female C57BL/6 mice (mean body weight, 20g) were purchased from Harlan Laboratories (Gannat, France). Animals were used in pathogen-free conditions. MCA205 fibrosarcoma tumor cell line (syngenic from C57Bl/6 mice) was kindly provided by Dr Yamazaki Takahiro (INSERM U1015, Gustave Roussy, Villejuif, France). They were harvested at 37°C under 5% CO₂ in Gibco[™] RPMI 1640 medium (Paisley, UK)

supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Paisley, UK) and 2mM L-glutamine (Invitrogen, USA). All animal experiments were carried out in compliance with French and European laws and regulations and by the CEEA26 Ethic committee and the ministry of national education, higher education and research and carried out under conditions established by the European Community (Directive 2010/63/2015-038).

Tumor model and tumor inoculation in mice

8.10^5 tumor cells were inoculated subcutaneously (s.c.) in the right flank of C57Bl/6 mice on D0. Mice received a single intraperitoneal (i.p.) injection of CPA at 100 mg/kg, IFO at 100, 150, 200 or 300 mg/kg, vehicle or G-IFO at eq. uimolar dose of IFO 50, 100 or 150 mg/kg when the tumor volume reach a size between 50 and 500 mm³ ($V \text{ (mm}^3\text{)} = \text{width}^2 \text{ (mm}^2\text{)} \times \text{length (mm)}/2$). For T cell depletion, mice received 200 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ i.p. injections of anti-CD8 α (clone 53-6.72) and/or anti-CD4 (clone GK1.5) or their isotype control Rat IgG2a (clone 2A3) on Days(D)-3, D0, D+3 then once a week, and IFO or control on D7. For combination between chemotherapy (IFO, CPA) and anti-PD1 mAbs, mice received IFO, CPA or vehicle on D7 then 250 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ i.p. injections of anti-PD1 mAbs (clone RMP1-14) or its isotype control Rat IgG2a (clone 2A3) on D9, D12 and D15. Regarding study for combination between chemotherapy (G-IFO) and anti-PD1 mAbs, mice received G-IFO or vehicle on D9 then 200 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ i.p. injections of anti-PD1 mAbs (clone RMP1-14) or its isotype control Rat IgG2a (clone 2A3) on D12, D15 and D19. Tumor volume was followed-up three times a week by measuring the length and width using a caliper. In order to normalize tumor measurements for each day VT_{Dx} to VT_{Di} (VT_{Dx}/VT_{Di}) ratio was calculated; VT_{Di} corresponds to the tumor volume the day of treatment initiation and VT_{Dx} corresponds to the tumor volume on each measurement day for each mouse.

Flow cytometry analysis

Female C57BL/6 mice of 7 to 8 weeks were randomly assigned to the different treatment groups. Six groups of mice were evaluated including an untreated control group receiving the vehicle and four to five treated groups with IFO at the dose of 100, 150, 200 and 300 mg/kg and CPA at 100 mg/kg. Both drugs were dissolved in a solution of NaCl 0.9%. Adding groups treated with G-IFO at the equimolar dose of IFO 50, 100 and 150 mg/kg, vehicle, CPA, IFO and G-IFO were dissolved in a solution of DMSO/Tween 80/NaCl 0.9% (5/5/90,v/v/v). The administrations were performed by a single i.p. injection with a volume of 20mL/kg or 10mL/kg when adding G-IFO groups. Seven days post treatment, the mice were sacrificed,

spleens and tumors were collected. After lysis of red blood cells with ammonium chloride splenic viable cells were quantified with Trypan Blue with Vi-CELL XR (Beckman Coulter). Briefly, tumor dissociation was done with GentleMACS™ Dissociator after adding ADNase (260913, Millipore) and ligase (5401127001, Sigma) to weighed and cut tumors. Tumor cells were incubated for 40 min at 37°C under stirring and then quantified with Trypan Blue with Vi-CELL XR (Beckman Coulter). Before staining, Fcγ-receptors were blocked for 15 min at 4°C using anti-CD16/32 functional grade purified antibodies (eBioscience, Paris, France). Cells were incubated for 30 min at 4°C with antibodies for cell surface staining. For FoxP3 staining, cells were fixed and permeabilized after cell surface staining according to the FoxP3 kit protocol (eBioscience, Paris, France). Samples were acquired on 10-colors Gallios cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France). Analyses were performed using Kaluza software 1.3 (Beckman Coulter). Two different panels were used to identify immune cells. First leucocytes were identified by the use of FITC-conjugated anti-mouse CD45. T and B lymphocytes were identified using APC-Cy7-conjugated anti-mouse CD3 and BV421-conjugated anti-mouse CD19 respectively. CD4⁺ and CD8⁺ T cells were separated using PE-Cy7-conjugated anti-mouse CD4 and APC-R700-conjugated anti-mouse CD8a staining among CD3 positive cells, respectively. Treg cells were stained using APC-conjugated anti-mouse FoxP3 staining among CD3⁺CD4⁺ T cells (Table S1).

<i>Antigen</i>	<i>Species</i>	<i>Clone</i>	<i>Fluorochrome</i>	<i>Supplier</i>
CD45	mouse	30-F11	FITC	BD biosciences
CD3e	mouse	145-2C11	APC-Cy7	BD biosciences
CD4	mouse	RM4-5	PC7	BD biosciences
CD8a	mouse	53-6.7	APC-R700	BD biosciences
FoxP3	mouse	FJK-16s	APC	eBioscience
CD25	mouse	PC61	PE	BD biosciences
CD19	mouse	6D5	BV421	BioLegend

Supplementary Table S1. Antibodies used for flow cytometry experiments

Cytokine assay

From spleen cell suspension, a total of $2 \cdot 10^5$ cells per well were incubated in 96 well Nunc MaxiSorp® plates (eBioscience) precoated with anti-CD3ε mAbs (clone 145-2C11, 10μg/mL; eBioscience) and/or anti-CD28 mAbs (clone 37.57, 2μg/mL; BD Pharmingen).

The supernatants were assayed after 48 hours of incubation at 37°C under 5% CO₂ using Cytokine concentrations were quantified in the supernatant using a Bio-Plex™ Mouse Cytokine Standard 23-Plex, Group I Assay (bio rad, M60009RDPD). The panel was comprised of the following cytokines and chemokines: eotaxin, Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF), Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF), interferon gamma (IFN γ), interleukin(IL)-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17A, Keratinocyte Chemoattractant (KC), Macrophage Chemotactic Protein-1 (MCP-1), Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1alpha (MIP-1 α), MIP-1 β , Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted (RANTES) and Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α). Results were analyzed using Bio-Plex Manager Software V 6.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Selection of cytokines and chemokines that were significantly regulated after IFO treatment in mice allows us to reduce the monitoring to IFN γ , IL-17A and IL-6. These three cytokines were then quantified using mouse IL-17A ELISA Ready-SET-Go® (eBiosciences), Mouse IFN γ ELISA Set (BD Biosciences) and Mouse IL-6 ELISA Set (BD Biosciences).

Statistical analysis

Data were analyzed with Microsoft Excel® (Microsoft Co., Redmont, WA, USA), Prism™ 5.0 and 8.0 software (GraphPad San Diego, CA, USA). All results are expressed as mean \pm standard error of mean or median with interquartile. Statistically significant differences were analyzed using the non-parametric Mann-Whitney test or the non-parametric Kruskal-Wallis test to compare more than two independent groups, two-way ANOVA test to compare groups with two independent variables coupled to Geisser-Greenhouse for correction of violation of sphericity in repeated measures. No adjustment for multiple comparisons was made with small populations ($n \leq 6$) because of the exploratory component of the analyses. A p-value smaller than 0.05 was considered to be statistically significant. Significant p values were annotated as follows *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

Results

Low dose of IFO could delay tumor growth through immunomodulatory effect.

The effect of escalating doses of IFO on antitumor response and immune response was explored. Its isomeric form, CPA, was used at 100 mg/kg since previous study have demonstrated its immune-mediated antitumor response at this dose.

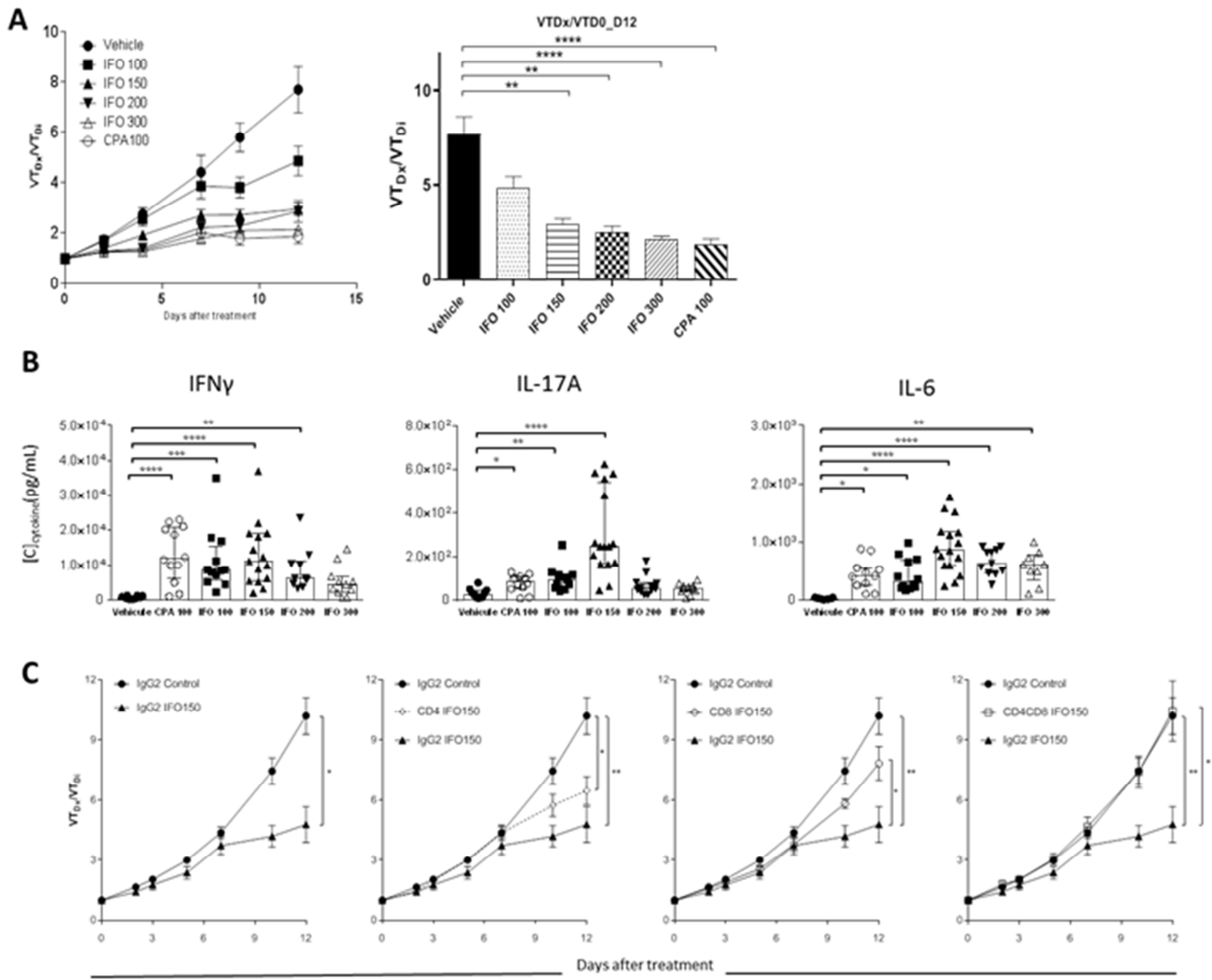
Antitumor activity of escalating single i.p. injection of IFO (100, 150, 200 and 300 mg/kg) or of CPA (100 mg/kg) in the immunocompetent MCA205-bearing C57Bl/6 mice was assessed. As shown in Figure 2A and as expected, significant reduction of the tumor growth was observed for CPA at 100 mg/kg; for IFO we observed a delay of tumor growth from low doses (100 and 150 mg/kg) to higher doses (200 and 300 mg/kg).

In a previous work, we have shown that CPA at 100 mg/kg could increase the TCR-driven cytokine release in naive and tumor-bearing mice (35). We carried out similar experiments in mice treated with escalating doses of IFO in naive mice and in MCA205-bearing mice.

In naïve mice, IFN γ , IL-17A and IL-6 were significantly increased after treatments. As expected the vehicle displayed weak cytokine secretions, in mice treated with CPA at 100 mg/kg, TCR-driven IFN γ , IL-17A and IL-6 was significantly increased as previously published. Regarding the IFO groups (100, 150 and 200 mg/kg), a significant increase of TCR-driven IFN γ , IL-17A and IL-6 was also observed after CD3 ϵ + CD28 stimulation (Supplementary Figure S1).

As for naive mice, we examined T cell polarization after TCR engagement in MCA205 tumor-bearing mice. The known cytotoxic dose of IFO i.e. 300 mg/kg (130) was added to the experiment in tumor-bearing mice. As shown in Figure 2C, IFO 200 and 300 mg/kg failed to induce IL-17A and IFN γ TCR-driven cytokines, only TCR-driven IL-6 remained highly secreted (Figure 2B). These results are reminiscent of the T cell counts diminution (Supplementary Figure S2) as well as decrease of T cell proportion (Supplementary Figure S3) observed at higher doses. For IFO at 100 and 150 mg/kg where no T cell counts decrease was observed in tumor-bearing mice (Supplementary Figure S2), significant secretion of TCR-driven IL-17A, IFN γ and IL-6 were detected after CD3 ϵ (Figure 2C) and after CD28 co-stimulation (data not shown). Unexpectedly IFO 150 mg/kg induced more TCR-driven IL-17 and IL-6 than CPA 100 mg/kg. IL-6 has been implicated in Th17 differentiation (37), thus higher IL-6 in IFO at 150 mg/kg could explain the high Th17 differentiation compared to CPA.

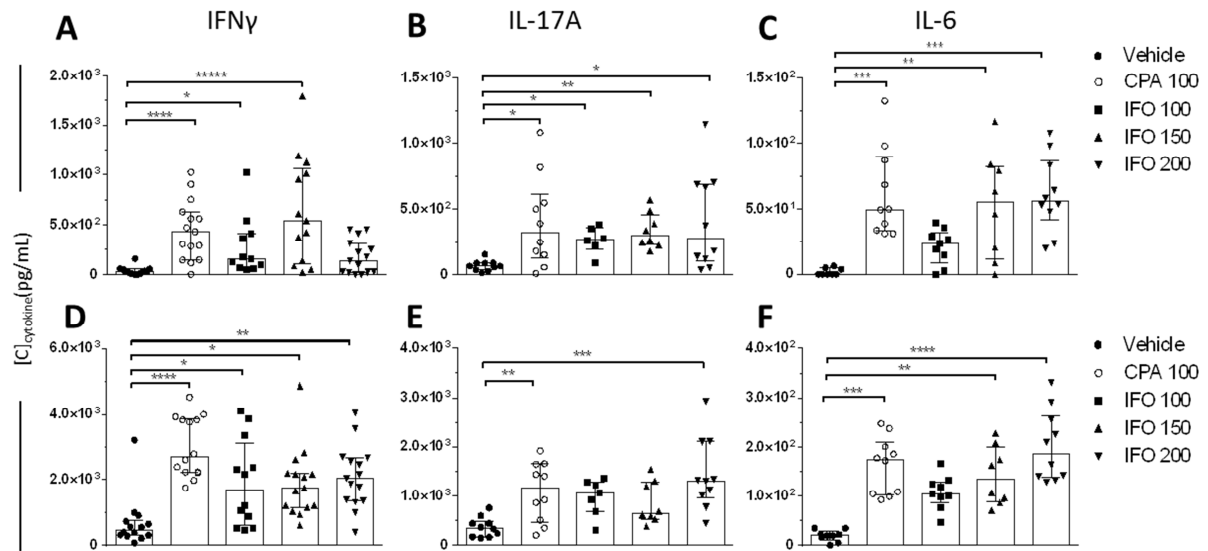
Complementary study has been performed in order to confirm the T cells involvement in antitumor activity for IFO at low dose. MCA205-bearing mice were depleted in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and treated with a single i.p. injection of IFO at 150 mg/kg. As shown in Figure 2D significant reduction of the tumor growth was observed for non-depleted mice; for CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells depleted mice, we observed a decrease of the antitumor effect. Finally, antitumor efficacy of IFO 150 mg/kg was completely abolished in mice depleted with both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Altogether these data indicated that at low dose of IFO (150 mg/kg), T cells are mandatory to observe antitumor immune-mediated effect.



2 Figure 2. Low dose of IFO could delay tumor-growth in mice through
3 immunomodulatory effect. MCA205 tumor-bearing mice were treated with a single i.p. injection
4 of IFO (100 ; 150 ; 200 ; 300 mg/kg) or CPA (100 mg/kg) or vehicle (NaCl 0.9%). (A) Tumor volume
5 was measured every 2-3 days, VT_{Di} corresponds to the tumor volume the day of treatment initiation
6 and VT_{Dx} correspond to the tumor volume. VT_{Dx} to VT_{Di} ratio (VT_{Dx} / VT_{Di}) is depicted from two
7 pooled experiments (n=8 to 12 mice per group). (left) Kinetic tumor growth and (right) VT_{D12} / VT_{Di}
8 are depicted. Graphs depict the mean \pm SEM. Statistical analysis using 2ways ANOVA test indicated
9 significant differences at 95% CI. *, p<0.05; **, p<0.01; *, p<0.001; ****, p<0.0001. (B) Seven**
10 days after treatment, mice were sacrificed and spleens were collected and incubated with anti-CD3 ϵ
11 for 48h at 37°C. Supernatants were harvested and concentrations of (left panel) IFN γ , (middle panel)
12 IL-17A and (right panel) IL-6 were analyzed by ELISA. Graphs depict data from two pooled
13 experiments (6-8 mice per experiment). Medians with interquartile are shown. Statistical analysis
14 using Kruskal-Wallis test indicated significant differences at 95% CI. *, p<0.05; **, p<0.01; *,**
15 p<0.001; **, p<0.0001. (C) MCA205 tumor-bearing mice were depleted in CD4⁺ and/or CD8⁺ T**
16 cells, and treated with a single i.p. injection of IFO 150 mg/kg; VT_{Dx} / VT_{Di} according treatment

17 groups from pooled mice (n=6 per group) is depicted. Graph depicts the mean \pm SEM. Statistical
 18 analysis using 2ways ANOVA test indicated significant differences at 95% CI. No adjustment for
 19 multiple comparisons was made because of the exploratory component of the analyses. *, $p<0.05$; **,
 20 $p<0.01$; ***, $p<0.001$; ****, $p<0.0001$.

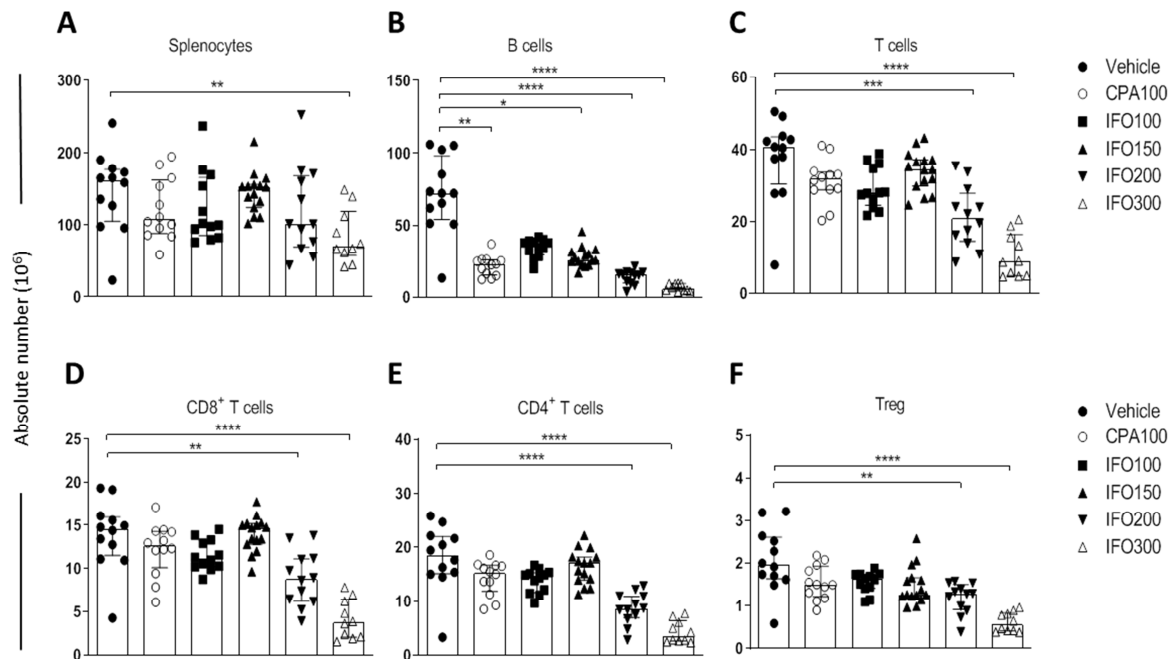
21
 22



23

24 **Supplementary Figure S1. IFO and CPA induce IFN γ , IL-17A and IL-6 production in**
 25 **naive mice.** C57Bl/6 were injected with a single i.p. injection of IFO (100 or 150 or 200 mg/kg) or
 26 CPA (100 mg/kg) or vehicle (NaCl 0.9%). Seven days later, mice were sacrificed and spleens were
 27 collected and incubated with anti-CD3 ϵ (A-C) or anti-CD3 ϵ + anti-CD28 (D-F) for 48h at 37°C.
 28 Supernatants were collected and the concentrations of IFN γ (A,D), IL-17A (B,E) and IL-6 (C,F) were
 29 determined by ELISA. Graphs depict data from three (A,D) or two (D,E,C,F) pooled experiments with
 30 n= 5 mice per experiment. Median and range are shown. Statistical analysis using Kruskal-Wallis test
 31 indicated significant differences at 95% CI. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; ****, $p<0.0001$.

32



34

35 **Supplementary Figure S2. Dose-dependant T cell depletion in the spleen of tumor-**

36 **bearing mice treated with IFO.** C57Bl/6 were injected with a single i.p. injection of IFO (100,

37 150, 200 and 300 mg/kg) or CPA (100 mg/kg) or vehicle (NaCl 0.9%). Seven days later, mice are

38 sacrificed, and spleens were collected. Lymphocytes were detected in the spleen after mechanic

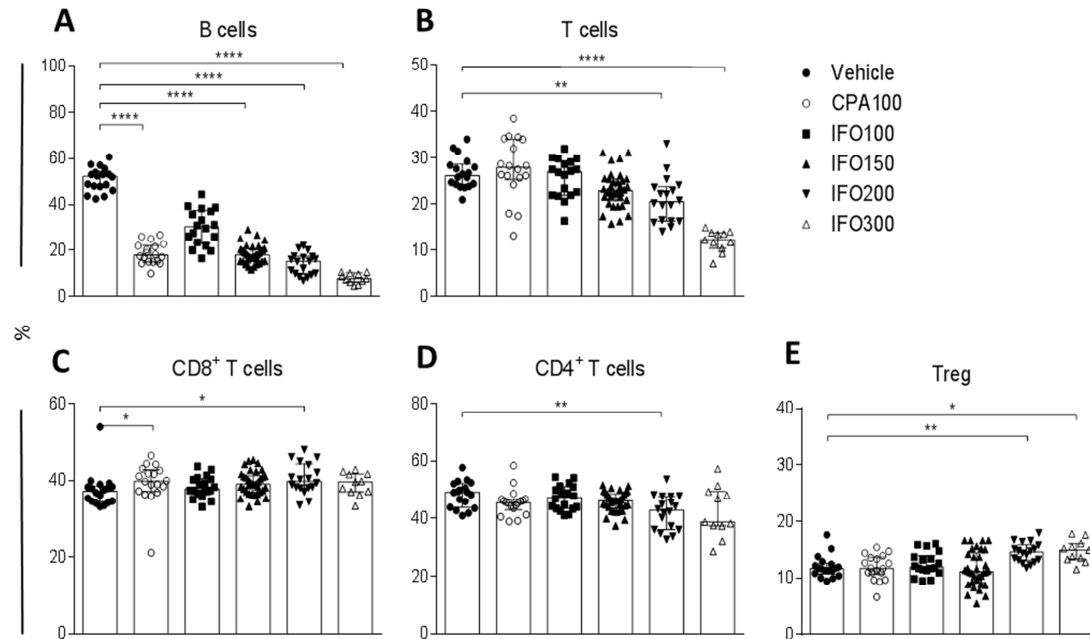
39 dissociation using flow cytometry methods. Absolute numbers of (A) splenocytes, (B) B cells, (C) T

40 cells, (D) A CD8⁺ T cells, (E) CD4⁺ T cells, (F) Treg cells. Graphs depict data from two pooled

41 independent experiments (6 mice per experiment). Median values with interquartile are presented.

42 Statistical analysis using Kruskal-Wallis test indicated significant differences at 95% CI. *, p<0.05;

43 **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001.



44

45 **Supplementary Figure S3. Dose-dependant reduction of T cells proportion in the spleen**

46 **of tumor-bearing mice treated with IFO.** C57Bl/6 were injected with a single i.p. injection of
 47 IFO (100, 150, 200 and 300 mg/kg) or CPA (100 mg/kg) or vehicle (NaCl 0.9%). Seven days later,
 48 mice are sacrificed, and spleens were collected. Lymphocytes were detected in the spleen after
 49 mechanic dissociation using flow cytometry methods. (A) Percentage of B and (B) of T cells among
 50 CD45⁺ cells. (C) Percentage of CD8⁺ T and (D) CD4⁺ T cells among CD3⁺ T. (E) Percentage of Treg
 51 cells among CD4⁺ T cells. Graphs depict data from three pooled independent experiments (6-8 mice
 52 per experiment). Median values with interquartile are presented. Statistical analysis using the
 53 Kruskal-Wallis test indicated significant differences at 95% CI. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001;
 54 ****, p<0.0001

55 **Less toxic pre-activated IFO (G-IGO) revealed immunomodulatory properties**

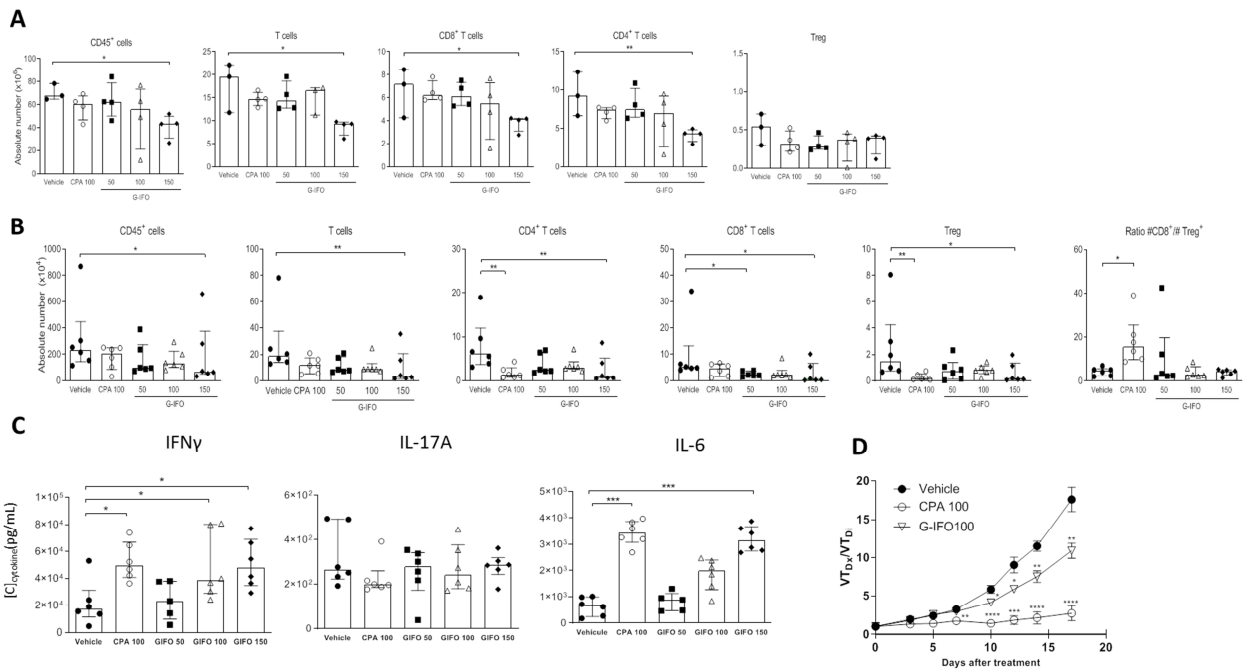
56

57 Results on immune-mediated antitumor response of IFO at low dose led us to study
58 immunomodulatory properties on the less toxic pre-activated IFO derivative, G-IFO.

59 Pharmacokinetic study has shown that G-IFO could release higher quantity of HO-IFO than
60 IFO (112). By consequence, we expected to have a growth tumor delay at lower doses of G-
61 IFO compared IFO. The dose of G-IFO is defined as the equivalent molar dose of IFO (eq. X
62 mg/kg). For instance, 40 mg/kg of G-IFO is equivalent to 25 mg/kg of IFO as the molar
63 masses are 419 g/mol for G-IFO and 261 g/mol for IFO. We assessed the antitumor activity of
64 single i.p. injection of G-IFO at eq. 100 mg/kg in the immune competent MCA205-bearing
65 C57Bl/6. The dose of G-IFO at eq. 100 mg/kg did not show cytotoxicity on T cell populations
66 in spleens (Figure 3A) and in tumor (Figure 3B) compared to higher dose of G-IFO (eq. 150
67 mg/kg). As shown in Figure 3D, significant delay of the tumor growth was observed for the
68 three molecules with a lower tumor growth delay for G-IFO compared to CPA 100 mg/kg.
69 These primarily data suggest that G-IFO is able to delay tumor growth even with a single low
70 dose.

71 As for CPA and IFO 150, we investigated the TCR-driven cytokine release in MCA205-
72 bearing mice for the escalating doses of G-IFO. As shown in Figure 3B, G-IFO eq. 150 mg/kg
73 induced high levels of IL-6 but poor secretion of IFN γ whereas G-IFO eq. 100 mg/kg favored
74 IFN γ secretion i.e. Th1 polarization. No significant IL-17 secretion could be observed in these
75 experiments with G-IFO.

76 Altogether, G-IFO at eq. 150 mg/kg was induced T cell depletion probably limiting Th1
77 accumulation while G-IFO eq. 100 mg/kg showed an antitumoral activity, did not affect the
78 numbers of T cells and demonstrated an increase of IFN γ and IL-6 secretions. Therefore, we
79 decided to select G-IFO at eq. 100 mg/kg as the immunomodulatory dose.



81

82 **Figure 3. Low doses of G-IFO promoted T cell immunity and delayed tumor-growth in**

83 **mice.** MCA205 tumor-bearing mice were treated with a single i.p. injection of G-IFO (eq. 100

84 mg/kg) or CPA (100 mg/kg) or vehicle (DMSO/Tween 80/NaCl 0.9% (5/5/90,v/v/v)). (A) Seven days

85 later, mice are sacrificed and spleens were collected. Lymphocytes were detected in the spleen after

86 mechanic dissociation using flow cytometry methods. Absolute number of splenocytes, T cells, CD8⁺

87 T cells, CD4⁺ T cells and Treg cells. Graphs depict data from one experiment (n=3-4 mice/group). Median

88 values with interquartile are presented. (B) Seven days later, mice are sacrificed and tumors

89 were collected. Lymphocytes were detected in the tumor after mechanic dissociation using flow

90 cytometry methods. Absolute number of splenocytes, T cells, CD8⁺ T cells, CD4⁺ T cells, Treg cells

91 and ratio CD8⁺ T cells/Treg. Graphs depict data from one experiment (n=6 mice/group). Median

92 values with interquartile are presented. (C) Seven days after treatment, mice were sacrificed and

93 spleens were collected. Splenocytes were incubated with anti-CD3 ϵ for 48h at 37°C. Supernatants

94 were harvested and concentrations of (left panel) IFN γ , (middle panel) IL-17A and (right panel) IL-6

95 were analyzed by ELISA. Graphs depict data from one experiment (n=6 mice/group). Medians with

96 interquartile are shown. (D) Tumor volume was measured every 2-3 days, VT_{Di} corresponds to the

97 tumor volume the day of treatment initiation and VT_{Dx} correspond to the tumor volume. VT_{Dx} to

98 VT_{Di} ratio (VT_{Dx} / VT_{Di}) is depicted from one experiment (n=6 mice/group). Graph depicts mean \pm

99 SEM. (A,B,C) Statistical analysis using Kruskal-Wallis test indicated significant differences at 95%

100 CI. (D). Statistical analysis using 2ways ANOVA test indicated significant differences at 95% CI.

101 (A,B,C,D) No adjustment for multiple comparisons was made because of the exploratory component

102 of the analyses. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001.

103 **Synergy between anti-PD1 antibody, Oxazaphosphorines and pre-activated**
104 **Oxazaphosphorines (X-Oxaza; i.e. G-IFO)**

105 As shown in previous studies (158-160) and as shown in Figure 4 (A-C), anti-PD1 mAbs
106 were not able to reduce tumor growth in the MCA205 tumor model.

107 No improvement of the antitumor efficacy could be observed with IFO at high dose (300
108 mg/kg) when associated to anti-PD1 mAbs (Figure 4). This observation was expected at this
109 dose because of the non-specific lymphodepletion described previously (Supp Figure S2).
110 Unexpectively IFO at the immunomodulatory dose (150 mg/kg) did not improve the
111 antitumor efficacy of IFO combined to anti-PD1 mAbs (Figure 4A). However, pre-activated
112 IFO at low dose (G-IFO eq. 100 mg/kg) highly enhanced the antitumor efficacy in
113 combination with anti-PD1 mAbs (Figure 4) and total tumor regressions were observed in
114 17% of the mice (Figure 4). Finally, the time to reach five-fold the initial volume was highly
115 delayed with G-IFO eq. 100 mg/kg + anti-PD1 mAbs compared to G-IFO eq. 100 mg/kg
116 (Figure 4C).

117

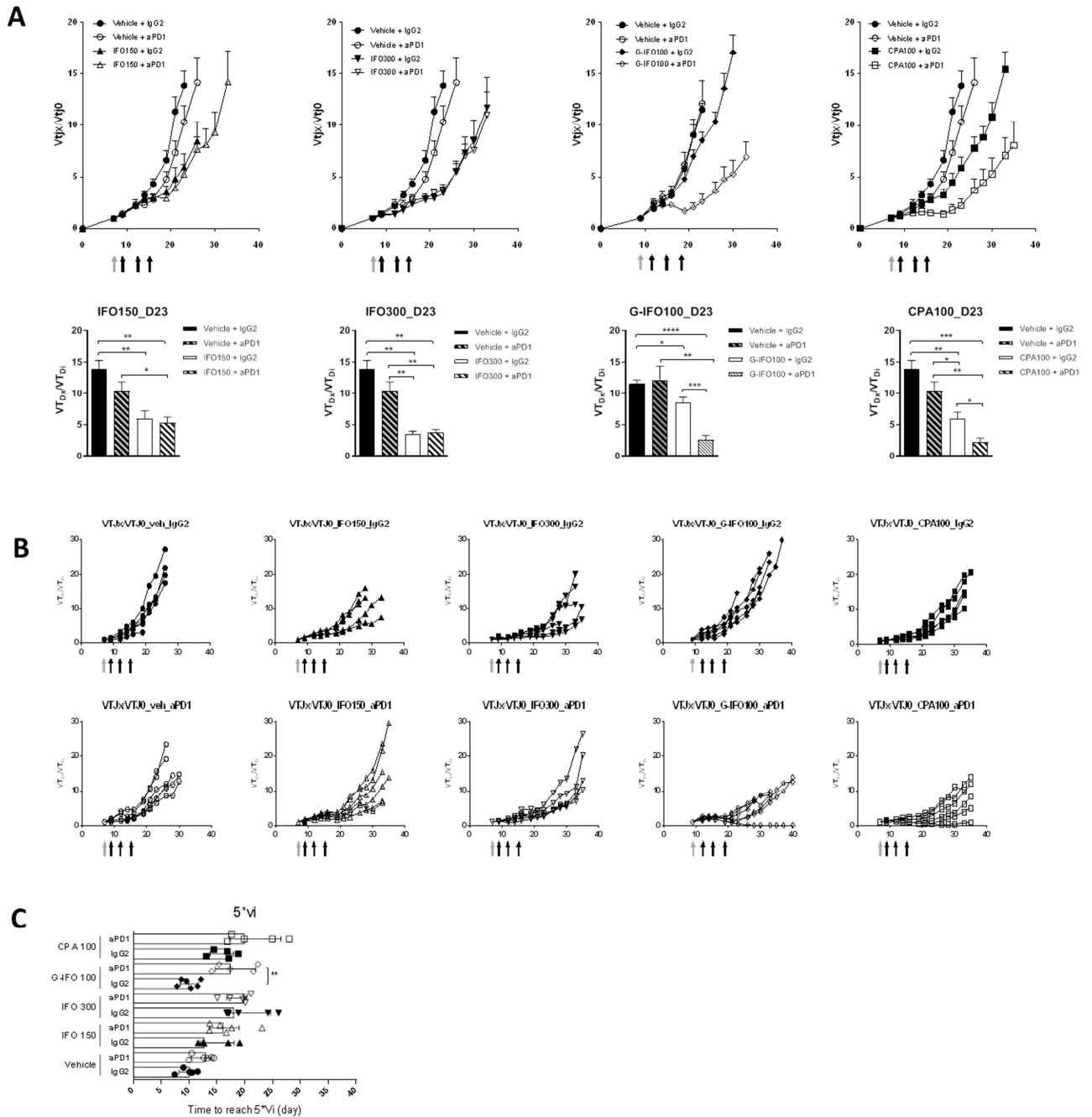


Figure 4. The combination therapy anti-PD1 mAbs and G-IFO induced potent antitumor effect. MCA205 tumor-bearing mice were injected with a single i.p. injection of IFO 150 at low dose (150 mg/kg) or at high dose (300 mg/kg), G-IFO at low dose (100 mg/kg) or vehicle. Combination with anti-PD1 Mabs or its isotype control IgG2 has been performed with three i.p. injection at 200 or 250 μ g/mouse. Grey arrow represents vehicle or chemotherapy injection; Black arrow represents IgG2 or Anti-PD1 injection. Tumor volume was measured every 2-3 days; Tumor volume was measured every 2-3 days. VTD_x correspond to the tumor volume at the day X. Mice were sacrificed when they reached boundary points, as described in Methods. (A) Graphs depicted VTD_x to VTD_i ratio (VTD_x / VTD_i) as mean \pm SEM (n=6 mice per group) for groups treated in

combination with isotype control IgG2 or anti-PD1 mAbs. (upper panel) Kinetic tumor growth and (lower panel) VTD23 / VTDi are depicted. Statistical analysis using two-way ANOVA test indicated significant differences at 95% CI. No adjustment for multiple comparisons was made because of the exploratory component of the analyses. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$. (B) Graphs depicted individual tumor growth in mouse ($n=6$ mice per group) with treatment in combination with (upper panel) isotype control IgG2 or (lower panel) anti-PD1 mAbs. (C) Graph depicted time to reach 5 fold the initial volume. Median values with interquartile are presented. Statistical analysis using Mann-Whitney test indicated significant differences at 95% CI. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

Discussion

IFO and CPA share a common metabolic pathway; they are prodrugs requiring bioactivation by hepatic enzymes leading to their respective cytotoxic metabolites, isophosphoramidate mustard and phosphoramidate mustard. Since its introduction in 1958, CPA is widely used as antitumor agent but myelosuppression gives the dose-limiting toxicity of CPA. Thereby CPA is widely used as myeloablative chemotherapy. Myeloablative activity is due to the normitrogen mustard released from CPA after hepatic metabolization into aldophosphoramidate mustard and then enzymatic oxidation into carboxyphosphoramidate mustard (161) (162). Note that normitrogen mustard is also a metabolite of melphalan similarly used as myeloablative agent. IFO, an isomeric form of CPA, has been developed in the early 1970s in order to overcome this myeloablative propriety. Unlike CPA and melphalan, IFO does not release normitrogen as one of the chloroethyl group is linked to the endocyclic nitrogen while for CPA, both chloroethyl groups are bonded to the exocyclic nitrogen; possibly explaining the absence of myeloablative activity of IFO (8). Consequently, for treatment of cancers such as soft tissue sarcomas, the use of IFO is preferred to CPA (8). Difference in toxicity between IFO and CPA, may also rely on a different metabolism rate generating 3 to 5-fold less of alkylating phosphoramidate mustard compared to CPA (163) (162), and releasing a majority of CAA which is a nephrotoxic and neurotoxic metabolite. However, the development of pre-activated analogs of IFO allowed bypassing hepatic pathway and avoiding CAA release (54). Pharmacokinetic study has confirmed the proof of concept of pre-activation of IFO; the toxic pathway is bypassed and higher level of 4-HO-IFO is released (112). We confirmed the pharmacokinetic profile of G-IFO (data not shown). As CAA is unstable metabolite and is

released at equimolar quantity with DCE-IFO, we quantified N^3 -DCE-IFO in order to quantify the toxic metabolites from this pathway. As expected, IFO released N^3 -DCE-IFO metabolite in plasma whereas G-IFO did not; as N^3 -DCE-IFO is released concomitantly with CAA, we concluded that G-IFO did not release this nephrotoxic and neurotoxic metabolite (data not shown).

In the present study, we scrutinized immune modifications following i.p. injection of IFO and G-IFO in mice. B cells population seemed very affected by oxazaphosphorines even at low dose of IFO (100 mg/kg) and G-IFO (eq. 100 mg/kg) (data not shown) underlining high sensitivity of B cells to the direct killing by these cytotoxic agents as previously reported (164). The presence or absence of tumor does not affect the fate of B cells after IFO or CPA injection. Several studies have previously showed that B cells were preferentially decreased compared to T cells after CPA treatment; our results brought evidence that IFO is also highly cytotoxic for B cells. B cell sensitivity may rely on the toxic activity of CPA on differentiating B cells compared to thymocytes resulting in a rapid reduction of B cell numbers (165). B cells decrease could be an advantage in the perspective of combination of an oxazaphosphorine with immunotherapy. Immune checkpoint inhibitors such as anti-PD-1, anti-PD-L1 and anti-CTLA-4 antibodies have frequent immune-related adverse events (irAEs). Some of these irAEs are the consequence of auto-antibodies induction and/or increase (166). Nowadays the corticoids administration is the main treatment for serious irAEs with interruption of immunotherapy in most of the case. Thus, combining immune checkpoint blockers with oxazaphosphorines could lead to less frequent reactivation of auto-reactive B cells and less autoimmune-related adverse events.

We demonstrated the dose-dependent antitumor effect of IFO with an immunomodulatory effect at low doses (≤ 150 mg/kg) and a cytotoxic effect at higher doses (> 150 mg/kg). Indeed, IFO at low doses did not affect numbers or proportions of splenic $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in naive and tumor-bearing mice. This immune-pharmacodynamic study has shown that IFO at low doses could up-regulate the production of $IFN\gamma$, IL-17 and IL-6 after TCR stimulation particularly with IFO 150 mg/kg. At higher doses no significant or high levels of $IFN\gamma$ and IL-17 was observed consistent with the decrease of splenic T cells. Interestingly, G-IFO at high dose (150 mg/kg) seems to trigger a non-specific splenic and intratumoral T cells decrease, however higher secretions of $IFN\gamma$ and IL-6 compared to vehicle were observed. These data highlight a difference of interaction for IFO and G-IFO with T cells and deserve to be further deepened.

Interestingly compared to CPA at 100 mg/kg, IFO 150 mg/kg induced a stronger secretion of IFN γ , IL-17 and IL-6. IL-6 is known to skew Treg differentiation into non-suppressive pro-inflammatory Th17 cells (167, 168); at 150 mg/kg the significant correlation between IL-17A and IL-6 secretions (not observed for CPA) suggests that IL-6 could play a role toward Th17 differentiation after low dose-IFO treatment (data not shown). For CPA at 100 mg/kg, Treg differentiation into non-suppressive proinflammatory Th17 cells was not observed (151) but rather modification of gut microbiota composition was demonstrated as mandatory for CPA-induced Th17 differentiation (153). In our study we could not find any correlation between IL-6 and IL-17A after CPA treatment (data not shown) suggesting that Th17 induction might not rely on IL-6-driven Th17 polarization. Although TCR-dependent induction of cytokines was investigated in our study, the precise origin of IL-6 was not clearly determined since we stimulated splenocytes and not purified T cells. IL-6 is a pro-inflammatory cytokine produced by several cell types including myeloid cells. As already stated IFO is less myelotoxic than CPA (8), thus we cannot exclude that higher number of myeloid cells recovered after IFO treatment compared to CPA even at low dose. Myeloid cells are able to secrete large amounts of pro-inflammatory cytokine such as IL-6 after IFN γ triggering (169) and could explain the higher IL-6 concentrations after IFO treatment compared to CPA, but this remains to be clearly demonstrated. Regarding pre-activated analog of IFO, the IL-6 secretion is proportional to G-IFO's dose with similar secretion between high dose of G-IFO (eq. 150 mg/kg) and CPA 100 mg/kg. Interestingly levels of IL-6 could be of importance since previous observation has suggested that low levels of secreted IL-6 could favor Treg cells while higher amounts of IL-6 could favor Th17 cells differentiation (170) as observed with 150 mg/kg IFO treatment in tumor-bearing mice.

However, one should keep in mind that opposite roles for IFN γ and IL-6 have been described particularly in tumor cell proliferation and tumor growth through phosphorylation of STAT1 and STAT3, respectively. The role of the balance between activation of STAT1, considered as antitumoral, and STAT3, considered as protumoral, remains not totally clear (171). Consequently we cannot rule-out that higher secretion of IL-6 after IFO 150 mg/kg could be deleterious compared to CPA 100 mg/kg. Regarding IL-17A, the roles of Th17 cells depend strongly on the context of the ongoing cytokine environment (172). IL-17A associated with IFN γ production (i.e. Th17.1 polarization) might have a better antitumor activity compared to a pure Th17 polarization as suggested after a single injection of low dose of CPA (151, 153).

Many murine syngeneic tumor models could be used to test immuno-based therapy and previous data have shown that like in patients with cancer an immunologic diversity between these tumor models exists and dictates their capacity to respond to immune checkpoints blockers (173). MCA205 is known to be poorly sensitive to immunotherapy as tumor cells express low levels of PD-L1 (158, 159) (160), we confirmed in this study that MCA205 is poorly responding to anti-PD-1 mAbs as a standalone treatment . As shown on figure 4, adding a single injection of G-IFO at eq. 100 mg/kg or CPA at 100 mg/kg to anti-PD1 mAbs treatment improved the antitumor efficacy. Interestingly, a potent synergy was observed with anti-PD1 mAbs associated with G-IFO eq. 100 mg/kg. Thus G-IFO at low dose seemed pertinent to leverage anti-PD-1 mAbs activity. Previous studies have shown that some chemotherapy such as gemcitabine and paclitaxel increase the expression of PD-L1 on the surface of tumor cells (174). IFN γ and IL-6 cytokines up-regulate PD-L1 expression on solid tumor cells through JAK-signal transcription pathway (respectively, (175), (176)); thus G-IFO through adaptive T cell immunity modulation could also increase PD-L1 expression on tumor cells. This hypothesis remained to be explored. .

Altogether, this study showed the importance of oxazaphosphorine's metabolism and the well-balanced administrated doses that favor T cell activation rather than lymphopenia and that G-IFO could be a promising chemotherapeutic agent candidate for combination with immunotherapy.

Footnotes

Acknowledgements

The authors thank Dr. Patrick Gonin from the PlatForm for Preclinical Evaluation (PFEP)

Fundings: This study was funded by Gustave Roussy Cancer Campus, Fondation Gustave Roussy, the Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), the Centre national de la recherche scientifique (CNRS), SIRIC SOCRATE (INCa DGOS INSERM 6043), SIRIC SOCRATE 2.0 (INCa-DGOS-INSERM_12551), MMO program: ANR-10IBHU-0001)

Author contributions: NC and AP were involved in the study concept, design, analysis and interpretation of data, supervision of study, drafting of the manuscript, obtain funding. JD and CS in acquisition analysis and interpretation of immunological data were involved in statistical analysis and drafting of the manuscript. MD was involved in acquisition analysis and interpretation of immunological data. JLP in interpretation of data.

Competing interests: N. Chaput reports grants from Cytune Pharma, BMS and GSK. Other authors do not declare any conflict of interest.

Special abbreviation: CPA, cyclophosphamide; IFO, ifosfamide; G-IFO, Geranyloxy-IFO; Treg, regulatory T cells; GSH, glutathione; MCA205, Methylchloranthrene-induced sarcomas

Corresponding Author:

Professor PACI Angelo,
114 rue Edouard Vaillant,
94800 Villejuif, France.

E-mail address: angelo.paci@gustaveroussy.fr

Keywords: immunomodulation; ifosfamide; cyclophosphamide; pre-activated ifosfamide, anti-PD1 mAbs

Précis:

We demonstrate that oxazaphosphorines (CPA and IFO) and pre-activated ifosfamide (G-IFO) induce immunomodulation leading to T cell-dependent antitumor effects.

We bring the evidence that the less toxic pre-activated ifosfamide (G-IFO) synergize with anti-PD-1 treatment at low dose. Therefore G-IFO may be a pertinent cytotoxic agent for combination with immunotherapy.

3. Compléments et discussion de l'article

L'article intitulé " *Oxazaphosphorines combined with immune checkpoint blockers: Dose-dependent tuning between immune and cytotoxic effects* " a permis de démontrer l'efficacité antitumorale d'IFO et de G-IFO à faible dose grâce à leurs propriétés immunomodulatrices et a montré l'existence d'une forte synergie entre le G-IFO et l'immunothérapie par un anticorps anti-PD1.

3.1. Compléments de l'expérimentation I : Preuve de concept d'immunomodulation

Une première expérimentation sur la souris naïve de tumeur a permis de poser la preuve de concept d'immunomodulation de l'IFO à faibles doses. Nous n'avons pas étudié l'effet immunologique du G-IFO sur la souris non porteuse de tumeur. En raison de la faible disponibilité du G-IFO, nous avons choisi de démontrer l'influence immunitaire du G-IFO sur un modèle plus pertinent à savoir sur la souris porteuse de tumeur (expérimentation numéro II).

La preuve de concept d'immunomodulation de l'IFO a été construite de la façon suivante : après une injection IP unique du véhicule (NaCl0,9%) (contrôle négatif) ou de CPM à 100 mg/kg (contrôle positif) ou d'IFO de 100 à 200 mg/kg, les souris sont sacrifiées sept jours plus tard. La rate est prélevée et traitée selon le protocole de marquage du panel lymphoïde décrit dans l'article. Une stimulation des cellules issues de la rate par un anticorps anti-CD3ε ainsi qu'une co-stimulation par des anticorps anti-CD3ε plus anti-CD28 a été appliquée pendant 48h afin de déterminer leur polarisation (Th1, Th2 ou Th17) grâce aux dosages par *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) des cytokines relarguées.

Les résultats de l'étude du compartiment lymphoïde par cytométrie de flux ont montré une sensibilité des LB aux Oxaza avec une diminution du nombre (Figure 46) et du pourcentage de cellules parmi les cellules CD45⁺ (Figure 47). Ce résultat n'est pas inattendu et la sensibilité des Oxaza est déjà décrite dans la littérature (164). Concernant la sensibilité des LT aux Oxaza, une diminution des LT totaux est observée dans le groupe ayant reçu la plus forte dose d'IFO c'est-à-dire la dose de 200 mg/kg. En différenciant les populations de LT, des diminutions significatives de LT CD8⁺ et de LT CD4⁺ sont observées, respectivement, dans le groupe ayant reçu une injection d'IFO à 100 mg/kg et une injection d'IFO à 200 mg/kg (Figure 46). L'explication sur la diminution des LT CD8⁺ à la suite d'une injection d'IFO faible dose reste à éclaircir. De plus, le CPM et l'IFO à 200 mg/kg semblent

augmenter la proportion de LT CD8⁺ parmi les LT et diminuer celle des LT CD4⁺ (Figure 47). Concernant les Treg, aucun traitement ne diminue significativement leur nombre (Figure 46), cependant le traitement par CPM a montré une diminution de la proportion de Treg parmi les LT CD4⁺ (Figure 47), ce qui est cohérent avec la littérature (90). Il semble donc que l'IFO induit plus globalement une diminution des LT (CD4⁺ et CD8⁺) alors que le CPM affecte plus préférentiellement les Treg parmi les LT CD4⁺ expliquant une baisse de la proportion de Treg uniquement dans le groupe CPM.

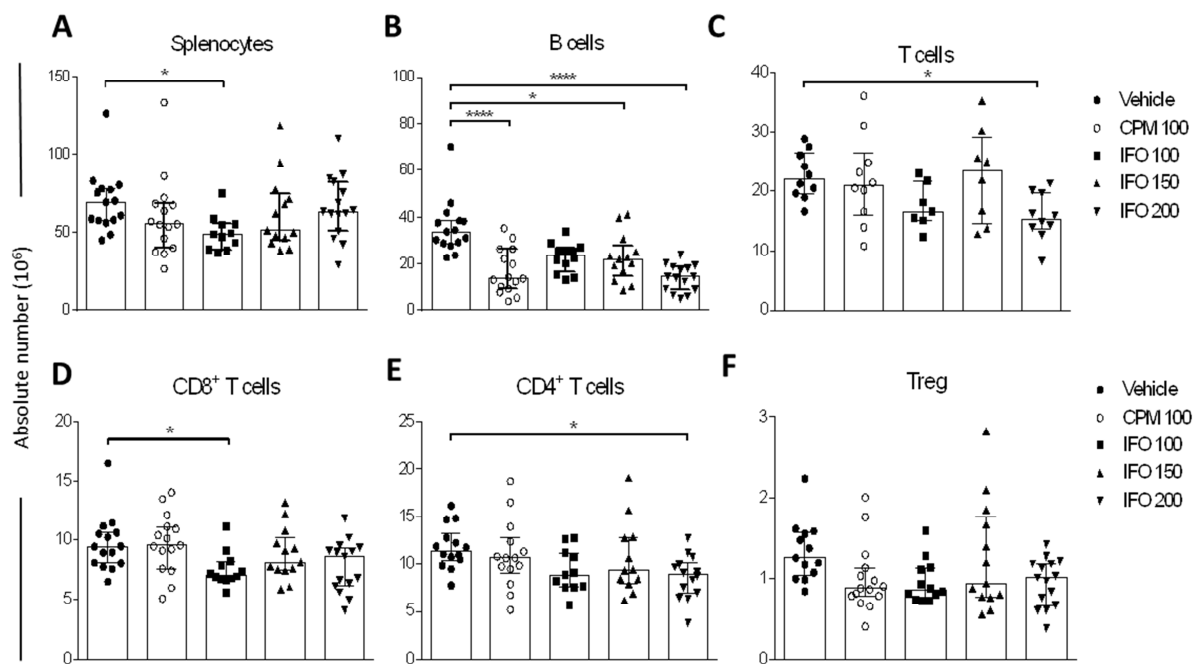


Figure 46. Effet dose-dépendant de l'IFO sur le nombre de LB et LT chez des souris naïves de tumeur.

Nombre absolu de (A) splénocytes, (B) LB, (C) LT, (D) LT CD8⁺, (E) LT CD4⁺, (F) Treg. Les graphiques avec les médianes et interquartiles illustrent les données regroupées de trois - à l'exception de deux pour (C) - expériences indépendantes (5 souris par expérience). L'analyse statistique à l'aide du test de Kruskal-Wallis a révélé des différences significatives à 95 % de l'IC. *p<0,05 ; ** , p<0,01 ; ***, p<0,001 ; ****, p<0,0001.

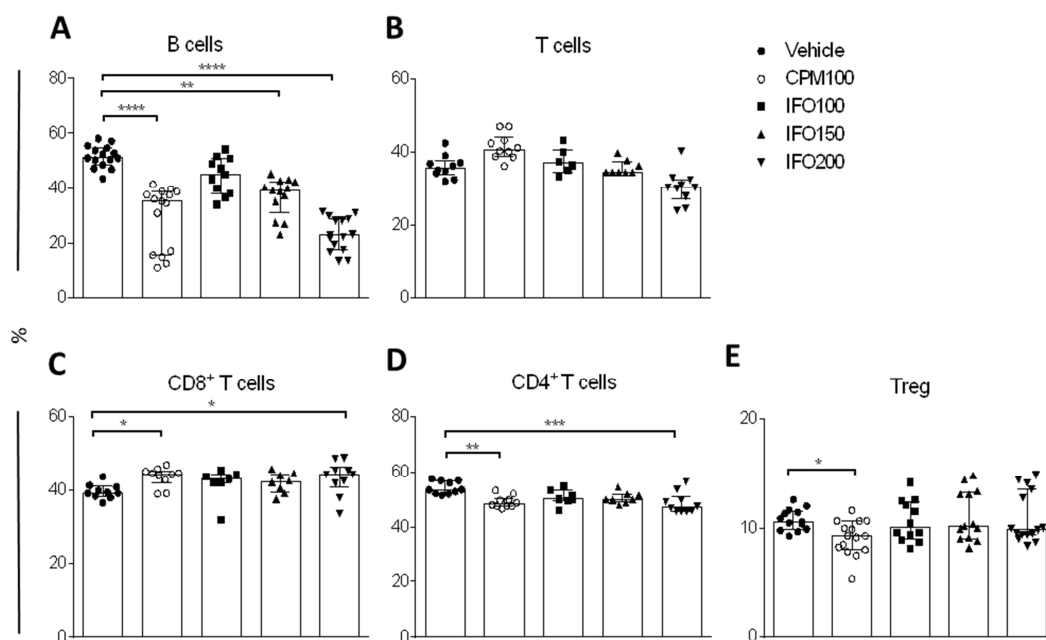


Figure 47. Effet dose-dépendant de l'IFO sur la proportion de LB et LT chez des souris naïves de tumeur.

Pourcentage de (A) LB parmi les cellules $CD45^+$. (B) LT parmi les cellules $CD45^+$. (C) LT $CD8^+$ parmi les cellules $CD3^+$. (D) LT $CD4^+$ parmi les cellules $CD3^+$. (E) Treg parmi les LT $CD4^+$. Les graphiques avec les médianes et interquartiles illustrent les données regroupées de trois (A,E) ou de deux (B,C,D) expériences indépendantes (5 souris par expérience). L'analyse statistique à l'aide du test de Kruskal-Wallis a révélé des différences significatives à 95 % de l'IC. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

La polarisation des LT activés est analysée indirectement grâce à l'étude de leur profil cytokinique. Une première analyse multiplex a été réalisée sur 3 à 5 souris C57B/6 non porteuses de tumeur. Les cytokines pour lesquelles leur taux de sécrétion n'était pas influencé par le traitement par rapport au contrôle négatif étaient les suivantes : IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, TNF α , eotaxin, G-CSF, GM-CSF, KC/GRO, MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES. Des variations du taux de cytokines après traitement ont été observées pour les cytokines suivantes : IFN γ , IL-6, IL-17A, IL-12p40 et MCP-1.

A partir de ces résultats, nous pouvons conclure que les Oxaza entraînent une polarisation Th1/Th17 (augmentation des sécrétions d'IFN γ , IL-6 et IL-17A et non une polarisation Th2 (absence de modulation des sécrétions d'IL-4, IL-5, IL-10, IL-13). Le traitement par les Oxazaphosphorines influence également le compartiment myéloïde (augmentation de sécrétions d'IL-12p40 et MCP-1).

Nous avons donc sélectionné les cytokines IFN γ , IL-6, IL-17A pour étudier la polarisation des LT pour les expériences suivantes. Le traitement par le CPM à 100 mg/kg augmente la sécrétion des trois cytokines après une stimulation par un anticorps anti-CD3 ϵ et, à un niveau plus élevé, après la co-stimulation par les anticorps anti-CD3 ϵ + anti-CD28 (Figure 48). Après une injection d'IFO, le taux de sécrétion de l'IL-6 est dose-dépendant suite aux deux types de stimulation. Concernant IL-17A, une augmentation de la concentration est observée pour les trois doses d'IFO après stimulation par anti-CD3 ϵ mais après co-stimulation, seule la dose d'IFO à 200 mg/kg montre une augmentation significative par rapport au contrôle négatif. Pour l'IFN γ , une augmentation est observée pour les deux plus faibles doses d'IFO testées (100 et 150 mg/kg) après stimulation par anti-CD3 ϵ . La co-stimulation entraîne également une augmentation de la sécrétion de l'IFN γ dans le groupe IFO à 200 mg/kg.

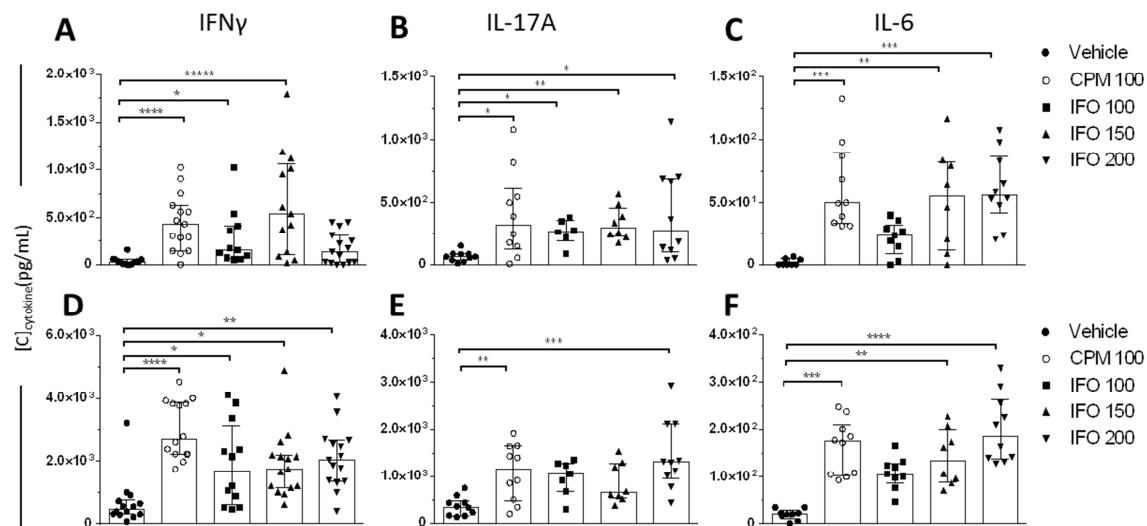


Figure 48. Profil cytokinique après une injection de CPM ou IFO.

Concentrations de IFN γ (A,D), IL-17A (B,E) and IL-6 (C,F) après stimulation par anti-CD3 ϵ (A-C) ou anti-CD3 ϵ + anti-CD28 (D-F). Les graphiques avec les médianes et interquartiles représentent les données regroupées de trois (A,D) ou deux (D,E,C,F) expériences indépendantes (5 souris par expérience). L'analyse statistique à l'aide du test de Kruskal-Wallis a révélé des différences significatives à 95 % de l'IC. *p<0,05 ; ** , p<0,01 ; ***, p<0,001 ; ****, p<0,0001.

L'ensemble de ces données ont permis de démontrer que le traitement par IFO avait une influence sur le système immunitaire lymphoïde. En effet l'IFO à la plus forte dose testée (200 mg/kg) semble être lymphodéplétant (LB et LT) alors qu'à plus faible dose (100 et 150 mg/kg), les lymphocytes ne semblent pas sensibles. De plus, le profil cytokinique après une injection d'IFO 100 et 150 mg/kg,

signe une polarisation Th1/Th17 des lymphocytes. La preuve de concept d'immunomodulation de l'IFO est démontrée. Nous avons, par la suite, exploré l'effet immunomodulateur de l'IFO et de son analogue pré-activé, le G-IFO, chez la souris porteuse de tumeur.

3.2. Compléments de l'expérimentation II : Efficacité antitumorale et détermination de la dose immunomodulatrice de l'IFO et G-IFO

L'expérimentation numéro II est composée de plusieurs parties : une première partie a pour but de démontrer l'efficacité antitumorale de l'IFO et du G-IFO sur le modèle tumoral retenu (modèle de fibrosarcome murin (MCA205)) après une injection unique en IP. La seconde partie vise à étudier et différencier la dualité entre cytotoxicité antitumorale et immunomodulation antitumorale.

Les résultats de la première partie sont présentés dans l'article. Ces résultats d'efficacité ont montré que l'IFO et le G-IFO diminuent la progression de la tumeur même à des doses faibles, 100 et 150 mg/kg pour IFO et eq. 100 mg/kg pour G-IFO (article). La seconde partie a porté sur l'analyse des acteurs spléniques et intratumoraux du SI impliqués dans la modulation par l'IFO et le G-IFO. L'article XXX présente les résultats de l'étude du compartiment lymphoïde dans la rate pour l'IFO, et dans la rate et dans la tumeur pour le G-IFO. Des analyses complémentaires ont été réalisées pour étudier le compartiment myéloïde dans la rate et la tumeur grâce à un panel orienté myéloïde pour l'étude en cytométrie en flux (Tableau 8) et grâce à une analyse en immunohistochimie des macrophages intratumoraux.

<i>Panel</i>	<i>Antigène</i>	<i>Type cellulaire</i>	<i>Espèce</i>	<i>Clone</i>	<i>Fluorochrome</i>	<i>Fournisseur</i>
Lymphoïde	CD45	Cellules lymphoïdes et myéloïdes	souris	30-F11	FITC	BD biosciences
	CD3e	LT	souris	145-2C11	APC-Cy7	BD biosciences
	CD4	CD4 ⁺ LT	souris	RM4-5	PC7	BD biosciences
	CD8α	CD8 ⁺ LT	souris	53-6.7	APC-R700	BD biosciences
	FoxP3	Treg	souris	FJK-16s	APC	eBioscience
	CD25	Treg	souris	PC61	PE	BD biosciences
	CD19	LB	souris	6D5	BV421	BioLegend
Myéloïde	Ly6C	Monocyte, neutrophile, MDSC*	souris	AL-21	PC7	BD biosciences
	CD11b	Macrophage et CD*	souris	M1/70	APC	BD biosciences
	CD11c	Macrophage et CD*	souris	HL3	Alexa 700	BD biosciences
	Ly6G	Monocyte, neutrophile, MDSC*	souris	1A8	APC-Cy7	BD biosciences
	NkP46	NK	souris	29A1.4	FITC	BD biosciences
	CD45	Cellules lymphoïdes et myéloïdes	souris	30-F11	BV510	BD biosciences

Tableau 8. Description des anticorps des panels lymphoïde et myéloïde déterminés par cytométrie en flux.

* Type cellulaire identifié en fonction du niveau d'expression de l'antigène ainsi que de la co-expression avec d'autres antigènes.

3.2.1. Compartiment lymphoïde

L'analyse des acteurs lymphoïdes spléniques impliqués dans la modulation par l'IFO et le G-IFO est présentée dans l'article. Elle a montré que l'IFO à fortes doses (200 et 300 mg/kg) avait entraîné une lymphopénie non spécifique des cellules spléniques et par conséquent une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires observée lors de l'analyse par ELISA. La cytotoxicité directe sur les cellules immunitaires à ces fortes doses ne permet pas de mettre en évidence un effet de polarisation sur les LT. A la différence, l'IFO à de plus faibles doses (100 et 150 mg/kg) a montré une lymphopénie dirigée contre les LB mais pas contre les LT ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'IFN γ , IL-17A et IL-6. Nous avons donc sélectionné la dose d'IFO à 150 mg/kg en tant que dose immunomodulatrice. Cette dose sera confirmée par une absence d'efficacité suite à la déplétion des LT CD4⁺ et LT CD8⁺.

Concernant l'analogue pré-activé G-IFO, une escalade de dose a été testée en IP : eq. 50, 100, 150 et 200 mg/kg. Après les décès de plusieurs souris ayant reçu la dose d'eq. 200 mg/kg, nous avons éliminé cette dose de l'étude. Nous suspectons la forte probabilité d'un souci d'ordre galénique. La dose de G-IFO d'eq. 150 mg/kg semble entraîner une lymphopénie non spécifique dans la rate. Cependant à la différence de l'IFO à fortes doses, les sécrétions d'IFN γ , IL-17A et IL-6 ne sont pas diminuées mais au contraire augmentées : l'interaction entre IFO forte dose/LT et G-IFO forte dose/LT semble donc différente. La dose intermédiaire de G-IFO (eq. 100 mg/kg) n'affecte pas le

nombre de LT spléniques et entraîne une augmentation des sécrétions d'IFN γ et IL-6. La dose à l'éq. 50 mg/kg ne semble pas avoir d'effet par rapport au véhicule.

Concernant l'identification et la quantification des cellules lymphoïdes dans la tumeur MCA205, l'administration de G-IFO a montré que ce dernier entraînait une diminution non spécifique des LT intratumoraux quel que soit la dose (diminution significative pour le groupe G-IFO eq. 150 mg/kg) (article). Le traitement par la dose d'IFO à 150 mg/kg a également montré une diminution de l'infiltrat des LT de façon non spécifique (Figure 49). Les LT CD4⁺ semblent plus sensibles au CPM 100 mg/kg, IFO 150 mg/kg et G-IFO eq. 150 mg/kg que les doses de G-IFO eq. 50 et 100 mg/kg (Figure 49). Concernant la population de LT CD8⁺, aucune modulation n'est observée après le traitement par CPM 100 mg/kg alors qu'une diminution est montrée après l'injection d'IFO 150 mg/kg et G-IFO eq. 150 mg/kg. Les Treg semblent moins sensibles au G-IFO à eq. 50 et 100 mg/kg (Figure 49E). Comme décrit dans la littérature, le CPM augmente le ratio CD8⁺ LT/Treg dans la tumeur. L'IFO et le G-IFO ne semblent pas impacter ce ratio. La répétition de cette étude préliminaire dans la tumeur est nécessaire afin de confirmer ces premiers résultats.

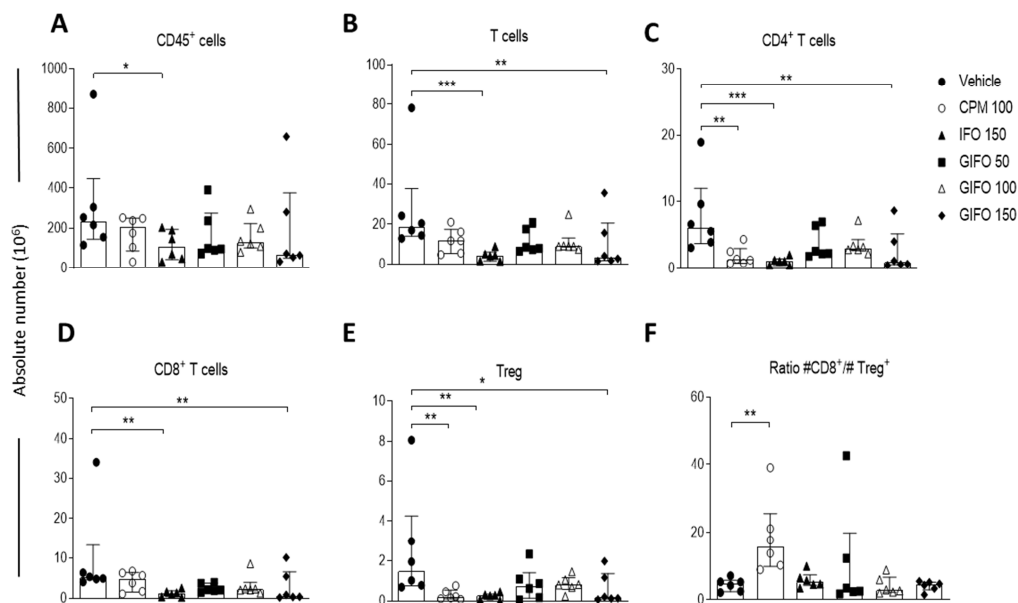


Figure 49. Effet des Oxaza et du G-IFO sur le nombre de cellules lymphoïdes intratumorales.

Nombre absolu de (A) cellules CD45⁺, (B) LT, (C) CD4⁺ LT, (D) CD8⁺ LT, (E) Treg. (F) Ratio du nombre de CD8⁺ LT sur le nombre de Treg. Les graphes avec les valeurs médianes et interquartile illustrent les données d'une expérience (n=6 souris/groupe). L'analyse statistique à l'aide du test Kruskal-Wallis, sans correction de la comparaison multiple du fait du caractère exploratoire de l'expérimentation, a révélé des différences significatives à 95 % de l'IC. *p<0,05; **, p<0,01 ; ***, p<0,001 ; ****, p<0,0001.

Les proportions des différentes populations lymphoïdes intratumorales suivent respectivement les mêmes variations que le nombre de cellules lymphoïdes intratumorales (Figure 50).

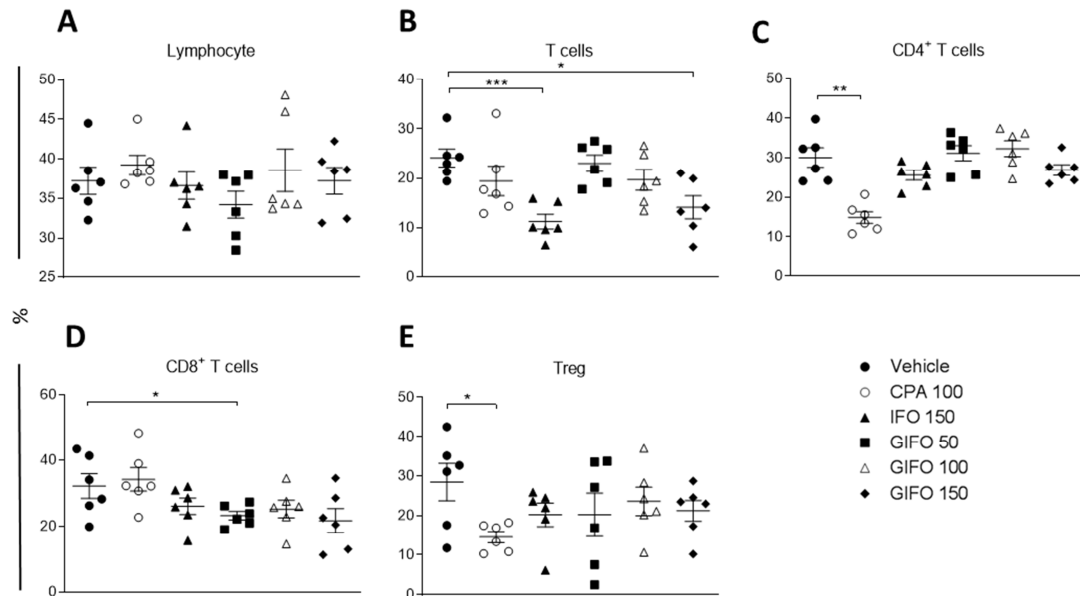


Figure 50. Effet des Oxaza et du G-IFO sur la proportion des populations de cellules lymphoïdes intratumorales.

Proportion de (A) Lymphocytes, (B) LT parmi les lymphocytes, (C) CD4⁺ LT et (D) CD8⁺ LT parmi les LT, (E) Treg parmi les CD4⁺ LT. (F) Ratio du nombre de CD8⁺ LT sur le nombre de Treg. Les graphes illustrent les données d'une expérience (n=6 souris/groupe). Les valeurs médianes avec interquartile sont présentées. L'analyse statistique à l'aide du test Kruskal-Wallis, sans correction de la comparaison multiple du fait du caractère exploratoire de l'expérimentation, a révélé des différences significatives à 95 % de l'IC. *p<0,05 ; ** , p<0,01 ; *** , p<0,001 ; **** , p<0,0001.

Globalement l'IFO 150 mg/kg et le G-IFO eq. 150 mg/kg semblent affecter davantage les populations T en comparaison du CPM dans le microenvironnement tumoral. A des doses plus faibles, le G-IFO (eq. 50 et 100 mg/kg) n'entraîne pas de modification significative en nombre des populations de lymphocytes T.

3.2.2. Compartiment myéloïde

Nous nous sommes également intéressés à l'influence des Oxaza et du G-IFO sur les populations myéloïdes dans la rate ainsi que dans la tumeur MCA205.

La stratégie de *gating* est présentée dans la Figure 51: après sélection des cellules CD45⁺, les cellules viables sont triées selon leur forme puis les cellules NK, LT et LB sont identifiées et les cellules n'appartenant pas à ces populations sont séparées selon l'expression du marqueur membranaire CD11c et CD11b. Les cellules CD11c⁺ CD11b⁺ sont majoritairement représentées par les DC et les cellules CD11c⁻ CD11b⁺ sont majoritairement représentées par les cellules phagocytaires (monocytes et macrophages). En parallèle les cellules CD11b⁺ sont également triées selon le niveau d'expression de Ly6g et Ly6c. Les cellules Ly6g^{low} Ly6c^{high} caractérisent les monocytes ou les *monocytic*-MDSC (M-MDSC) (il est difficile de différencier ces deux populations, en effet il faudrait faire une étape préalable d'ultracentrifugation (177)), elles peuvent également représentées les macrophages de type M1 (178). Les cellules Ly6g^{high} Ly6c^{low} caractérisent, quant à elles, les cellules granulocytaires dont les neutrophiles ou *polymorphonuclear*-MDSC (PMN-MDSC) (comme pour les cellules Ly6g^{low} Ly6c^{high}, une étape d'ultracentrifugation serait nécessaire pour séparer ces deux populations).

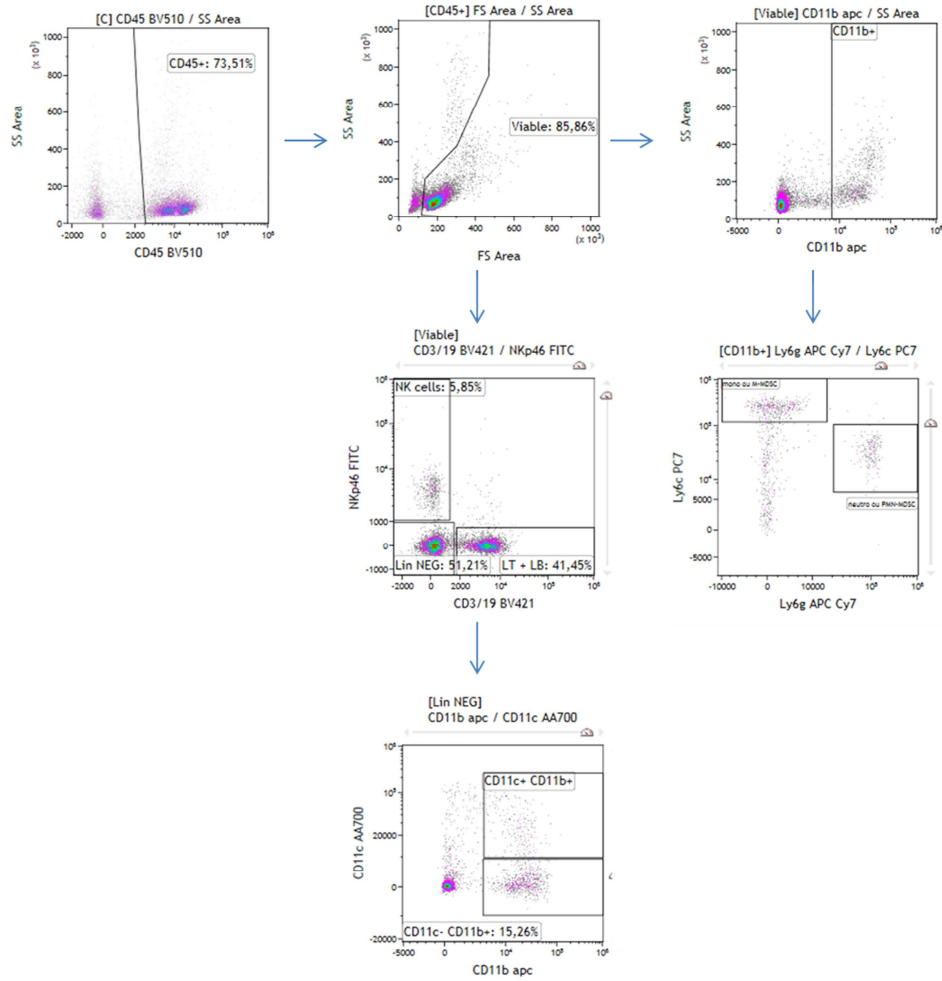


Figure 51. Stratégie de *gating* panel myéloïde.

Exemple avec un échantillon issu de la rate. Les cellules CD45⁺ sont sélectionnées et les cellules viables sont triées en fonction de la taille (FS) et de la structure (SS). Parmi les cellules viables sont triées les cellules CD11b⁺ afin de séparer les cellules en fonction de leur niveau d'expression de Ly6g et Ly6c, et sont également séparées les cellules NKp46⁺ des cellules NKp45⁻ CD3⁻ CD19⁻ (lin NEG). Parmi les cellules lin NEG sont triées les cellules en fonction de l'expression CD11c et CD11b.

Analyse dans la rate

L'étude des cellules myéloïdes issues de la rate a permis de mettre en évidence la décroissance des cellules CD45⁺ pour le G-IFO de façon dose dépendante (Figure 52). L'IFO 150 mg/kg montre également une diminution des cellules CD45⁺ spléniques. Les cellules NK semblent sensibles au traitement par Oxazaphosphorines (Figure 52B). Cependant le pourcentage de NK parmi les cellules CD45⁺ ne varie pas avec l'administration du traitement (Figure 53). La diminution des NK observée serait donc liée à la diminution des cellules CD45⁺ totaux. Concernant les autres types cellulaires étudiés, aucune modification significative n'est observée dans nos conditions expérimentales. Il se dégage néanmoins une tendance d'augmentation G-IFO dose-dépendante du nombre de cellules CD11c⁻CD11b⁺, CD11c⁺CD11b⁺, Ly6g^{low} Ly6c^{high} et Ly6g^{high} Ly6c^{low}.

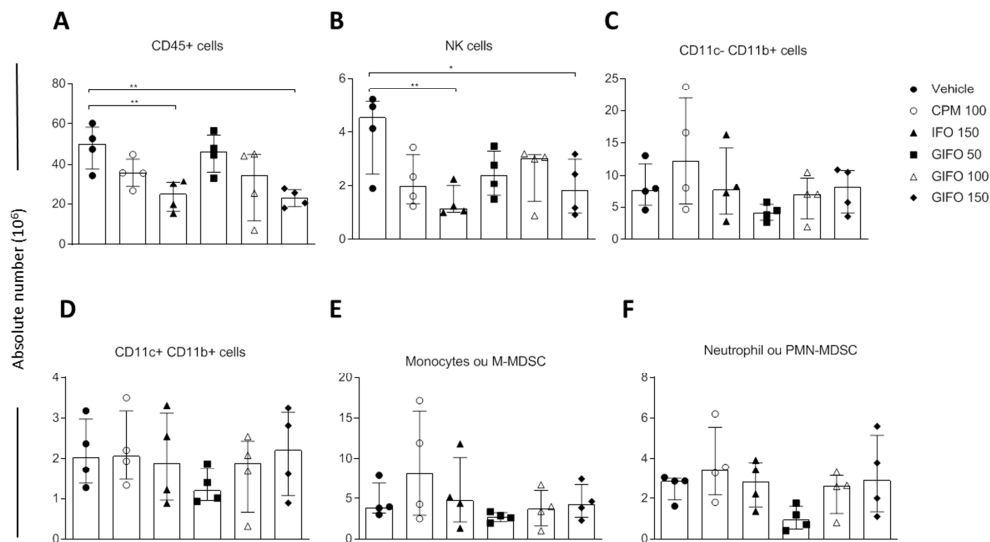


Figure 52. Effet des Oxaza et du G-IFO sur le nombre de cellules myéloïdes spléniques.

Nombre absolu de (A) cellules CD45⁺, (B) cellules NK, (C) cellules CD11c⁻CD11b⁺, (D) cellules CD11c⁺CD11b⁺, (E) cellules Ly6g^{low} Ly6c^{high} (F) cellules Ly6g^{high} Ly6c^{low}. Les graphes illustrent les données d'une expérience (n=4 souris/groupe). Les valeurs médianes avec interquartile sont présentées. L'analyse statistique à l'aide du test Kruskal-Wallis, sans correction de la comparaison multiple du fait du caractère exploratoire de l'expérimentation, a révélé des différences significatives à 95 % de l'IC. *p<0,05 ; ** , p<0,01 ; *** , p<0,001 ; **** , p<0,0001.

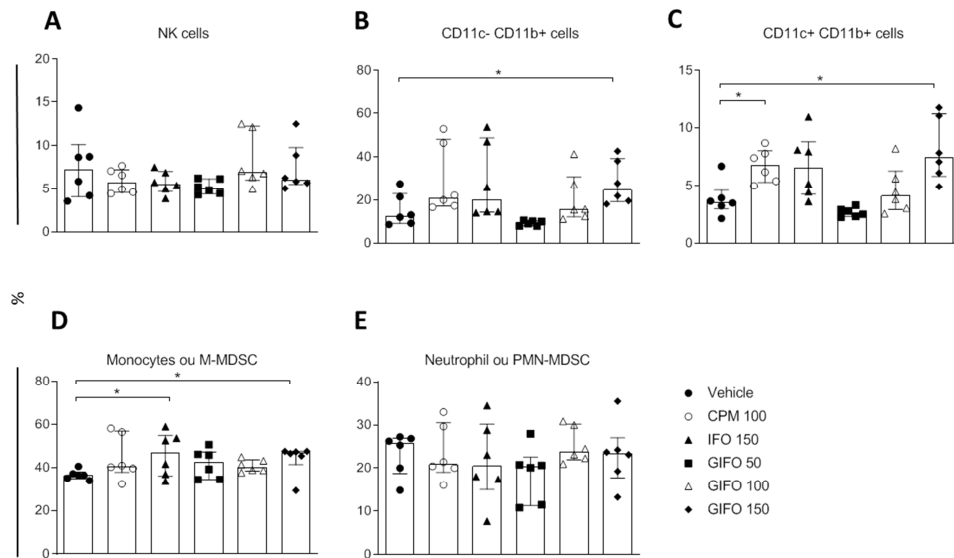


Figure 53. Effet des Oxaza et du G-IFO sur la proportion de cellules myéloïdes spléniques.

Proportion de (A) cellules NK parmi les cellules CD45⁺, (B) cellules CD11c⁻ CD11b⁺ parmi les cellules CD45⁺, (C) cellules CD11c⁺ CD11b⁺ parmi les cellules CD45⁺, (D) cellules Ly6g^{low} Ly6c^{high} parmi les cellules CD11b⁺, (E) cellules Ly6g^{high} Ly6c^{low} parmi les cellules CD11b⁺. Les graphes illustrent les données d'une expérience (n=6 souris/groupe). Les valeurs médianes avec interquartile sont présentées. L'analyse statistique à l'aide du test Kruskal-Wallis, sans correction de la comparaison multiple du fait du caractère exploratoire de l'expérimentation, a révélé des différences significatives à 95 % de l'IC. *p<0,05 ; **, p<0,01 ; ***, p<0,001 ; ****, p<0,0001.

En résumé de ces observations préliminaires de l'effet des Oxaza et du G-IFO sur le compartiment myéloïde dans la rate, nous pouvons noter que le G-IFO à faible dose (eq. 50 mg/kg) semble entrainer une diminution plus importante sur les cellules CD11c⁻ CD11b⁺ (monocyte ou macrophage), les cellules CD11c⁺ CD11b⁺ (DC) et les cellules Ly6g^{high} Ly6c^{low} (granulocytes), alors que des doses plus élevées (eq. 100 et 150 mg/kg) ainsi que l'IFO 150 mg/kg ne semblent pas entrainer une variation quantitative de ces cellules myéloïdes. L'explication de ces observations nécessite de réitérer l'étude. Par ailleurs le CPM à 100 mg/kg, l'IFO à 150 mg/kg et le G-IFO à eq. 150 mg/kg augmentent la proportion de DC et de monocytes/macrophages parmi cellules CD11b⁺.

Analyse dans la tumeur

L'étude des cellules myéloïdes issues de la tumeur MCA205 a mis en évidence de légères modulations significatives suite au traitement par les Oxaza (Figure 54). Le traitement par IFO 150 mg/kg et G-IFO eq. 100 et 150 mg/kg diminue le nombre de cellules CD45⁺ intratumorales. Comme pour la rate, le traitement par le G-IFO eq. 150 mg/kg conduit à une diminution des cellules NK.

Les distributions des sous-types de cellules myéloïdes et des cellules NK apparaissent légèrement différentes entre les cellules spléniques et les cellules intratumorales. La proportion de cellules NK parmi les cellules CD45⁺ est augmentée dans la tumeur après un traitement par le CPM 100 mg/kg et le G-IFO eq. 50 mg/kg, alors qu'elle est inchangée dans la rate (Figure 55). Le traitement par le G-IFO à eq. 50 mg/kg diminue la proportion de monocytes/macrophages parmi les cellules CD45⁺ dans la tumeur alors qu'elle est inchangée dans la rate. Par ailleurs le CPM 100 mg/kg augmente la proportion de neutrophiles/PMN-MDSC parmi les CD11⁺.

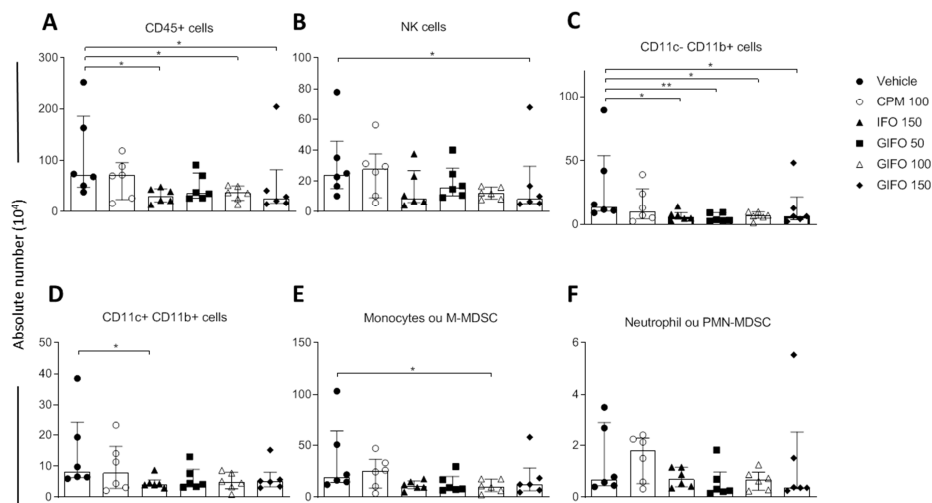


Figure 54. Effet des Oxaza et du G-IFO sur le nombre de cellules myéloïdes intratumorales.

Nombre absolu de (A) cellules CD45⁺, (B) cellules NK, (C) cellules CD11c⁻CD11b⁺, (D) cellules CD11c⁺CD11b⁺, (E) cellules Ly6g^{low} Ly6c^{high} (F) cellules Ly6g^{high} Ly6c^{low}. Les graphes illustrent les données d'une expérience (n=6 souris/groupe). Les valeurs médianes avec interquartile sont présentées. L'analyse statistique à l'aide du test Kruskal-Wallis, sans correction de la comparaison multiple du fait du caractère exploratoire de l'expérimentation, a révélé des différences significatives à 95 % de l'IC. *p<0,05 ; **, p<0,01 ; ***, p<0,001 ; ****, p<0,0001.

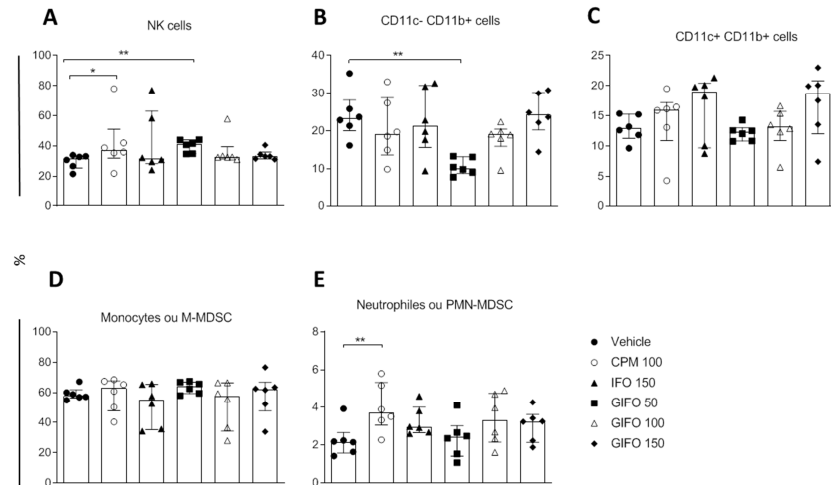


Figure 55. Effet des Oxaza et du G-IFO sur la proportion de cellules myéloïdes intratumorales.

Proportion de (A) cellules NK parmi les cellules $CD45^+$, (B) cellules $CD11c^- CD11b^+$ parmi les cellules $CD45^+$, (C) cellules $CD11c^+ CD11b^+$ parmi les cellules $CD45^+$, (D) cellules $Ly6g^{low} Ly6c^{high}$ parmi les cellules $CD11b^+$, (E) cellules $Ly6g^{high} Ly6c^{low}$ parmi les cellules $CD11b^+$. Les graphes illustrent les données d'une expérience (n=6 souris/groupe). Les valeurs médianes avec interquartile sont présentées. L'analyse statistique à l'aide du test Kruskal-Wallis, sans correction de la comparaison multiple du fait du caractère exploratoire de l'expérimentation, a révélé des différences significatives à 95 % de l'IC. *p<0,05 ; **, p<0,01 ; ***, p<0,001 ; ****, p<0,0001.

Dans la tumeur, l'influence des traitements Oxaza et G-IFO est globalement semblable aux observations faites sur le nombre des cellules myéloïdes spléniques. Cependant la distribution des types cellulaires semble être légèrement modifiée entre les deux tissus : le G-IFO eq. 50 mg/kg augmente la proportion des cellules NK parmi les cellules $CD45^+$ et diminue celle des cellules $CD11c^- CD11b^+$ (monocyte ou macrophage) dans la tumeur alors qu'aucune variation par rapport au contrôle était observée dans la rate, et le CPM augmente la proportion de cellules $Ly6g^{high} Ly6c^{low}$ seulement dans le tissu tumoral.

Les données sur le compartiment myéloïde splénique et intratumoral restent préliminaires et nécessitent d'être complétées.

4. Discussion et conclusion de la partie III « Immunomodulation »

Les résultats ont montré que les Oxaza sont très lymphopéniants pour les LB. Il apparaît pertinent d'utiliser cet effet dans une stratégie d'association à d'autres thérapies pour lesquelles une activation humorale n'est pas bénéfique. C'est le cas, par exemple, dans le traitement antitumoral par le virothérapie oncolytique. Pour augmenter l'efficacité de cette thérapie, les chercheurs étudient des moyens d'empêcher le système immunitaire d'attaquer et de détruire ces virus oncolytiques. Une étude a montré que l'administration d'une dose de CPM per os à 1 mg/jour pendant huit jours ou IV à 3 mg/jour pendant quatre jours dans un modèle murin induit la suppression de production d'anticorps dirigés contre le virus thérapeutique ; une dose plus importante est toxique et inutile tandis qu'une dose plus faible est inefficace pour atteindre l'objectif voulu (179). Les auteurs recommandent l'administration de CPM IV chez l'homme, pendant quatre jours à 10 mg/kg, à commencer un jour avant le traitement pour le virus oncolytique. L'association d'un traitement par virus oncolytique et d'une Oxaza apparaît une stratégie thérapeutique envisageable.

L'association de ces traitements avec les immunothérapies est également une piste thérapeutique intéressante. L'application de l'immunothérapie ciblant les points de contrôle immunitaires par les anticorps anti-CTLA4, anti-PD1 et anti-PDL1 en cancérologie a permis d'observer des régressions tumorales sur des types de cancers non répondeurs au traitement par chimiothérapies conventionnelles et surtout a permis d'induire des réponses prolongées dans le temps (180). Cependant, il existe une grande hétérogénéité de réponses aux ICB dont les origines restent encore à déterminer. La stratégie d'associer le traitement par ces inhibiteurs avec la chimiothérapie conventionnelle est confirmée par plusieurs études pré-cliniques et cliniques. Par exemple, l'essai de phase II KEYNOTE 021 associant le pembrolizumab (anticorps anti-PD1) au carboplatine et pemetrexed en première ligne de traitement dans le cancer du poumon non à petites cellules, a montré une réponse objective chez 55% des patients alors qu'elle n'était observée que chez 18% des patients traités seulement avec le pembrolizumab (181). Dans ce travail de thèse, l'association d'un anticorps anti-PD1 avec un alkylant dérivé de l'IFO, le G-IFO, a montré l'existence d'une forte synergie antitumorale. Cette preuve de concept sera approfondie dans les futures expériences du laboratoire. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette synergie entre le traitement par un anticorps anti-PD1 et un alkylant de l'ADN, le G-IFO. Comme décrit pour la gemcitabine et le paclitaxel, le traitement par chimiothérapie peut entraîner une augmentation de l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales (174). La gemcitabine est également décrite pour son influence au niveau de la présentation d'antigène au LT CD8⁺; elle augmente l'expression du

CMH type I à la surface des CPA, améliorant ainsi la réponse immune adaptative (182). Les chimiothérapies telles que l'oxaliplatine entraîne une mort dite immunogène de la cellule tumorale et participe donc à l'activation des systèmes immunitaires (67). Une autre hypothèse peut être formulée ; celle de la réponse aux dommages de l'ADN (*DNA damage response* (DDR)). Il a été démontré que les traitements entraînant un dommage de l'ADN (alkylants de l'ADN, radiothérapie) mènent à la libération de fragments d'ADN dans le cytosol (183). L'interaction de l'ADN cytosolique avec la protéine cGAS entraîne son activation et conduit à la production de cGAMP qui va se fixer sur son récepteur STING (*Stimulator of interferon genes*). Cette liaison entraîne l'expression de cytokines inflammatoires et d'IFN de type I et stimule l'immunité antitumorale (183). Il a été montré dans un modèle murin de mélanome que l'inactivation de la voie cGAS/STING diminue l'efficacité de l'immunothérapie (184). Différents agonistes de STING sont actuellement en évaluation pré-clinique et le rationnel d'utilisation en association avec les ICB pour un effet antitumoral synergique est récemment décrit (185). L'utilisation d'un traitement alkylant tel que les Oxaza entraînant l'activation de STING via le phénomène DDR peut être une explication de la synergie avec l'anticorps anti-PD1. Concernant la différence de synergie entre les doses immunomodulatrices d'IFO, CPM et G-IFO, nous pouvons émettre l'hypothèse que la moutarde phosphoramidée, libérée en plus grande quantité par le CPM et le G-IFO, comme nous l'avons décrit précédemment, est à l'origine de l'activation cGAS/STING. Dans l'immédiat une demande de brevet a été déposée le 11/10/2019 (EP19306332). L'étude de cette synergie pourra être également conduite sur les autres dérivés terpéniques de l'IFO afin de connaître l'influence de la longueur de la chaîne carbonée c'est-à-dire l'influence de la balance hydrophile/lipophile de la molécule pré-activée sur l'effet immunologique. En effet, cette balance peut modifier le profil PK de la molécule, comme nous avons vu lors de l'étude de biodistribution du G-IFO et F-IFO mais joue également un rôle au niveau de l'interaction avec les cellules cibles, notamment sur la pénétration intracellulaire. De plus, d'autres modèles murins tels que CT26 seront explorés afin de confirmer l'effet immunomodulateur. En effet, il sera d'autant plus intéressant d'explorer l'efficacité des X-Oxaza sur une autre souche de souris que la souris C57Bl/6, connue pour avoir une prédominance Th1 à la différence de la souris BalbC qui a une prédominance Th2 (186).

Par ailleurs, l'influence des Oxaza et X-Oxaza sur le compartiment myéloïde a été débutée lors de ce travail de thèse. Par la suite, il serait intéressant d'approfondir l'étude sur la polarisation des macrophages intratumoraux vers un type M1 ou M2 va influencer leur activité antitumorale ou pro-tumorale, respectivement. En effet, la présence de macrophages M1 dans le microenvironnement tumoral est corrélée à un meilleur pronostic de survie dans certains cancers tels que le cancer pulmonaire non à petites cellules (187). Les macrophages M2, communément appelés les *tumor*

associated macrophages (TAM), sont quant à eux associés à un mauvais pronostic de survie des patients dans les cancers pancréatique (188) et pulmonaire non à petites cellules (187). Ils influencent directement sur la survie, la prolifération, le caractère invasif des cellules tumorales, ainsi que l'angiogénèse et l'immunosuppression (189). Pour la plupart des tumeurs solides, une forte densité de macrophages est souvent associée à un mauvais diagnostic (190). La polarisation des macrophages, qualifiée de dynamique, peut être inversée sous conditions physiologiques, pathologiques et pharmacologiques. Elle peut donc faire l'objet de thérapies dirigées contre les différents points de contrôle immunitaires des macrophages. Plusieurs stratégies thérapeutiques sont actuellement en cours de développement (66) : cibler la déplétion des macrophages M2, cibler l'inhibition du recrutement des M2 au sein de la tumeur ou encore cibler la reprogrammation des TAM en type M1. Une étude a montré que le CPM avait une influence sur la polarisation des macrophages murins ; une faible dose de CPM (20-50 mg/kg) entraînerait une polarisation des macrophages « tolérogènes » (i.e. M2) en CPA *via* une inhibition de l'IL-10 (cytokine étant décrit comme un signal d'activation des macrophages en phénotype M2 (191)) et une augmentation de la production d'IL-6 (192). Il est à noter que l'IFN γ est décrit comme un signal favorisant la polarisation en type M1 (193) ; les résultats présentés dans l'article « The two sides of Oxazaphosphorines: Dose-dependent tuning between immune and cytotoxic effects, a gate for immune checkpoint blockers synergy » appuie l'hypothèse de repolarisation des macrophages en type M1 par les Oxaza. Cependant, une récente étude a montré que l'IL-6, cytokine surexprimée après le traitement par les Oxaza, influencerait la polarisation des macrophages vers un type M2 dans le cancer colorectal (194). L'effet des Oxaza et X-Oxaza sur les macrophages fait l'objet d'actuels travaux de l'équipe.

Connaissant le profil PK du G-IFO formulé avec le véhicule DMSO/Tween80/NaCl0,9% (5/5/90,v/v/v) suite à une injection parentérale (IV ou IP), la faible exposition plasmatique et la biodistribution du G-IFO dans cette formulation laisse à penser qu' une formulation optimisée du G-IFO, offrant un meilleur profil pharmacocinétique, serait active à de très faibles doses. L'optimisation galénique du G-IFO sous forme dite « libre » apportera un atout considérable à l'exposition du G-IFO après administration et de nouvelles études d'immunomodulation seront nécessaires afin d'apprécier les effets du G-IFO à de très faibles doses. Par ailleurs, il serait également intéressant d'étudier les effets immunomodulateurs du G-IFO formulé sous forme de nano-objets. En effet, les nano-objets tels que les nano-émulsions, sont actuellement étudiés en tant qu'adjuvant vaccinal. Un adjuvant vaccinal est une substance administrée en même temps que le vaccin (un antigène) et qui a pour but d'améliorer, amplifier et prolonger la réponse du SI au vaccin. Le Montanide ISATM 51 VG et 720 VG, deux adjuvants vaccinaux sous forme de nano-émulsion (195) ont été testés dans de nombreux essais

cliniques et la forme 51 VG a été approuvée pour le traitement du cancer du poumon (196). Il est décrit dans la littérature que les émulsions peuvent entraîner une inflammation et stimuler le recrutement des CPA et favoriser l'interaction entre l'antigène et les CPA grâce à leur propriété physicochimique de tensioactif. Ils peuvent également favoriser l'accumulation des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques (195). La forme galénique est un facteur non négligeable, pouvant influencer la fonction des acteurs du SI. En effet, une revue de la littérature publiée en 2014 a référencé les différentes nanoparticules ayant des propriétés immunomodulatrices (197). Selon le type, la dose, la voie d'administration et la composition extérieure, elles peuvent être pro- ou anti-inflammatoires. Une récente étude a discuté l'effet immunosuppresseur/tolérance immunologique des liposomes pégylés ; les formules liposomales pégylées entraîneraient une activation du complément et, la phagocytose de ces dernières par les macrophages entraînerait une polarisation de type M2 et favoriserait par conséquent le phénomène pro-tumoral (198). Les auteurs ont montré que l'ajout d'alendronate dans la formulation liposomale permettait d'inverser ce phénomène et de favoriser la polarisation des macrophages en M1. En effet, il a été montré que les biphosphonates étaient capables d'inhiber la prolifération, la migration et l'invasion des TAM (199). Cependant les bisphosphonates affectent également les ostéoclastes ; l'approche d'encapsulation dans un liposome favorise la capture du principe actif spécifiquement par les macrophages du fait de leur capacité de phagocytose.

Les expérimentations sur le G-IFO sont préliminaires et ont permis d'apporter la preuve de concept d'immunomodulation d'un analogue pré-activé de l'IFO. Elles seront approfondies avec de nouvelles expérimentations animales afin d'augmenter de confirmer ces premiers résultats très encourageants.

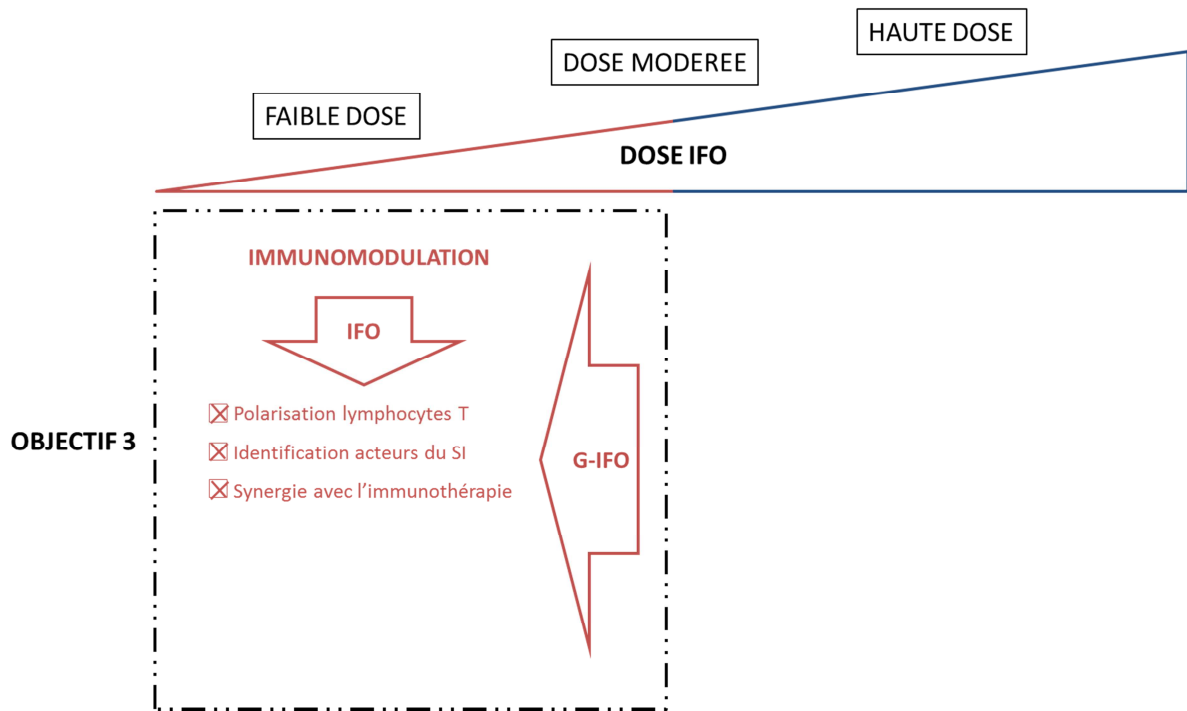


Figure 56. Avancement du projet : Objectif 3

Conclusion générale

Le G-IFO est une molécule innovante à plusieurs égards. Il permet de diminuer les toxicités induites de l'IFO tout en gardant l'activité alkylante de la moutarde isophosphoramide. En effet, il a été montré *in vitro* et *in vivo* que le G-IFO n'impliquait pas les CYP pour sa biotransformation. L'utilisation du G-IFO en clinique, en alternative à l'IFO, pourrait permettre une utilisation plus sûre, particulièrement lors de protocoles hautes doses.

Nous avons vu que le G-IFO offre une dualité d'action pour éliminer la cellule cancéreuse (Figure 57). Cette dualité d'action étant dirigée par la dose permet une première action à forte dose (> eq. 100 mg/kg) dirigée directement vers la cellule tumorale avec une activité cytotoxique en tant qu'alkylant de l'ADN, et une seconde action à faible dose (\leq eq. 100 mg/kg) dirigée vers le microenvironnement tumoral menant à une action indirecte *via* une immunomodulation du système immunitaire innée et adaptatif. Cette seconde action justifie la faisabilité et la synergie d'efficacité de la combinaison thérapeutique avec les *immune checkpoint blockers*.

Des optimisations galéniques sont nécessaires à apporter à ce nouvel agent anticancéreux afin d'apprécier la stabilité de la molécule après reconstitution ainsi qu'un profil pharmacocinétique satisfaisant pour cibler le tissu tumoral pendant un temps optimal à la bonne dose. Des pistes sont dorénavant ouvertes avec l'exploitation de formulation à base de β -cyclodextrine pour la forme « libre » ou sous la forme de nanomédicament.

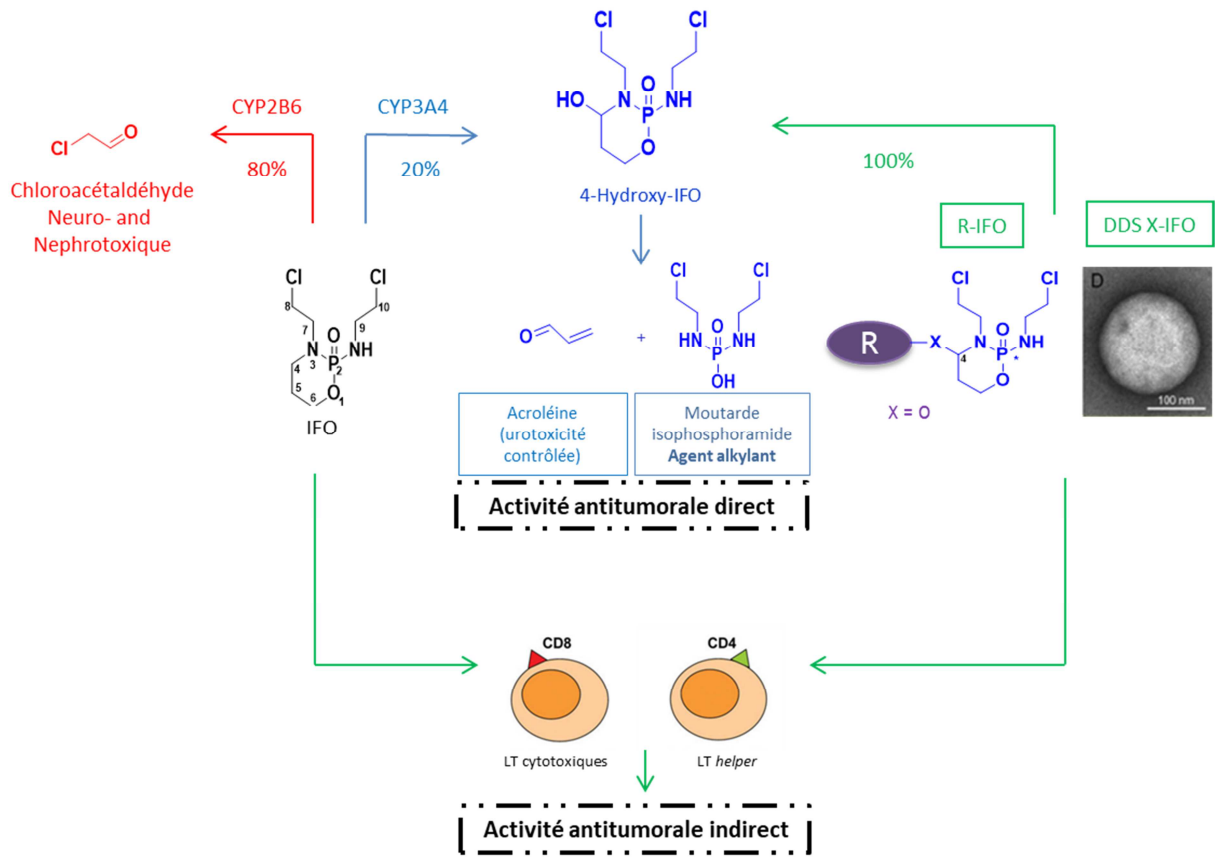


Figure 57. Iforeside et X-Iforeside : double agent

BIBLIOGRAPHIE

1. Christakis P. The birth of chemotherapy at Yale. Bicentennial lecture series: Surgery Grand Round. The Yale journal of biology and medicine. 2011;84(2):169-72.
2. J.L.Everett JJR, W.C.J.Ross. Aryl-2-halogenoalkylamines. Part XII. Some carboxylic derivatives of NN-di-2-chloroethylaniline. Journal of the Chemical Society. 1953:2386-92.
3. Chloraminophene (Chlorambucil) - ANSM - Résumé Caractéristique du Produit.
4. Ozegowski W, Krebs D. Aminosäureantagonisten. III. ω -[Bis-(β -chloräthyl)-amino-benzimidazolyl-(2)]-propion- bzw. -buttersäuren als potentielle Cytostatika. Journal für Praktische Chemie. 1963;20(3-4):178-86.
5. Cheson BD, Rummel MJ. Bendamustine: rebirth of an old drug. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2009;27(9):1492-501.
6. Levact (Bendamustine) - ANSM - Résumé Caractéristique du Produit. Available from: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0298934.htm>. (consulté en août 2019)
7. Alkeran (Melphalan) - ANSM - Résumé Caractéristique du Produit. Available from: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0223742.htm>. (consulté en août 2019)
8. Bramwell VHC, Mouridsen HT, Santoro A, Blackledge G, Somers R, Verwey J, et al. Cyclophosphamide versus ifosfamide: Final report of a randomized phase II trial in adult soft tissue sarcomas. European Journal of Cancer and Clinical Oncology. 1987;23(3):311-21.
9. Struck RF, Dykes DJ, Corbett TH, Suling WJ, Trader MW. Isophosphoramidate mustard, a metabolite of ifosfamide with activity against murine tumours comparable to cyclophosphamide. British Journal of Cancer. 1983;47(1):15-26.
10. Boal JH, Williamson M, Boyd VL, Ludeman SM, Egan W. ³¹P NMR studies of the kinetics of bisalkylation by isophosphoramidate mustard: comparisons with phosphoramidate mustard. Journal of medicinal chemistry. 1989;32(8):1768-73.
11. Holoxan (Ifosfamide) - ANSM - Résumé Caractéristique du Produit Available from: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0219636.htm>. (consulté en août 2019)
12. Endoxan (Cyclophosphamide) - ANSM - Résumé Caractéristique du Produit. Available from: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0139134.htm>. (consulté en août 2019)
13. Zhang J, Tian Q, Yung Chan S, Chuen Li S, Zhou S, Duan W, et al. Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications. Drug metabolism reviews. 2005;37(4):611-703.
14. Dumez H, Highley M, Guetens G, De Boeck G, Hanauske A, van Oosterom AT, et al. Erythrocytes and the transfer of anticancer drugs and metabolites: A possible relationship with therapeutic outcome. Seminars in Oncology. 2001;28(2F):24-8.
15. Highley MS, Schrijvers D, Van Oosterom AT, Harper PG, Momerency G, Van Cauwenberghe K, et al. Activated oxazaphosphorines are transported predominantly by erythrocytes. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology. 1997;8(11):1139-44.
16. Momerency G, Van Cauwenberghe K, Highley MS, Harper PG, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Partitioning of Ifosfamide and Its Metabolites between Red Blood Cells and Plasma. Journal of Pharmaceutical Sciences. 1996;85(3):262-5.
17. Ben Abid F, Gazzah A, Ousbane A, Gutierrez M, Brain E. Les alkylants. Oncologie. 2007;9(11):751-7.
18. Williams ML, Wainer IW. Cyclophosphamide versus ifosfamide: to use ifosfamide or not to use, that is the three-dimensional question. Current pharmaceutical design. 1999;5(8):665-72.

19. Chen CS, Jounaidi Y, Waxman DJ. Enantioselective metabolism and cytotoxicity of R-ifosfamide and S-ifosfamide by tumor cell-expressed cytochromes P450. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2005;33(9):1261-7.
20. Zhang J, Tian Q, Zhou S-F. Clinical Pharmacology of Cyclophosphamide and Ifosfamide. *Current Drug Therapy*. 2006;1(1):55-84.
21. Lokiec F. Ifosfamide: des propriétés pharmacocinétiques intéressantes pour prévenir la survenue de métastases cérébrales dans certains cancers. *Oncologie*. 2007;9(11):790-4.
22. Cerny T, Castiglione M, Brunner K, Kupfer A, Martinelli G, Lind M. Ifosfamide by continuous infusion to prevent encephalopathy. *Lancet (London, England)*. 1990;335(8682):175.
23. Skinner R, Cotterill SJ, Stevens MC. Risk factors for nephrotoxicity after ifosfamide treatment in children: a UKCCSG Late Effects Group study. United Kingdom Children's Cancer Study Group. *British Journal of Cancer*. 2000;82(10):1636-45.
24. Aleksa K, Matsell D, Krausz K, Gelboin H, Ito S, Koren G. Cytochrome P450 3A and 2B6 in the developing kidney: implications for ifosfamide nephrotoxicity. *Pediatric nephrology*. 2005;20(7):872-85.
25. Woodland C, Ito S, Granvil CP, Wainer IW, Klein J, Koren G. Evidence of renal metabolism of ifosfamide to nephrotoxic metabolites. *Life sciences*. 2000;68(1):109-17.
26. Yonezawa A, Masuda S, Yokoo S, Katsura T, Inui K. Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006;319(2):879-86.
27. Ciarimboli G, Holle SK, Vollenbrocker B, Hagos Y, Reuter S, Burckhardt G, et al. New clues for nephrotoxicity induced by ifosfamide: preferential renal uptake via the human organic cation transporter 2. *Molecular pharmaceutics*. 2011;8(1):270-9.
28. Dossier du CNHIM. Available from: <http://www.cnhim.org/Dossier%20du%20CNHIM%20-%20PDF/dossiers/DOSSIER%202001%20n%B01-2.pdf>. (consulté en août 2019)
29. Kerbusch T, de Kraker J, Keizer HJ, van Putten JW, Groen HJ, Jansen RL, et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of ifosfamide and its metabolites. *Clinical pharmacokinetics*. 2001;40(1):41-62.
30. Le Cesne A, Antoine E, Spielmann M, Le Chevalier T, Brain E, Toussaint C, et al. High-dose ifosfamide: circumvention of resistance to standard-dose ifosfamide in advanced soft tissue sarcomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1995;13(7):1600-8.
31. Berrak SG, Pearson M, Berberoglu S, Ilhan IE, Jaffe N. High-dose ifosfamide in relapsed pediatric osteosarcoma: therapeutic effects and renal toxicity. *Pediatric blood & cancer*. 2005;44(3):215-9.
32. Meazza C, Casanova M, Luksch R, Podda M, Favini F, Cefalo G, et al. Prolonged 14-day continuous infusion of high-dose ifosfamide with an external portable pump: feasibility and efficacy in refractory pediatric sarcoma. *Pediatric blood & cancer*. 2010;55(4):617-20.
33. Kerbusch T, Jansen RL, Mathot RA, Huitema AD, Jansen M, van Rijswijk RE, et al. Modulation of the cytochrome P450-mediated metabolism of ifosfamide by ketoconazole and rifampin. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2001;70(2):132-41.
34. Chen L, Waxman DJ. Cytochrome P450 gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) for cancer. *Current pharmaceutical design*. 2002;8(15):1405-16.

35. Lohr JM, Haas SL, Kroger JC, Friess HM, Hoft R, Goretzki PE, et al. Encapsulated cells expressing a chemotherapeutic activating enzyme allow the targeting of subtoxic chemotherapy and are safe and efficacious: data from two clinical trials in pancreatic cancer. *Pharmaceutics*. 2014;6(3):447-66.
36. Braybrooke JP, Slade A, Deplanque G, Harrop R, Madhusudan S, Forster MD, et al. Phase I study of MetXia-P450 gene therapy and oral cyclophosphamide for patients with advanced breast cancer or melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(4):1512-20.
37. Crook TR, Souhami RL, Whyman GD, McLean AE. Glutathione depletion as a determinant of sensitivity of human leukemia cells to cyclophosphamide. *Cancer Res*. 1986;46(10):5035-8.
38. Vallari RC, Pietruszko R. Human aldehyde dehydrogenase: mechanism of inhibition of disulfiram. *Science*. 1982;216(4546):637-9.
39. Parajuli B, Georgiadis TM, Fishel ML, Hurley TD. Development of selective inhibitors for human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1) for the enhancement of cyclophosphamide cytotoxicity. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. 2014;15(5):701-12.
40. Friedman OM, Papanastassiou ZB, Levi RS, Till HR, Jr., Whaley WM. POTENTIAL CARCINOLYTIC AGENTS RELATED TO CYCLOPHOSPHAMIDE. *Journal of medicinal chemistry*. 1963;6:82-3.
41. Hohorst HJ, Peter G, Struck RF. Synthesis of 4-hydroperoxy derivatives of ifosfamide and trofosfamide by direct ozonation and preliminary antitumor evaluation in vivo. *Cancer Res*. 1976;36(7 pt 1):2278-81.
42. Niemeyer U, Engel J, Scheffler G, Molge K, Sauerbier D, Weigert W. Chemical characterization of ASTA Z 7557 (INN mafosfamide, CIS-4-sulfoethylthio-cyclophosphamide), a stable derivative of 4-hydroxy-cyclophosphamide. *Investigational new drugs*. 1984;2(2):133-9.
43. Mazur L, Opydo-Chanek M, Stojak M, Wojcieszek K. Mafosfamide as a new anticancer agent: preclinical investigations and clinical trials. *Anticancer research*. 2012;32(7):2783-9.
44. Hales BF. Relative mutagenicity and teratogenicity of cyclophosphamide and two of its structural analogs. *Biochemical pharmacology*. 1983;32(24):3791-5.
45. Ludeman SM, Zon G, Egan W. Synthesis and antitumor activity of cyclophosphamide analogues. 2. Preparation, hydrolytic studies, and anticancer screening of 5-bromocyclophosphamide, 3,5-dehydrocyclophosphamide, and related systems. *Journal of medicinal chemistry*. 1979;22(2):151-8.
46. Farmer PB, Cox PJ. Synthesis and antitumor activity of 6-trifluoromethylcyclophosphamide and related compounds. *Journal of medicinal chemistry*. 1975;18(11):1106-10.
47. Ludeman SM, Zon G. Synthesis and antitumor activity of cyclophosphamide analogs. 1. Benzo annulated cyclophosphamide and related systems. *Journal of medicinal chemistry*. 1975;18(12):1251-3.
48. Martinek T, Forro E, Gunther G, Sillanpaa R, Fulop F. Synthesis and conformational study of 1,3,2-oxazaphosphorino[4, 3-a]isoquinolines: a new ring system. *The Journal of organic chemistry*. 2000;65(2):316-21.
49. Misiura K, Kinas RW, Stec WJ, Kusnierczyk H, Radzikowski C, Sonoda A. Synthesis and antitumor activity of analogues of ifosfamide modified in the N-(2-chloroethyl) group. *Journal of medicinal chemistry*. 1988;31(1):226-30.
50. Studzian K, Kinas R, Ciesielska E, Szmigiero L. Effects of alkylating metabolites of ifosfamide and its bromo analogues on DNA of HeLa cells. *Biochemical pharmacology*. 1992;43(5):937-43.

51. Paci A, Guillaume D, Husson H-P. Synthesis of side-chain-substituted ifosfamide analogs. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 2001;38(5):1131-4.
52. Storme T, Deroussent A, Mercier L, Prost E, Re M, Munier F, et al. New Ifosfamide Analogs Designed for Lower Associated Neurotoxicity and Nephrotoxicity with Modified Alkylating Kinetics Leading to Enhanced in Vitro Anticancer Activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2009;328:598-609.
53. Paci A, Martens T, Royer J. Anodic oxidation of ifosfamide and cyclophosphamide: a biomimetic metabolism model of the oxazaphosphorinane anticancer drugs. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2001;11(10):1347-9.
54. Skarbek C, Lesueur LL, Chapuis H, Deroussent A, Pioche Durieu C, Daville A, et al. Preactivated oxazaphosphorines designed for isophosphoramidate mustard delivery as bulk form or nanoassemblies: synthesis and proof of concept. *Journal of medicinal chemistry*. 2015;58(2):705-17.
55. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology*. 1986;136(7):2348-57.
56. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*. 2000;164(12):6166-73.
57. Bell RB, Feng Z, Bifulco CB, Leidner R, Weinberg A, Fox BA. *Immunotherapy*. 2018:314-40.
58. Desbois M, Champiat S, Chaput N. Lever la tolérance immunitaire en cancérologie. *Bulletin du Cancer*. 2015;102:34-52.
59. Spiotto MT, Yu P, Rowley DA, Nishimura MI, Meredith SC, Gajewski TF, et al. Increasing tumor antigen expression overcomes "ignorance" to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells. *Immunity*. 2002;17(6):737-47.
60. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(4):298-306.
61. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-4.
62. Shang B, Liu Y, Jiang SJ, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*. 2015;5:15179.
63. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine*. 2010;363(8):711-23.
64. Vuagnat P. CS. Immunothérapies anti-checkpoints : aspects fondamentaux. *JNDES*. 2018;n°95.
65. van Ravenswaay Claasen HH, Kluin PM, Fleuren GJ. Tumor infiltrating cells in human cancer. On the possible role of CD16+ macrophages in antitumor cytotoxicity. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1992;67(2):166-74.
66. Cassetta L, Pollard JW. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nature reviews Drug discovery*. 2018;17(12):887-904.
67. Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, Kepp O, Martins I, Ghiringhelli F, et al. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene*. 2010;29(4):482-91.
68. Shurin MR. Dual role of immunomodulation by anticancer chemotherapy. *Nature medicine*. 2013;19(1):20-2.

69. Landreneau JP, Shurin MR, Agassandian MV, Keskinov AA, Ma Y, Shurin GV. Immunological Mechanisms of Low and Ultra-Low Dose Cancer Chemotherapy. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society*. 2015;8(2):57-64.
70. Aston WJ, Hope DE, Nowak AK, Robinson BW, Lake RA, Lesterhuis WJ. A systematic investigation of the maximum tolerated dose of cytotoxic chemotherapy with and without supportive care in mice. *BMC cancer*. 2017;17(1):684.
71. Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(18):6713-21.
72. Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, et al. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res*. 2010;70(8):3052-61.
73. Alizadeh D, Trad M, Hanke NT, Larmonier CB, Janikashvili N, Bonnotte B, et al. Doxorubicin eliminates myeloid-derived suppressor cells and enhances the efficacy of adoptive T-cell transfer in breast cancer. *Cancer Res*. 2014;74(1):104-18.
74. Kodumudi KN, Woan K, Gilvary DL, Sahakian E, Wei S, Djeu JY. A novel chemoimmunomodulating property of docetaxel: suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(18):4583-94.
75. Banissi C, Ghiringhelli F, Chen L, Carpentier AF. Treg depletion with a low-dose metronomic temozolomide regimen in a rat glioma model. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2009;58(10):1627-34.
76. Tanaka H, Matsushima H, Mizumoto N, Takashima A. Classification of chemotherapeutic agents based on their differential in vitro effects on dendritic cells. *Cancer Res*. 2009;69(17):6978-86.
77. Shurin GV, Tourkova IL, Kaneno R, Shurin MR. Chemotherapeutic agents in noncytotoxic concentrations increase antigen presentation by dendritic cells via an IL-12-dependent mechanism. *Journal of immunology*. 2009;183(1):137-44.
78. Wu Q, Allouch A, Paoletti A, Leteur C, Mirjolet C, Martins I, et al. NOX2-dependent ATM kinase activation dictates pro-inflammatory macrophage phenotype and improves effectiveness to radiation therapy. *Cell death and differentiation*. 2017;24(9):1632-44.
79. Galluzzi L, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nature reviews Drug discovery*. 2012;11(3):215-33.
80. Mattarollo SR, Loi S, Duret H, Ma Y, Zitvogel L, Smyth MJ. Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors. *Cancer Res*. 2011;71(14):4809-20.
81. Berenbaum MC, Brown IN. DOSE-RESPONSE RELATIONSHIPS FOR AGENTS INHIBITING THE IMMUNE RESPONSE. *Immunology*. 1964;7:65-71.
82. Curtis JE, Sharp JT, Lidsky MD, Hersh EM. Immune response of patients with rheumatoid arthritis during cyclophosphamide treatment. *Arthritis and rheumatism*. 1973;16(1):34-42.
83. Moore M, Williams DE. Contribution of host immunity to cyclophosphamide therapy of a chemically-induced murine sarcoma. *International journal of cancer*. 1973;11(2):358-68.
84. Steele G, Pierce GE. Effects of cyclophosphamide on immunity against chemically-induced syngeneic murine sarcomas. *International journal of cancer*. 1974;13(4):572-8.

85. Polak L, Geleick H, Turk JL. Reversal by cyclophosphamide of tolerance in contact sensitization. Tolerance induced by prior feeding with DNCB. *Immunology*. 1975;28(5):939-42.
86. Mokyr MB, Dray S. Some advantages of curing mice bearing a large subcutaneous MOPC-315 tumor with a low dose rather than a high dose of cyclophosphamide. *Cancer Res*. 1983;43(7):3112-9.
87. Berd D, Maguire HC, Jr., Mastrangelo MJ. Potentiation of human cell-mediated and humoral immunity by low-dose cyclophosphamide. *Cancer Res*. 1984;44(11):5439-43.
88. Berd D, Mastrangelo MJ. Effect of low dose cyclophosphamide on the immune system of cancer patients: reduction of T-suppressor function without depletion of the CD8+ subset. *Cancer Res*. 1987;47(12):3317-21.
89. Heylmann D, Bauer M, Becker H, van Gool S, Bacher N, Steinbrink K, et al. Human CD4+CD25+ Regulatory T Cells Are Sensitive to Low Dose Cyclophosphamide: Implications for the Immune Response. *PLoS ONE*. 2013;8:e83384.
90. Dimeloe S, Frick C, Fischer M, Gubser PM, Razik L, Bantug GR, et al. Human regulatory T cells lack the cyclophosphamide-extruding transporter ABCB1 and are more susceptible to cyclophosphamide-induced apoptosis: Immunomodulation. *European Journal of Immunology*. 2014;44:3614-20.
91. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2007;56:641-8.
92. Becker JC, Schrama D. The Dark Side of Cyclophosphamide: Cyclophosphamide-Mediated Ablation of Regulatory T Cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013;133:1462-5.
93. Binotto G, Trentin L, Semenzato G. Ifosfamide and Cyclophosphamide: Effects on Immunosurveillance. *Oncology*. 2003;65:17-20.
94. Schiavoni G, Sistigu A, Valentini M, Mattei F, Sestili P, Spadaro F, et al. Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis. *Cancer Res*. 2011;71(3):768-78.
95. Salem ML, El-Naggar SA, Cole DJ. Cyclophosphamide induces bone marrow to yield higher numbers of precursor dendritic cells in vitro capable of functional antigen presentation to T cells in vivo. *Cellular immunology*. 2010;261(2):134-43.
96. Boerrigter GH, Scheper RJ. Local administration of cytostatic drug 4-hydroperoxy-cyclophosphamide (4-HPCY) facilitates cell-mediated immune reactions. *Clinical and experimental immunology*. 1984;58(1):161-6.
97. Kawabata TT, White KL, Jr. Enhancement of in vivo and in vitro murine immune responses by the cyclophosphamide metabolite acrolein. *Cancer Res*. 1988;48(1):41-5.
98. Wegener-Hopfner U, Schmidt RE, Niese D, Hartlapp JH. [Long-term changes in the immune system following cytostatic polychemotherapy in patients with testicular tumors in remission]. *Immunitat und Infektion*. 1984;12(1):39-40.
99. Issels RD. IFOSFAMIDE INDUCED STRESS RESPONSE IN HUMAN LYMPHOCYTES. *Molec Aspects Med*. 1993;14.
100. Botzler C, Kis K, Issels R, Multhoff G. A comparison of the effects of ifosfamide vs. mafosfamide treatment on intracellular glutathione levels and immunological functions of immunocompetent lymphocyte subsets. *Experimental hematology*. 1997;25(4):338-44.

101. Multhoff G. Differential Effects of Ifosfamide on the Capacity of Cytotoxic T Lymphocytes and Natural Killer Cells to Lyse Their Target Cells Correlate With Intracellular Glutathione Levels. *Blood*. 1995;85.
102. Kuppner MC. Ifosfamide impairs the allostimulatory capacity of human dendritic cells by intracellular glutathione depletion. *Blood*. 2003;102:3668-74.
103. Kuppner MC, Bleifuß E, Noessner E, Mocikat R, Hesler Cv, Mayerhofer C, et al. Differential effects of ifosfamide on dendritic cell-mediated stimulation of T cell interleukin-2 production, natural killer cell cytotoxicity and interferon- γ production. *Clinical & Experimental Immunology*. 2008;153:429-38.
104. Delahousse J, Skarbek C, Paci A. Prodrugs as drug delivery system in oncology. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2019.
105. Pavan B, Dalpiaz A, Marani L, Beggiano S, Ferraro L, Canistro D, et al. Geraniol Pharmacokinetics, Bioavailability and Its Multiple Effects on the Liver Antioxidant and Xenobiotic-Metabolizing Enzymes. *Frontiers in pharmacology*. 2018;9:18.
106. Cho M, So I, Chun J, Jeon J-H. The antitumor effects of geraniol: Modulation of cancer hallmark pathways (Review). *International Journal of Oncology*. 2016.
107. Carnesecchi S, Bradaia A, Fischer B, Coelho D, Scholler-Guinard M, Gosse F, et al. Perturbation by geraniol of cell membrane permeability and signal transduction pathways in human colon cancer cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2002;303(2):711-5.
108. Xue Z, Zhang XG, Wu J, Xu WC, Li LQ, Liu F, et al. Effect of treatment with geraniol on ovalbumin-induced allergic asthma in mice. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2016;116(6):506-13.
109. Jayachandran M, Chandrasekaran B, Namasivayam N. Geraniol attenuates oxidative stress by Nrf2 activation in diet-induced experimental atherosclerosis. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*. 2015;26(4):335-46.
110. Martin S, Highley GM, Diane Sawyers, Ernst A. De Bruijn, Hans Prenen⁴, Gunther Guetens⁴, Gert De Boeck⁴, Allan T. Van Oosterom, Janine L. Mansi, Peter R. Blake, Tim Mant, Robert A.A. Maes and Peter G. Harper. The Neurotoxicity and Pharmacokinetics of Oral Ifosfamide *Journal of Analytical Oncology*. 2015;4:13-23.
111. Yule SM, Price L, Pearson AD, Boddy AV. Cyclophosphamide and ifosfamide metabolites in the cerebrospinal fluid of children. *Clinical Cancer Research*. 1997;3(11):1985-92.
112. Skarbek C, Delahousse J, Pioche-Durieu C, Baconnais S, Deroussent A, Renevret P, et al. Poly-isoprenylated ifosfamide analogs: Preactivated antitumor agents as free formulation or nanoassemblies. *International journal of pharmaceutics*. 2017.
113. de Sousa DP, Raphael E, Brocksom U, Brocksom TJ. Sedative effect of monoterpene alcohols in mice: a preliminary screening. *Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of biosciences*. 2007;62(7-8):563-6.
114. Medeiros K, Dos Santos JR, Melo TCS, de Souza MF, Santos LG, de Gois AM, et al. Depressant effect of geraniol on the central nervous system of rats: Behavior and ECoG power spectra. *Biomedical journal*. 2018;41(5):298-305.
115. Brookhaven Instruments Corporation. Available from: <https://www.brookhaveninstruments.com/>. (consulté en août 2019)
116. . Available from: www.azom.com. (consulté en août 2019)
117. Precisionnanosystems. Available from: precisionnanosystems.com

118. Masatoshi Maeki TS, Yusuke Sato, Takao Yasui, Noritada Kaji, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Yoshinobu Baba, Hideyoshi Harashima and Manabu Tokeshi A strategy for synthesis of lipid nanoparticles using microfluidic devices with a mixer structure. Royal Society of Chemistry. 2015;5:46181-5.
119. Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;99(Pt A):28-51.
120. Couvreur P, Reddy LH, Mangelot S, Poupaert JH, Desmaele D, Lepetre-Mouelhi S, et al. Discovery of new hexagonal supramolecular nanostructures formed by squalenylation of an anticancer nucleoside analogue. *Small.* 2008;4(2):247-53.
121. McClements DJ, Rao J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical reviews in food science and nutrition.* 2011;51(4):285-330.
122. Cyclodextrins used as excipients, 2017, EMA/CHMP/495747/2013. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/questions-answers-cyclodextrins-used-excipients-medicinal-products-human-use_en.pdf. (consulté en août 2019)
123. Monnaert V. Comportement de systèmes moléculaires et NP à base de cyclodextrines au niveau de la BHE : application à la délivrance de médicaments vers le cerveau 2005.
124. Stella VJ, He Q. Cyclodextrins. *Toxicologic pathology.* 2008;36(1):30-42.
125. Chapman ME, Hu L, Plato CF, Kohan DE. Bioimpedance spectroscopy for the estimation of body fluid volumes in mice. *American journal of physiology Renal physiology.* 2010;299(1):F280-3.
126. Jaiswal M, Dudhe R, Sharma PK. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech.* 2015;5(2):123-7.
127. Tayeb HH, Sainsbury F. Nanoemulsions in drug delivery: formulation to medical application. *Nanomedicine (London, England).* 2018;13(19):2507-25.
128. Lee SH, Chang MH, Baek KK, Han B, Lim T, Lee J, et al. High-dose ifosfamide as second- or third-line chemotherapy in refractory bone and soft tissue sarcoma patients. *Oncology.* 2011;80(3-4):257-61.
129. Nielsen OS, Judson I, van Hoesel Q, le Cesne A, Keizer HJ, Blay JY, et al. Effect of high-dose ifosfamide in advanced soft tissue sarcomas. A multicentre phase II study of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *European journal of cancer.* 2000;36(1):61-7.
130. Budach W, Budach V, Stuschke M, Schmauder B, Reipke P, Scheulen ME. Efficacy of ifosfamide, dacarbazine, doxorubicin and cisplatin in human sarcoma xenografts. *British Journal of Cancer.* 1994;70(1):29-34.
131. Ettinger DS, Lagakos S. Phase III study of CCNU, cyclophosphamide, adriamycin, vincristine, and VP-16 in small-cell carcinoma of the lung. *Cancer.* 1982;49(8):1544-54.
132. Livingston RB, Einhorn LH, Bodey GP, Burgess MA, Freireich EJ, Gottlieb JA. COMB (cyclophosphamide, oncovin, methyl-CCNU, and bleomycin): a four-drug combination in solid tumors. *Cancer.* 1975;36(2):327-32.
133. Salman H, Perez A, Sparano JA, Ratech H, Negassa A, Hopkins U, et al. Phase II trial of infusional cyclophosphamide, idarubicin, and etoposide in poor prognosis non-Hodgkin's lymphoma. *American journal of clinical oncology.* 2003;26(4):338-43.
134. Avery TL, Roberts D. Adriamycin and cyclophosphamide in combination chemotherapy of L1210 leukemia. *Cancer Res.* 1977;37(3):678-83.

135. Carmel RJ, Brown JM. The effect of cyclophosphamide and other drugs on the incidence of pulmonary metastases in mice. *Cancer Res.* 1977;37(1):145-51.
136. Kanno TYN, Sensiate LA, Paula NAd, Salles MJS. Toxic effects of different doses of cyclophosphamide on the reproductive parameters of male mice. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2009;45:313-9.
137. Goren MP, Wright RK, Pratt CB, Pell FE. Dechloroethylation of ifosfamide and neurotoxicity. *Lancet (London, England).* 1986;2(8517):1219-20.
138. Li H, Fan X, Houghton J. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *Journal of cellular biochemistry.* 2007;101(4):805-15.
139. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine.* 2010;363(8):711-23.
140. Zielinski C, Knapp S, Mascaux C, Hirsch F. Rationale for targeting the immune system through checkpoint molecule blockade in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology.* 2013;24(5):1170-9.
141. Proietti E, Moschella F, Capone I, Belardelli F. Exploitation of the propulsive force of chemotherapy for improving the response to cancer immunotherapy. *Molecular oncology.* 2012;6(1):1-14.
142. Chen G, Emens LA. Chemoimmunotherapy: reengineering tumor immunity. *Cancer immunology, immunotherapy : CII.* 2013;62(2):203-16.
143. Bracci L, Schiavoni G, Sistigu A, Belardelli F. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell death and differentiation.* 2014;21(1):15-25.
144. Taieb J, Chaput N, Scharzt N, Roux S, Novault S, Menard C, et al. Chemoimmunotherapy of Tumors: Cyclophosphamide Synergizes with Exosome Based Vaccines. *The Journal of Immunology.* 2006;176:2722-9.
145. Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol.* 2004;34(2):336-44.
146. Loyher PL, Rochefort J, Baudesson de Chanville C, Hamon P, Lescaille G, Bertolus C, et al. CCR2 Influences T Regulatory Cell Migration to Tumors and Serves as a Biomarker of Cyclophosphamide Sensitivity. *Cancer Res.* 2016;76(22):6483-94.
147. Lutsiak MC, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H. Inhibition of CD4+25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood.* 2005;105:2862-8.
148. Traverso I, Fenoglio D, Negrini S, Parodi A, Battaglia F, Kalli F, et al. Cyclophosphamide inhibits the generation and function of CD8+ regulatory T cells. *Human Immunology.* 2012;73:207-13.
149. Ge Y, Domschke C, Stoiber N, Schott S, Heil J, Rom J, et al. Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome. *Cancer immunology, immunotherapy : CII.* 2012;61(3):353-62.
150. Ben-Efraim S. Immunomodulating Anticancer Alkylating Drugs: Targets and Mechanisms of Activity. *Current Drug Targets.* 2001;2:197-212.
151. Viaud S, Flament C, Zoubir M, Pautier P, LeCesne A, Ribrag V, et al. Cyclophosphamide induces differentiation of Th17 cells in cancer patients. *Cancer Res.* 2011;71(3):661-5.

152. Salem ML, Kadima AN, EL-Naggar SA, Rubinstein MP, Chen Y, Gillanders WE, et al. Defining the Ability of Cyclophosphamide Preconditioning to Enhance the Antigen-specific CD8+ T-cell Response to Peptide Vaccination: Creation of a Beneficial Host Microenvironment Involving Type I IFNs and Myeloid Cells. *Journal of Immunotherapy*. 2007;30(1):40-53.
153. Viaud S, Saccheri F, Mignot G, Yamazaki T, Daille R, Hannani D, et al. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science*. 2013;342(6161):971-6.
154. Pfirschke C, Engblom C, Rickelt S, Cortez-Retamozo V, Garris C, Pucci F, et al. Immunogenic Chemotherapy Sensitizes Tumors to Checkpoint Blockade Therapy. *Immunity*. 2016;44(2):343-54.
155. Le Deley MC, Paulussen M, Lewis I, Brennan B, Ranft A, Whelan J, et al. Cyclophosphamide compared with ifosfamide in consolidation treatment of standard-risk Ewing sarcoma: results of the randomized noninferiority Euro-EWING99-R1 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(23):2440-8.
156. Vela-Ojeda J, Tripp-Villanueva F, Montiel-Cervantes L, Sanchez-Cortes E, Ayala-Sanchez M, Guevara-Moreno ME, et al. Prospective randomized clinical trial comparing high-dose ifosfamide + GM-CSF vs high-dose cyclophosphamide + GM-CSF for blood progenitor cell mobilization. *Bone marrow transplantation*. 2000;25(11):1141-6.
157. Lind MJ, McGown AT, Hadfield JA, Thatcher N, Crowther D, Fox BW. The effect of ifosfamide and its metabolites on intracellular glutathione levels in vitro and in vivo. *Biochemical pharmacology*. 1989;38(11):1835-40.
158. Rios-Doria J, Durham N, Wetzel L, Rothstein R, Chesebrough J, Holoweckyj N, et al. Doxil synergizes with cancer immunotherapies to enhance antitumor responses in syngeneic mouse models. *Neoplasia*. 2015;17(8):661-70.
159. Wei S, Shreiner AB, Takeshita N, Chen L, Zou W, Chang AE. Tumor-induced immune suppression of in vivo effector T-cell priming is mediated by the B7-H1/PD-1 axis and transforming growth factor beta. *Cancer Res*. 2008;68(13):5432-8.
160. Fallon JK, Vandever AJ, Schlom J, Greiner JW. Enhanced antitumor effects by combining an IL-12/anti-DNA fusion protein with avelumab, an anti-PD-L1 antibody. *Oncotarget*. 2017;8(13):20558-71.
161. Juma FD, Rogers HJ, Trounce JR. The pharmacokinetics of cyclophosphamide, phosphoramide mustard and nor-nitrogen mustard studied by gas chromatography in patients receiving cyclophosphamide therapy. *British journal of clinical pharmacology*. 1980;10(4):327-35.
162. Fleming RA. An Overview of Cyclophosphamide and Ifosfamide Pharmacology. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 1997;17(5P2):146S-54S.
163. Giraud B, Hebert G, Deroussent A, Veal GJ, Vassal G, Paci A. Oxazaphosphorines: new therapeutic strategies for an old class of drugs. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2010;6(8):919-38.
164. Stockman GD, Heim LR, South MA, Trentin JJ. Differential Effects of Cyclophosphamide on the B and T Cell Compartments of Adult Mice. *The Journal of Immunology*. 1973;110(1):277-82.
165. Hemendinger RA, Bloom SE. Selective mitomycin C and cyclophosphamide induction of apoptosis in differentiating B lymphocytes compared to T lymphocytes in vivo. *Immunopharmacology*. 1996;35(1):71-82.
166. Menzies AM, Johnson DB, Ramanujam S, Atkinson VG, Wong ANM, Park JJ, et al. Anti-PD-1 therapy in patients with advanced melanoma and preexisting autoimmune disorders or major

toxicity with ipilimumab. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017;28(2):368-76.

167. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, et al. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nature medicine*. 2014;20(1):62-8.

168. Sharma MD, Hou DY, Liu Y, Koni PA, Metz R, Chandler P, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood*. 2009;113(24):6102-11.

169. Sanceau J, Wijdenes J, Revel M, Wietzerbin J. IL-6 and IL-6 receptor modulation by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha in human monocytic cell line (THP-1). Priming effect of IFN-gamma. *The Journal of Immunology*. 1991;147(8):2630-7.

170. Stevanin M, Busso N, Chobaz V, Pigni M, Ghassem-Zadeh S, Zhang L, et al. CD11b regulates the Treg/Th17 balance in murine arthritis via IL-6. *Eur J Immunol*. 2017;47(4):637-45.

171. Regis G, Pensa S, Boselli D, Novelli F, Poli V. Ups and downs: the STAT1:STAT3 seesaw of Interferon and gp130 receptor signalling. *Seminars in cell & developmental biology*. 2008;19(4):351-9.

172. Wilke CM, Kryczek I, Wei S, Zhao E, Wu K, Wang G, et al. Th17 cells in cancer: help or hindrance? *Carcinogenesis*. 2011;32:643-9.

173. Mosely SI, Prime JE, Sainson RC, Koopmann JO, Wang DY, Greenawalt DM, et al. Rational Selection of Syngeneic Preclinical Tumor Models for Immunotherapeutic Drug Discovery. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(1):29-41.

174. Peng J, Hamanishi J, Matsumura N, Abiko K, Murat K, Baba T, et al. Chemotherapy Induces Programmed Cell Death-Ligand 1 Overexpression via the Nuclear Factor-kappaB to Foster an Immunosuppressive Tumor Microenvironment in Ovarian Cancer. *Cancer Res*. 2015;75(23):5034-45.

175. Mimura K, Teh JL, Okayama H, Shiraishi K, Kua LF, Koh V, et al. PD-L1 expression is mainly regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer. *Cancer science*. 2018;109(1):43-53.

176. Zhang N, Zeng Y, Du W, Zhu J, Shen D, Liu Z, et al. The EGFR pathway is involved in the regulation of PD-L1 expression via the IL-6/JAK/STAT3 signaling pathway in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Int J Oncol*. 2016;49(4):1360-8.

177. Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature communications*. 2016;7:12150.

178. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker research*. 2014;2(1):1.

179. Peng KW, Myers R, Greenslade A, Mader E, Greiner S, Federspiel MJ, et al. Using clinically approved cyclophosphamide regimens to control the humoral immune response to oncolytic viruses. *Gene therapy*. 2013;20(3):255-61.

180. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, et al. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *The New England journal of medicine*. 2019.

181. Langer CJ, Gadgeel SM, Borghaei H, Papadimitrakopoulou VA, Patnaik A, Powell SF, et al. Carboplatin and pemetrexed with or without pembrolizumab for advanced, non-squamous non-

small-cell lung cancer: a randomised, phase 2 cohort of the open-label KEYNOTE-021 study. *The Lancet Oncology*. 2016;17(11):1497-508.

182. Liu WM, Fowler DW, Smith P, Dalgleish AG. Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses. *British Journal of Cancer*. 2010;102(1):115-23.

183. Chanut R, Petrilli V. [Cytosolic DNA sensing by the cGAS-STING pathway in cancer]. *Medicine sciences : M/S*. 2019;35(6-7):527-34.

184. Wang H, Hu S, Chen X, Shi H, Chen C, Sun L, et al. cGAS is essential for the antitumor effect of immune checkpoint blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(7):1637-42.

185. Li A, Yi M, Qin S, Song Y, Chu Q, Wu K. Activating cGAS-STING pathway for the optimal effect of cancer immunotherapy. *Journal of hematology & oncology*. 2019;12(1):35.

186. Lockett-Chastain L, Calhoun K, Kemp J, Gallucci R. Immunological difference in Th1 and Th2 dominant mouse strains in an ICD model. (IRM15P.601). *The Journal of Immunology*. 2015;194(1 Supplement):199.13-.13.

187. Jackute J, Zemaitis M, Pranys D, Sitkauskiene B, Miliauskas S, Vaitkiene S, et al. Distribution of M1 and M2 macrophages in tumor islets and stroma in relation to prognosis of non-small cell lung cancer. *BMC immunology*. 2018;19(1):3.

188. Yu M, Guan R, Hong W, Zhou Y, Lin Y, Jin H, et al. Prognostic value of tumor-associated macrophages in pancreatic cancer: a meta-analysis. *Cancer management and research*. 2019;11:4041-58.

189. Najafi M, Hashemi Goradel N, Farhood B, Salehi E, Nashtaei MS, Khanlarkhani N, et al. Macrophage polarity in cancer: A review. *Journal of cellular biochemistry*. 2019;120(3):2756-65.

190. Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer cell*. 2015;27(4):462-72.

191. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(3):787-95.

192. Bryniarski K. The Influence of Cyclophosphamide on Immune Function of Murine Macrophages 2012.

193. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*. 2004;25(12):677-86.

194. Chen L, Wang S, Wang Y, Zhang W, Ma K, Hu C, et al. IL-6 influences the polarization of macrophages and the formation and growth of colorectal tumor. *Oncotarget*. 2018;9(25):17443-54.

195. Aucouturier J, Dupuis L, Deville S, Ascarateil S, Ganne V. Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert review of vaccines*. 2002;1(1):111-8.

196. van Doorn E, Liu H, Huckriede A, Hak E. Safety and tolerability evaluation of the use of Montanide ISA51 as vaccine adjuvant: A systematic review. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2016;12(1):159-69.

197. Jiao Q, Li L, Mu Q, Zhang Q. Immunomodulation of nanoparticles in nanomedicine applications. *BioMed research international*. 2014;2014:426028.

198. Rajan R, Sabnani MK, Mavinkurve V, Shmeeda H, Mansouri H, Bonkougou S, et al. Liposome-induced immunosuppression and tumor growth is mediated by macrophages and mitigated by

liposome-encapsulated alendronate. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2018;271:139-48.

199. Rogers TL, Holen I. Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates. *Journal of translational medicine*. 2011;9:177.

ANNEXE

Liste des publications

Poly-isoprenylated ifosfamide analogs: Preactivated antitumor agents as free formulation or nanoassemblies. Skarbek C, [Delahousse J](#), Pioche-Durieu C, Baconnais S, Deroussent A, Renevret P, Rivard M, Desmaele D, Martens T, Le Cam E, Couvreur P, Paci A. Int J Pharm. 2017 Nov 5;532(2):748-756. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.05.044. Epub 2017 May 22. PMID: 28546071

Prodrugs as drug delivery system in oncology. [Delahousse J](#), Skarbek C, Paci A. Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 2019 Aug ; doi.org/10.1007/s00280-019-03906-2

Oxazaphosphorines combined with immune checkpoint blockers: Dose-dependent tuning between immune and cytotoxic effects. [Delahousse J](#), Skarbek C, Desbois M, Perfettini JL, Chaput N, Paci A. Soumission fin décembre 2019 au journal ImmunoTherapy of Cancer.

Liste des brevets

EP19306332 déposé le 11 Octobre 2019

Liste des communications affichées

- YRLS 2016, Paris (France)
- AACR 2017, Washington (Etats-Unis)
- TAT 2017, Paris (France)
- SFNano 2017, Bordeaux (France)
- EORTC PAMM 2018, Rome (Italie)
- CCE 2018, Paris (France)
- Journées GPCO 2018, Villejuif (France)

Liste des communications orales

- EORTC PAMM 2017, Split (Croatie), prix de la meilleure communication orale

-

Titre : De l'ifosfamide au géranyloxy-ifosfamide : pharmacomodulation pour cibler et moduler l'immunité

Mots clés : ifosfamide, géranyloxy-ifosfamide, pharmacomodulation, immunomodulation

Résumé : L'ifosfamide (IFO) est un alkylant de l'ADN de la famille des Oxazaphosphorines, largement utilisé dans divers protocoles de chimiothérapie. Son utilisation en clinique est néanmoins limitée en raison d'une néphrotoxicité et une neurotoxicité liées aux métabolites tels que le chloroacétaldéhyde. En effet, l'IFO est une prodrogue présentant un profil pharmacocinétique complexe dont la voie métabolique activatrice est minoritaire et la voie toxicogène majoritaire. La pharmacomodulation chimique est une des stratégies proposées afin de contourner la voie toxicogène et ainsi améliorer son utilisation en clinique. Des analogues de l'IFO (géranyloxy-, farnesyloxy-, squalenyloxy-IFO), capables de s'auto-assembler, ont été développés et les études pharmacologiques ont démontré la preuve de concept de pré-activation de l'IFO. Des optimisations galéniques ont été testées en vue d'une application en pré-clinique puis en clinique. Par ailleurs, la proximité chimique de l'IFO et du cyclophosphamide, nous a conduit à mener des études d'immunomodulation afin d'explorer les propriétés immunomodulatrices de l'IFO et du géranyloxy-IFO et d'ouvrir de nouvelles perspectives dans l'utilisation de ces composés en association avec l'immunothérapie.

Title : From ifosfamide to geranyloxy-ifosfamide: pharmacomodulation to target and modulate immunity

Keywords : ifosfamide, geranyloxy-ifosfamide, pharmacomodulation, immunomodulation

Abstract : Ifosfamide (IFO) is an alkylating agent of the DNA from Oxazaphosphorine family, widely used in various chemotherapy protocols. However, its clinical use is limited due to nephrotoxicity and neurotoxicity related to metabolites such as chloroacetaldehyde. Indeed, IFO is a prodrug characterized by complex pharmacokinetic profile with a minority activating metabolic pathway and a majority toxicogenic pathway. Chemical pharmacomodulation is one of the strategies proposed to bypass the toxicogenic pathway and thus improve its clinical use. IFO analogues (geranyloxy-, farnesyloxy-, squalenyloxy-, squalenyloxy-IFO), able to self-assembly, have been developed and pharmacological studies have demonstrated the proof of concept for the pre-activation of IFO. Galenic optimizations have been tested for pre-clinical and clinical application. In addition, due to the chemical similarity of IFO and cyclophosphamide, immunomodulation studies have been conducted to investigate the immunomodulatory properties of IFO and geranyloxy-IFO with the hope of new perspectives in the use of these compounds in combination with immunotherapy.