

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE MEDECINE  
Ecole doctorale BIOLOGIE SANTE

Année 2011

**Radioimmunothérapie préciblée  
sur modèle animal de métastases de cancer colorectal  
d'origine humaine**

**THÈSE DE DOCTORAT**

Discipline : Biologie, Médecine et Santé

Spécialité : Médecine Nucléaire

*présentée*

*et soutenue publiquement par*

**Eric FRAMPAS**

Le 20 Septembre 2011, devant le jury ci-dessous

**Rapporteurs :** Pr P. Bourguet

Pr J-P. Vuillez

**Examineurs :** Pr J-F. Chatal

Pr F. Kraeber-Bodéré

Pr B. Dupas

**Directeur de thèse :** Dr J. Barbet

## PLAN DE THESE

<b>CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	1
<b>I- INTRODUCTION</b> .....	2
<b>II-TRAITEMENT DES METASTASES HEPATIQUES</b>	
<b>D'ORIGINE COLORECTALE</b> .....	4
II.1. La chirurgie.....	4
II.2. La chimiothérapie.....	6
II.3. Les traitements locaux : radiofréquence, cryothérapie.....	9
II.4. La radiothérapie.....	12
II.4.1. Externe conformationnelle.....	12
II.4.2. Interne sélective.....	13
II.5. L'immunothérapie.....	15
II.5.1. Ciblage antigénique : l'antigène carcinoembryonnaire (ACE).....	15
II.5.2. Immunothérapie anti ACE.....	19
II.5.3. Radioimmunothérapie et CCR.....	20
- Principes.....	20
- Ciblage direct.....	21
- Techniques de préciblage.....	23
- Technologie "Dock and Lock" .....	28
II.5.4. Radionucléides.....	31
<b>CHAPITRE II : OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE</b> .....	39

<b>CHAPITRE III : MODELE ANIMAL</b> .....	41
<b>I. RESUME</b> .....	42
I. 1. Matériels et méthodes.....	42
I. 2. Résultats.....	44
<b>II. ARTICLE</b> .....	49
<b>III. DISCUSSION</b> .....	50
<b>CHAPITRE IV : OPTIMISATION DU PRECIBLAGE</b>	
<b>ET ETUDE DOSIMETRIQUE</b> .....	58
<b>I. RESUME</b> .....	59
I.1. Matériels et méthodes.....	60
I.2. Résultats.....	65
<b>II. ARTICLE</b> .....	83
<b>III. DISCUSSION</b> .....	84
<b>CHAPITRE V : THERAPIES</b> .....	94
<b>I. RESUME</b> .....	95
I.1. Matériels et méthodes.....	95
I.2. Résultats.....	97
<b>II. DISCUSSION</b> .....	101
<b>CHAPITRE VI : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....	106
<b>CHAPITRE VII : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	109

## **Abréviations**

ACE: Antigène carcinoembryonnaire

AS : Activité spécifique

BLI: Bioluminescence

CCR: Cancer colorectal

EBR: Efficacité biologique relative

EGFR: Epidermal Growth factor Receptor

MH : Métastase hépatique

PM : Poids moléculaire

RF: Radiofréquence

RIT: Radioimmunothérapie

PRIT: Radioimmunothérapie préciblée

RITS: Radiothérapie interne sélective

TEL: Transfert d'énergie linéique

VEGF: Vascular Endothelium Growth Factor

TEP: Tomographie par émission de positons

FDG: Fluoro-déoxy-glucose

## Liste des figures :

<b>Figure 1.</b> Techniques de ciblage en radioimmunothérapie.....	24
<b>Figure 2.</b> Préciblage anticorps bispécifique et haptène marqué.....	27
<b>Figure 3.</b> Principes du Dock and Lock et structure chimique du peptide IMP 325.....	30
<b>Figure 4.</b> Décroissance de l'astate-211.....	35
<b>Figure 5.</b> Evolution temporelle de l'activité bioluminescente.....	46
<b>Figure 6.</b> Corrélation volume et signal de BLI sur tumeurs sous-cutanées.....	46
<b>Figure 7.</b> Evolution de la BLI in vivo après implantation hépatique par voie portale.....	47
<b>Figure 8.</b> Corrélation du signal en BLI et aspect macroscopique.....	47
<b>Figure 9.</b> Corrélations du signal de BLI et de l'aspect macroscopique des métastases hépatiques sur foie explanté.....	48
<b>Figure 10.</b> Cinétique sanguine du TF2 en fonction de la voie d'administration intraveineuse.....	68
<b>Figure 11.</b> Comparaison des données de biodistribution du <sup>125</sup> I-TF2 (0,4 nmol) sur tumeurs sous cutanées 24 h après injection intraveineuse et intrapéritonéale.....	68
<b>Figure 12.</b> Cinétique sanguine comparée après injection de 0,4 nmol de <sup>125</sup> I-F6 et <sup>125</sup> I-TF2.....	69
<b>Figure 13.</b> Autoradiographie du <sup>125</sup> I-TF2 sur tumeurs intrahépatiques.....	69
<b>Figure 14.</b> Profils autoradiographiques de fixation du F6 sur tumeur intrahépatique.....	70
<b>Figure 15.</b> Profils autoradiographiques de fixation du TF2 sur tumeur intrahépatique.....	70
<b>Figure 16.</b> Biodistributions comparées de deux doses de peptide préciblé marqué à l'iode-125 sur tumeurs sous-cutanées.....	72
<b>Figure 17.</b> Rapports des doses entre les deux ratio de préciblage du peptide marqué (0,2 / 0,04 nmol) sur tumeurs sous-cutanées.....	72
<b>Figure 18.</b> Biodistributions comparées après injection du peptide lors des variations de l'intervalle de préciblage (TF2 0,4 nmol, <sup>125</sup> I-IMP 0,04 nmol).....	73
<b>Figure 19.</b> Rapports des fixations tumeurs sur organes sains en fonction de l'intervalle d'injection du peptide préciblé.....	73
<b>Figure 20.</b> Biodistributions comparées au temps 24 h entre tumeurs sous-cutanées et intrahépatiques.....	74

<b>Figures 21.</b> Cinétiques modélisées de l'activité de l'IMP préciblé en fonction du modèle tumoral et du radionucléide.....	78
<b>Figure 22.</b> Evolution temporelle des rapports tumeur/ tissus non tumoraux après injection du peptide préciblé sur tumeurs sous-cutanées.....	79
<b>Figure 23.</b> Biodistribution sur tumeurs sous-cutanées du peptide préciblé marqué au lutétium-177.....	80
<b>Figure 24.</b> Evolution temporelle du signal de BLI sur tumeurs intrahépatiques LS-174T Luc + lors du traitement par bismuth-213.....	97
<b>Figures 25 et 26.</b> Courbes de pseudo-survie des animaux traités par bismuth-213.....	98
<b>Figure 27.</b> Evolution temporelle du nombre de globules blancs lors de la thérapie au bismuth-213.....	99
<b>Figure 28.</b> Evolution temporelle des plaquettes lors de la thérapie au bismuth-213.....	99
<b>Figure 29.</b> Courbe de pseudo-survie des animaux traités par lutétium-177.....	100

**Liste des tableaux :**

<b>Tableau 1.</b> Classification TNM des tumeurs colorectales.....	8
<b>Tableau 2.</b> Survie à 5 ans des patients présentant des métastases hépatiques de CCR.....	8
<b>Tableau 3.</b> Antigènes associés aux tumeurs colorectales.....	18
<b>Tableau 4.</b> Modèles tumoraux de tumeurs d'origine colique chez l'animal.....	52
<b>Tableau 5.</b> Etude de biodistribution du F6 marqué à l'iode-125 sur tumeurs sous-cutanées et intrahépatiques LS-174T.....	66
<b>Tableau 6.</b> Biodistribution comparée du peptide préciblé entre tumeurs LS-174T d'implantation sous cutanée et intrahépatique.....	75
<b>Tableau 7.</b> Biodistribution prolongée du système préciblé sur modèle tumoral sous-cutané LS-174T.....	77
<b>Tableau 8.</b> Résultats des données de biodistribution sur tumeurs sous-cutanées en fonction des doses d'anticorps et de peptide.....	82
<b>Tableau 9.</b> Doses absorbées (Gy) à la tumeur, au rein et au sang en fonction des doses molaires du système de préciblage et du radionucléide employé .....	82

***CHAPITRE I. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES***

## **I - INTRODUCTION**

Le cancer colorectal (CCR) est le deuxième cancer en termes de fréquence dans les pays industrialisés. Un CCR est diagnostiqué toutes les 3,5 minutes et un décès enregistré toutes les 9 minutes dans le monde (1). L'incidence annuelle a atteint 50,6 pour 100 000 habitants entre 2001 et 2005 aux Etats-Unis, plus de 90% des CCR survenant chez des patients âgés de plus de 50 ans. Malgré la mise en place de campagnes de dépistage, plus de 20% des CCR seront encore diagnostiqués à un stade métastatique. Le foie représente alors la première localisation métastatique avant le poumon, restant isolée dans un tiers des cas. Au stade métastatique hépatique, le pronostic reste sombre.

De multiples traitements locaux ou généraux ont été développés afin d'améliorer la survie des patients. Parmi cet arsenal, une place existe pour la radioimmunothérapie (RIT) dont le but est de délivrer une irradiation sélective à la tumeur par injection systémique d'un radionucléide vectorisé à l'aide d'un radiopharmaceutique. Dans le cancer colorectal, une cible antigénique tumorale est représentée par l'antigène carcinoembryonnaire (ACE), également exprimé par d'autres lignées tumorales d'origines digestive, mammaire, pulmonaire et thyroïdienne.

Afin d'assurer une irradiation sélective de la tumeur tout en préservant les organes sains, les techniques de RIT ont progressivement évolué. Parallèlement au ciblage direct à l'aide d'immunoglobulines complètes radiomarquées puis de fragments d'immunoglobulines de taille variable, des techniques dites de préciblage associant des immunoconjugués bispécifiques et des vecteurs de radionucléides de faible masse moléculaire ont été

développées afin de conjuguer sélectivité anti-tumorale et élimination rapide de l'agent radiomarqué non fixé.

Nous nous sommes donc intéressés aux possibilités de la radioimmunothérapie anti ACE par une technique de préciblage sur métastases sous-cutanées et hépatiques de cancer colorectal d'origine humaine chez la souris.

## II - TRAITEMENT DES METASTASES HEPATIQUES D'ORIGINE COLORECTALE

### II.1. La chirurgie :

La chirurgie apparaît actuellement la principale option curative des métastases hépatiques (MH). L'évolution spontanée des MH est variable avec cependant un pronostic sombre, la médiane de survie sans traitement étant de 8 mois, avec une survie à 5 ans de 0 à 1% (2) (**Tableaux 1 et 2**). Si 40% des patients présenteront une évolution secondaire localisée au foie, seuls 10 à 25% resteront éligibles pour la chirurgie (3). En effet, les indications de la chirurgie sont une maladie primaire contrôlée au site d'origine, l'absence de métastase extra hépatique et des MH résécables avec marge suffisante. De nombreux paramètres vont également entrer en ligne de compte : âge physiologique du patient, contre-indications d'ordre général, exhaustivité du bilan d'extension à la recherche de lésions extra-hépatiques, possibilité de résection et de marges suffisantes conservant au moins 20% de parenchyme résiduel. Même lorsque les critères préopératoires sont favorables, 10% des patients ne pourront malgré tout être opérés.

La chirurgie seule permet d'améliorer le pronostic spontané défavorable avec une survie médiane à 5 ans de 23% (15-31%), toutes lésions et marges confondues. Dans le groupe des patients R0 (marges saines), elle atteint 30% (15-67%). Chez les patients présentant les conditions les plus favorables, la chance de guérison peut être estimée à 17-25% (survie > 10 ans après la chirurgie) (4).

Les facteurs identifiés de mauvais pronostic post opératoire incluent le statut N+ de la tumeur initiale, le nombre des lésions hépatiques, une taille > 5cm, un intervalle libre

inférieur à 12 mois entre la tumeur primaire et la découverte des MH, un taux sérique d'ACE supérieur à 200 ng/ml (5). Le premier site de récurrence est hépatique dans 43% des cas, extrahépatique isolé dans 35% et mixte dans 21% dans une série de 1669 patients opérés en intention d'être curateur (6).

L'adjonction de traitements complémentaires (chimiothérapie, traitement local) permet d'atteindre une survie à 5 ans de 32.5% (9-63%) (7, 8).

Si l'obtention d'une marge R0 reste un impératif chirurgical, la présence d'une marge R1 après chirurgie n'était cependant pas associée de façon significative avec une baisse de la survie à 5 ans (57 vs. 60%) en association avec une chimiothérapie. La récurrence hépatique reste par contre plus élevée (9). Une chimiothérapie périopératoire permet de diminuer le stade de la maladie dans 12-38% des cas pour amener le patient à la chirurgie et est également associée à une amélioration significative de la survie globale à 3 ans, l'effet étant moins clair au-delà (10).

L'acte chirurgical reste grevé d'une morbidité de 20 à 50% et d'une mortalité de 2 à 4%, ayant progressivement diminué (1% actuellement dans les centres experts). Une augmentation de la morbidité a été rapportée après chimiothérapie du fait des lésions induites au niveau hépatique (lésions vasculaires après oxaliplatine, stéatohépatite avec l'irinotécan, atteintes sinusoidales). Elle apparaît clairement en rapport avec le nombre de cycle de chimiothérapie administrée (11).

Cette morbidité postopératoire apparaît également comme un facteur de mauvais pronostic dans l'évolution de la maladie (12).

## II.2. La chimiothérapie :

La chimiothérapie reste une thérapie palliative permettant d'augmenter la survie des patients atteints de métastases hépatiques.

Différentes molécules, agissant sur des cibles différentes, sont administrées de façon isolée ou en association.

Le fluoro-uracile (5-FU), de la famille des fluoropyrimidines, associé à l'acide folinique (leucovorine) reste la pierre angulaire de la chimiothérapie des CCR. Il est administré par voie IV (5-FU) ou par voie orale sous la forme d'une pro-drogue (capecitabine, Xeloda<sup>®</sup> ; Roche). Le 5-FU est une pyrimidine fluorée, agissant par inhibition de la thymidylate synthétase. Elle permet un taux de réponse (> 50% de réduction de taille) de 20-30% avec une médiane de survie de 11-12 mois (13). Sa toxicité est essentiellement représentée par la neutropénie et les stomatites.

L'irinotécan (Camptosar<sup>®</sup> ; Pfizer) est un inhibiteur de la topoisomérase I, enzyme agissant lors de la réplication de l'ADN.

L'oxaliplatine (Eloxatin<sup>®</sup> ; Sanofi-Aventis) altère la réplication de l'ADN et induit une apoptose cellulaire.

Leurs effets sont majorés en association avec 5-FU et leucovorine (protocoles FOLFIRI, FOLFOX) avec des taux de réponse de 33 à 62% (14).

De nouvelles molécules ciblées sont apparues plus récemment, sous la forme d'anticorps monoclonaux humanisés, dirigés contre le VEGF (Vascular Endothelium Growth Factor), protéine stimulant la prolifération vasculaire, et formant le groupe des inhibiteurs

de l'angiogénèse (bevacizumab, Avastin<sup>®</sup> ; Genentech) ou contre l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), glycoprotéine transmembranaire impliquée dans la prolifération cellulaire (cetuximab, Erbitux<sup>®</sup> , Imclone Systems ; panitumumab, Vectibix<sup>®</sup> , Amgen). Leur association avec les chimiothérapies classiques permet également une amélioration des résultats. Une médiane de survie supérieure à 20 mois peut alors être obtenue.

Le meilleur résultat est fourni par l'association 5-FU, leucovorine, irinotecan et bevacizumab avec une prolongation de survie de 8 mois (15).

Les buts de la chimiothérapie dans les MH sont multiples. Dans le cas d'une maladie initialement non opérable, elle permet d'atteindre un taux de résection chirurgicale supplémentaire de 12% (16). En cas de maladie d'emblée résécable, une chimiothérapie périopératoire allonge également la survie sans progression.

Les effets d'une chimiothérapie adjuvante post opératoire sont moins démontrés, malgré une tendance observée à une amélioration de la survie globale à 5 ans (non significative).

Afin d'augmenter l'exposition des MH aux médicaments, l'administration par voie artérielle peut également être proposée. Celle-ci peut être isolée, par le biais d'un cathéter placé au niveau de l'artère hépatique, soit associée à une embolisation (17). Si la réponse tumorale semble supérieure à la chimiothérapie par voie systémique dans de nombreuses études, la survie globale n'apparaît pas significativement différente (18).

Après chirurgie, l'association chimiothérapie intra artérielle et systémique est significativement supérieure à la chimiothérapie systémique seule dans le cadre de la récurrence hépatique (19).

Tumeur primitive (T)		
Tx	Non retrouvée	
Tis	Carcinome in situ	
T1	Tumeur envahissant la sous-muqueuse	
T2	Tumeur envahissant la musculaire	
T3	Tumeur envahissant la séreuse	
T4	Envahissement des organes de voisinage, perforée	
Ganglions (N)		
Nx	Non déterminé	
N0	Absence d'atteinte ganglionnaire	
N1	1-3 ganglions métastatiques	
N2	≥ 4 ganglions	
Métastases (M)		
Mx	Non déterminée	
M0	Pas de métastase détectée	
M1	Métastase à distance	
Stade	TNM	Survie à 5 ans (%)
I	T1-2, N0, M0	>90
IIA	T3, N0, M0	80-85
IIB	T4, N0, M0	70-80
IIIA	T1-2, <b>N1</b> , M0	<b>65-80</b>
IIIB	T3-4, N1, M0	50-65
IIIC	T1-4, N2, M0	50-65
IV	T1-4, N0-2, <b>M1</b>	<b>5-8</b>

**Tableau 1.** Classification TNM des tumeurs colorectales et survie à 5 ans en fonction du stade tumoral (20).

Traitement	Survie à 5 ans (%)
Sans traitement	0-1
Chirurgie seule (MH résécable)	23-30
Chirurgie et chimiothérapie périopératoire	30-50
Chimiothérapie seule (MH non résécable)	10

**Tableau 2.** Survie à 5 ans des patients présentant des métastases hépatiques de CCR.

### II.3. Les traitements locaux :

#### - Radiofréquence

La radiofréquence (RF) est une technique de destruction tissulaire locale par échauffement utilisant un train d'onde sinusoïdale de fréquence élevée entre 200 et 3000 KHz provenant d'un générateur, appliqué localement à la tumeur par le biais d'une aiguille électrode et dispersée par des électrodes de surface. Les effets lésionnels sont de trois ordres : faradique, électrolytique et surtout thermique. Cet effet thermique ne correspond pas proprement dit à un échauffement de l'aiguille mais à des phénomènes de vibration moléculaire à proximité avec obtention d'une nécrose ischémique de coagulation pour des températures entre 60 et 90°C. La RF peut s'intégrer dans le schéma thérapeutique, soit dans un but curateur isolé chez des patients non opérables soit en association avec la chirurgie en cas de tumeur non résecable.

Les résultats de la RF ont principalement été comparés à la chirurgie et apparaissent inférieurs (21). Le taux de survie globale à 4 ans est significativement inférieur pour la RF vs. chirurgie (22% vs. 65%) dans une étude portant sur 418 patients (22).

De même, le taux de récurrence locale est supérieur après RF (1,7 à 66,7%) par rapport à la résection (1,2 à 10,4%), toute lésion confondue, avec un temps médian de récurrence plus court (12,2 vs. 31,1 mois) (23, 24). Le risque de récurrence locale est directement lié à la taille, au nombre et à la localisation des métastases (25).

En revanche, si on isole le sous-groupe des lésions de diamètre inférieur à 3 cm, les résultats sont équivalents en termes de survie à 5 ans, ainsi que pour le taux d'absence de récurrence locale offrant une alternative équivalente à la chirurgie (26).

En cas contre-indication chirurgicale, la RF permet d'améliorer la survie à 5 ans. La chimiothérapie seule permet l'obtention d'une médiane de survie inférieure à 24 mois (27). Il a été montré un bénéfice (médiane de survie de 48 mois) lors de l'association de la RF, notamment en première ligne, et de la chimiothérapie des métastases hépatiques non résécables comparativement à la chimiothérapie seule, la présence associée d'une atteinte extra-hépatique restant un facteur de mauvais pronostic (28).

La survie à 5 ans dans les cas les plus favorables (< 5 lésions, taille < 5 cm, absence d'atteinte extra hépatique) est de 34%. Les facteurs significatifs en analyse uni ou multivariée sont le nombre, la taille des lésions tumorales et la présence d'une atteinte extra hépatique (29).

Compte tenu de ces résultats, la radiofréquence ne constitue pas actuellement un traitement de première ligne, souvent proposée en cas d'impossibilité d'exérèse chirurgicale (localisation défavorable, geste trop lourd) en cas de persistance sous chimiothérapie.

Le taux de complication est faible entre 6 et 9% (extrêmes 0-30,7%) avec une mortalité comprise entre 0 et 2%. Les complications les plus fréquentes sont locales, représentées par les abcès, les hémorragies et les lésions biliaires. Même s'il n'est pas noté de différence en termes de fréquence de complication entre chirurgie et RF, les complications les plus graves sont principalement le fait de la chirurgie (30).

- Cryoablation :

A l'opposé de la RF, la cryoablation réalise une destruction tissulaire locale par congélation. Les indications restent superposables à la RF. Un taux de survie globale à 5 ans de 23% a été rapporté dans une étude portant sur 326 patients présentant des métastases non résecables, le taux variant entre 5 et 44% suivant les différentes études (31). Le risque de récurrence locale, principal effet limitant des thérapies locales est voisin de 20% avec un risque de complications faible (32). La taille tumorale (< 3cm) constitue également un facteur pronostique en terme de survie.

- Autres :

D'autres techniques sont en cours d'évaluation telles que l'ablation utilisant des micro-ondes, la thermothérapie interstitielle au laser, les ultrasons focalisés de haute intensité, l'électroporation (33).

A la différence de la voie laparoscopique, l'abord percutané utilisé pour ces différentes techniques expose au risque de sous estimer la présence de lésions hépatiques non détectées sur l'imagerie. De telles lésions sont en effet retrouvées avec une fréquence élevée, jusqu'à 30%, dans une série de 209 patients rapportée par Elias et coll. avec une taille moyenne de  $1,1 \pm 0,7$  cm (34). Une telle fréquence peut alors être source de traitement incomplet et de poursuite évolutive.

## II.4. La radiothérapie

### II.4.1. Externe conformationnelle

En cas de situation défavorable à un traitement local type RF (volume lésionnel, situation périvasculaire), un traitement par radiothérapie externe peut être envisageable. La radiothérapie externe sur le foie est limitée par la radiosensibilité de l'organe avec un risque de lésions radio-induites. Celles-ci se manifestent par une hépatomégalie anictérique, de l'ascite et une élévation des enzymes hépatiques dans les 3 mois suivant la radiothérapie. Contrairement à la radiothérapie externe classique qui délivre une quantité fractionnée sur plusieurs semaines, le but de la radiothérapie stéréotaxique est de délivrer au volume tumoral de façon ciblée une irradiation tumoricide élevée en peu de fractions (en général 3). Les développements techniques ont permis un ciblage optimal des tumeurs par stéréotaxie associée à un monitoring respiratoire des mouvements de la cible. Les effets toxiques sont alors réduits en limitant l'exposition du foie non tumoral à l'irradiation (au moins 700 cc ou 50% du foie au dessous de 15 Gy sur 3 fractions) (35).

Les doses les plus souvent employées consistent en 3 fractions de 12,5, 15 ou 20 Gy. Plusieurs essais de phase I/II rapportent un contrôle local à 1 an entre 71 et 95%, jusqu'à 100% pour le groupe des lésions de moins de 3 cm (36-38).

Les effets toxiques hépatiques restent faibles (0 à 5%) dans ces doses d'irradiation. Il s'agit principalement de toxicité grade 1 à 3 (asthénie à modification biologique enzymatique hépatique). Aucune toxicité hépatique de grade 4 ou 5 n'est rapportée. Les meilleures indications sont des MH de taille inférieure à 5 cm, en nombre restreint (< 3), situées à distance des structures digestives.

#### II.4.2. Interne sélective (RTIS)

Le principe de l'apport sélectif par voie artérielle d'un agent thérapeutique au niveau hépatique s'est développé dans la continuité de la chimiothérapie intra-artérielle. Celui-ci repose sur la vascularisation d'origine artérielle prédominante des MH au contraire de l'apport portal des hépatocytes normaux. L'objectif est de délivrer une dose plus importante d'agent thérapeutique au niveau du foie par un apport plus sélectif. L'irradiation interne est réalisée grâce à des agents émetteurs bêta de haute énergie (yttrium-90 essentiellement, rhénium-188).

L'yttrium-90 est un émetteur bêta pur, d'une énergie moyenne de 0,94 MeV, de demi-vie physique 64,1 heures, avec une pénétration tissulaire entre 2,5 et 5 mm (maximum 10 mm). Cet agent est disponible sous deux formes pharmaceutiques : microsphères non biodégradables de verre où l'yttrium-90 fait partie intégrante du verre (Therasphere<sup>®</sup>-MDS, Nordion, Inc., Ontario, Canada) de calibre  $25 \pm 10 \mu\text{m}$  ou en résine (SIR-Spheres<sup>®</sup>, SIRtex Medical Limited, Sydney, Australie) de calibre  $32 \pm 10 \mu\text{m}$ . Il n'est pas retrouvé de relargage d'yttrium à partir de ces supports. La taille des particules leur permet d'atteindre les vaisseaux tumoraux sans dépasser le lit capillaire.

Les doses empiriques administrées sont de 3, 2,5 et 2 GBq si l'atteinte hépatique est respectivement supérieure à 50% du foie, comprise entre 25 et 50% ou inférieure à 25% (39). Une étude anatomopathologique sur foie explanté après RTIS a observé 90% de nécrose sur des MH, ainsi que des lésions de nécrose centrolobulaire modérée au niveau du foie sain et l'absence de pathologie veino-occlusive pour des doses de 3 à 5 GBq. L'étude

dosimétrique 3D montre la couverture des tumeurs par un nuage de dose de 300 Gy par les sphères, chutant rapidement à 100 Gy dès 4 mm (40).

Afin de délivrer de façon sélective le radioélément au niveau hépatique en préservant les organes de voisinage, un bilan artériographie est réalisé au préalable afin de s'assurer d'une vascularisation hépatique favorable avec embolisation préventive des différents vaisseaux collatéraux à visée digestive. De même, la réalisation d'une scintigraphie à l'aide de macro agrégats d'albumine marqués au technetium-99 permet de s'assurer de l'absence de shunts hépato pulmonaires, un effet shunt > 25% contre-indiquant le traitement du fait des risques de pneumopathie radique.

Deux types de toxicité sont retrouvés. Le premier est représenté par les ulcères digestifs (morbidité de 8%) dont la survenue est liée au passage de particules dans les vaisseaux à visée digestive lors de l'embolisation (41). L'autre est lié aux effets radiques sur le parenchyme hépatique. Un syndrome hépatique associant ictère et ascite a pu être noté dans 20% des cas dans les 60 jours après RTIS (42). Une incidence de maladie hépatique radio-induite de 4% a été rapportée dans une étude sur 680 traitements, plus fréquente lorsque le traitement a intéressé l'ensemble du foie (43). Les formes les plus sévères correspondent à des lésions veino-occlusives avec congestion sinusoidale et de nécrose périveinulaire. La toxicité est également majorée en association avec une chimiothérapie systémique, ce qui n'est pas démontré en cas de chimiothérapie régionale (44).

Le taux de réponse tumoral rapporté, évalué selon des critères morphologiques (WHO, RECIST) varie entre 40 et 73% de rémissions partielles, 15 et 20% de stabilités lésionnelles (41, 45).

Deux essais randomisés ont comparé les résultats de la RTIS en association avec la chimiothérapie. Van Hazel et coll., en 2004 ont montré une amélioration de la réponse tumorale objective, de la survie globale et de la survie sans progression lors de l'association RTIS-chimiothérapie systémique (5FU-leucovorin) mais sur un petit effectif (21 patients) (46). Pour la chimiothérapie régionale, si une amélioration de la durée avant progression hépatique a été observée, la survie globale n'est pas augmentée de façon significative, chez des patients présentant cependant en majorité des formes extra hépatiques associées (47). Les données actuelles ne permettent pas de prouver que la RTIS améliore la survie ou la qualité de vie des patients présentant des MH non opérables. Seule une étude rapporte une réduction tumorale permettant d'envisager secondairement un traitement local par radiofréquence chez 5 des 46 patients (48). Le principal biais de ces séries est la présence dans la plupart d'entre elles d'une atteinte extra-hépatique, influençant la survie globale. L'utilisation du rhénium-188, un autre émetteur bêta, de demi-vie physique 17 h a été décrite, essentiellement dans le cadre du traitement du carcinome hépatocellulaire et de quelques métastases hépatiques (49). L'activité injectée moyenne était de 13,6 GBq afin d'obtenir une dose estimée au foie de 100 Gy. La captation tumorale était de 42% dans la tumeur à 48 h avec une tolérance satisfaisante (50).

## **II.5. L'immunothérapie**

### **II.5.1. Ciblage antigénique : l'antigène carcinoembryonnaire (ACE)**

L'ACE est un marqueur fréquemment utilisé en pathologie tumorale. Il est exprimé par de nombreuses tumeurs (poumon, sein, cancer médullaire de la thyroïde, appareil urinaire)

et notamment dans les cancers colorectaux. Il s'agit d'une macromolécule hautement glycosylée, dont le poids moléculaire est compris entre 150 et 200 kDa. Elle fut détectée dès 1965 sur des extraits de cancer colique humain puis au niveau du sérum de patients présentant certains cancers d'origine colorectale non exclusive par technique radioimmunologique (51). Suite à l'individualisation d'antigènes responsables de réactions croisées tels que le NCA (Non specific Cross-reacting Antigen) ou la BGP (Biliary GlycoProtein), et aux progrès des techniques de clonage moléculaire, a finalement pu être individualisé une famille de molécules comprenant deux sous-groupes : le groupe ACE avec 12 membres et le groupe PSG (Pregnancy-Specific B1 Glycoprotéine) avec 11 membres. Le gène pour l'ACE est localisé sur le bras long du chromosome 19q13.2 dans une région de 1,8 Mb.

L'analyse de la séquence des acides aminés montre que l'ACE appartient à la famille des immunoglobulines (52). Initialement rapportée comme antigène oncofœtal car exprimé dès la période fœtale entre 9 et 14 semaines, son expression persiste au cours de la vie, et l'ACE est normalement présent chez l'adulte au niveau des épithéliums du tube digestif (langue, œsophage, estomac, colon) ainsi que de la prostate ou des glandes sudoripares. Au niveau de l'épithélium colique, l'ACE est exprimé principalement par les cellules matures face à la lumière digestive et au niveau du tiers supérieur des cryptes. Sa production est contrôlée au niveau transcriptionnel (comme le prouve la corrélation avec le niveau d'ARN messager), l'expression étant maximale après migration cellulaire au niveau de la surface épithéliale (compartiment fonctionnel de la muqueuse colique) (53). Sa localisation est exclusive sur la surface apicale des entérocytes (absence sur la surface basolatérale) au niveau du glycocalix constitué de microvésicules. L'ACE est ancré à la surface membranaire par un domaine hydrophobe contenant du phosphatidyl-inositol (54). Il est ensuite relargué pour 90% dans

les selles avec une élimination journalière estimée de 50-70 mg. Ses fonctions incluent une participation à l'immunité innée du fait de sa localisation face à la lumière digestive et à l'environnement bactérien et de son caractère hautement glycosylé avec nombreuses chaînes de type lien G1cNAc asparaginase pouvant interagir avec les bactéries. Une fonction biologique d'adhésion cellulaire par le domaine N-terminal est probable dans les tumeurs, intervenant peu à l'état normal du fait de sa localisation apicale.

L'ACE est une molécule stable, dont l'expression est donc restreinte chez le sujet sain, une très faible quantité pouvant être isolée dans le sérum ( $< 2 \mu\text{g/L}$ ). Dans les tumeurs colorectales, l'expression n'est plus localisée à la seule surface apicale mais se retrouve sur toute la surface membranaire, ainsi que dans la profondeur des glandes tumorales et au niveau intracytoplasmique. Les tumeurs différenciées présentent une expression cellulaire plus marquée avec cependant persistance d'une localisation encore apicale de l'ACE. A l'inverse, la dédifférenciation tumorale s'accompagne d'une perte de la polarisation cellulaire, d'une perte de la membrane basale et d'une accumulation intracytoplasmique favorisant le passage sanguin (55). Une élévation sérique de l'ACE est alors observée chez 30 à 40% des patients atteints de cancer colorectal. La valeur pronostique d'une élévation sérique de l'ACE reste débattue. De nombreux facteurs interagissent, aux conséquences opposées, comme le démontre l'absence de corrélation entre la concentration d'ACE tissulaire et sérique (56,57). L'exploration de l'influence isolée de l'élévation de la concentration sanguine d'ACE sur le potentiel métastasant de plusieurs lignées tumorales colorectales sur un modèle animal n'a pas montré de différence significative (58). D'autres facteurs pronostiques tels que la nécrose, l'infiltration périneurale, le degré d'infiltration tumorale interviennent également dans l'élévation du taux d'ACE sérique.

Catégorie	Antigènes
<b>Spécifiques d'une tumeur individuelle</b> (mutation, non retrouvé à l'état normal)	P53 mutant p21 /ras $\beta$ -caténine TGF- $\beta$ R-II
<b>Partagés par les tumeurs</b>	MAGE GAGE, BAGE-1, SSX-2
<b>Antigènes surexprimés</b>	ACE EGF-récepteur HER-2/neu MUC-1 CO17-1A (GA73/EpCam) Survivine, télomérase, gp72/CD55 Gastrine

**Tableau 3.** Antigènes associés aux tumeurs colorectales

### II.5.2. Immunothérapie anti ACE

Parmi les différents types d'antigènes associés aux tumeurs, l'ACE peut être classé dans la catégorie des antigènes surexprimés associés aux tumeurs colorectales (**Tableau 3**). Cette surexpression tissulaire est présente dans plus de 85% des cancers colorectaux, en faisant une cible potentielle de choix. Les antigènes associés aux tumeurs peuvent être reconnus par les cellules T dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité de type I ou II.

Deux voies sont connues :

- la dégradation intracellulaire puis passage par le biais du réticulum endoplasmique avec association avec des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I et la  $\beta$  microglobuline pour présentation à la surface cellulaire aux lymphocytes T CD8+,
- la présentation par les cellules APC (cellules professionnelles présentatrices d'antigènes: macrophages et cellules dendritiques) des protéines issues des cellules tumorales dégradées via le système lysosomal aux lymphocytes T CD4+ dans le contexte du CMH de type II (59).

Cependant, la présence d'un excès d'antigènes tumoraux ne suffit pas au rejet tumoral. L'absence de facteurs de co-stimulation, particulièrement en cas d'antigènes faiblement immunogènes et présents à l'état normal, entraîne une anergie des cellules T et une tolérance périphérique (60). Ceci est notamment vrai au niveau digestif, où l'on retrouve à la fois une modulation de l'immunité cellulaire pour prévenir des phénomènes d'autoimmunité inadaptée face à la multitude d'antigènes extérieurs mais également la sécrétion par les adénomes et les carcinomes de facteurs immunosuppresseurs (Transforming Growth Factor, Interleukine 10, Leukaemia Inhibitory Factor, prostaglandines) (61).

Différents travaux ont mis cependant en évidence le caractère immunogène potentiel de l'ACE. In vitro, des anticorps humains anti ACE et une prolifération de lymphocytes infiltrant les tumeurs ont été détectés à l'aide d'anticorps anti-idiotype anti ACE chez des patients souffrant de cancer colorectaux et confortés in vivo (62-64).

L'utilisation de virus recombinant permet de pallier l'absence de réponse immunitaire à l'administration d'ACE endogène ou sous forme protéique complète comme retrouvée chez les souris transgéniques exprimant l'ACE (65). Elle associe la création d'une réponse inflammatoire favorable et immune anti ACE. Les différents essais cliniques de phase I et II n'ont cependant pas mis en évidence de réponse tumorale globale objective bien qu'une réponse cellulaire lymphocytaire ait pu être détectée, au prix d'une toxicité minimale (66).

### II.5.3. Radioimmunothérapie (RIT) et cancer colorectal

#### - *Principes*

Les premiers ciblage tumoraux sont apparus dans les années 1950. Depuis, les systèmes de ciblage, les vecteurs et les radionucléides employés se sont multipliés jusqu'à la première autorisation de mise sur le marché de l'<sup>90</sup>Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin®, IDEC Pharmaceuticals Corporation, San Diego, CA, USA) et du <sup>131</sup>I-tositumomab (Bexxar®, Corixa Corporation, Seattle, WA, USA) pour le traitement des lymphomes folliculaires. Quelque soit la technique employée, les objectifs de cette thérapie sont d'obtenir une irradiation tumoricide efficace de la manière la plus sélective possible tout en limitant les effets radiotoxiques sur les organes sains (67).

Si les résultats sont apparus favorables dans le cadre des hémopathies, les effets restent actuellement limités pour les tumeurs solides notamment en cas de masse élevée. La dose tumoricide nécessaire est évaluée à plus de 50 Gy pour obtenir un effet thérapeutique. Pour une fixation de 0.001-0.01% DI /g de tumeur, la dose cumulée estimée est inférieure à 15 Gy, ce qui apparaît insuffisant (68).

- *Ciblage direct :*

Les premiers anticorps radiomarqués employés étaient de type IgG monoclonale complète. Chez l'animal, la captation tumorale est élevée, se situant entre 10 et 30% DI/g (dose injectée par gramme) de tumeur (69). En contrepartie, l'élimination lente entre 1 et 3 jours à prédominance hépatique expose au risque de toxicité médullaire, directement lié au temps de résidence sanguine de la radioactivité. La dose limitante pour la moelle osseuse a été estimée à 4,5 Gy chez l'homme et entre 6 et 9 Gy chez le rongeur (70, 71).

L'utilisation de molécules de plus petite taille (fragments  $F(ab')_2$ , PM 100 kDa ; minibodies, Fab' ; diabodies ; fragments scFV, PM 20-25 kDa) permet de réduire la demi-vie sanguine. Cependant, cette réduction se fait au détriment d'une captation et d'un temps de fixation tumoraux inférieurs. Sur un modèle anti ACE, Sharkey et coll. rapportent des captations tumorales de 30 à 40% DI/g pour des anticorps monoclonaux sous forme IgG, de 11% sous forme  $F(ab')_2$  et de 5% sous forme  $F(ab')$  (72). Alors que les fragments  $F(ab')_2$  et  $F(ab')$  présentent une bonne pénétration tumorale, leur durée de fixation reste inférieure à l'IgG complète (73). L'élimination rénale expose par ailleurs à un risque de néphrotoxicité, majorée lors de l'emploi de radio-métaux réabsorbés et retenus au niveau rénal. Des

techniques de néphroprotection ont été rapportées: perfusion préalable d'acides aminés cationiques, expansion plasmatique par gélofusine, alcalinisation, diurétiques type spironolactone antagonistes des récepteurs de l'aldostérone (74-76).

Plus d'une vingtaine d'essais non contrôlés de phase I ou II sont rapportés dans le cadre du CCR, intéressant essentiellement des patients présentant des masses tumorales importantes résistantes à la chimiothérapie (77). L'ACE représentait la cible préférentielle, quelques essais ayant également intéressé d'autres antigènes tumoraux (TAG-72, A33, Ep-CAM ou CSA-p). Bien que ces essais aient été réalisés dans un but d'étude principalement de radiotoxicité, des résultats favorables ont pu être mis en évidence sous la forme de réponses tumorales partielles ou de stabilités lésionnelles. Les résultats thérapeutiques avec ciblage direct anti ACE chez l'homme restent cependant modestes, Behr et coll. rapportant un effet anti-tumoral chez 12/35 patients traités par une IgG anti ACE marquée à l'iode-131 (70). Dans un autre essai de phase I/II, l'administration d'une dose de 3,2 à 11,1 GBq d'iode-131 à l'aide d'un anticorps murin de type F(ab')<sub>2</sub> anti ACE (F6) chez des patients porteurs de métastases hépatiques permet d'obtenir un résultat favorable (stabilité ou réponse partielle) chez 3 patients sur 9 au prix d'une toxicité hématologique de grade 1 ou 2 pour les doses inférieures à 9,25 GBq. Il est cependant à noter l'apparition d'une réponse immunitaire dirigée contre les anticorps murins (HAMA) chez 3/7 patients (78).

Que cela soit chez l'animal ou chez l'homme, les différentes études s'accordent cependant sur le fait que la maladie métastatique résiduelle de faible volume représenterait la meilleure indication potentiellement curative pour la RIT (79-81). L'administration d'une activité de 300 MBq/kg de lutétium-177 à l'aide d'un anticorps de type IgG dirigé contre une lignée cellulaire CC531 de carcinome colique chez le rat a permis de mettre en évidence une

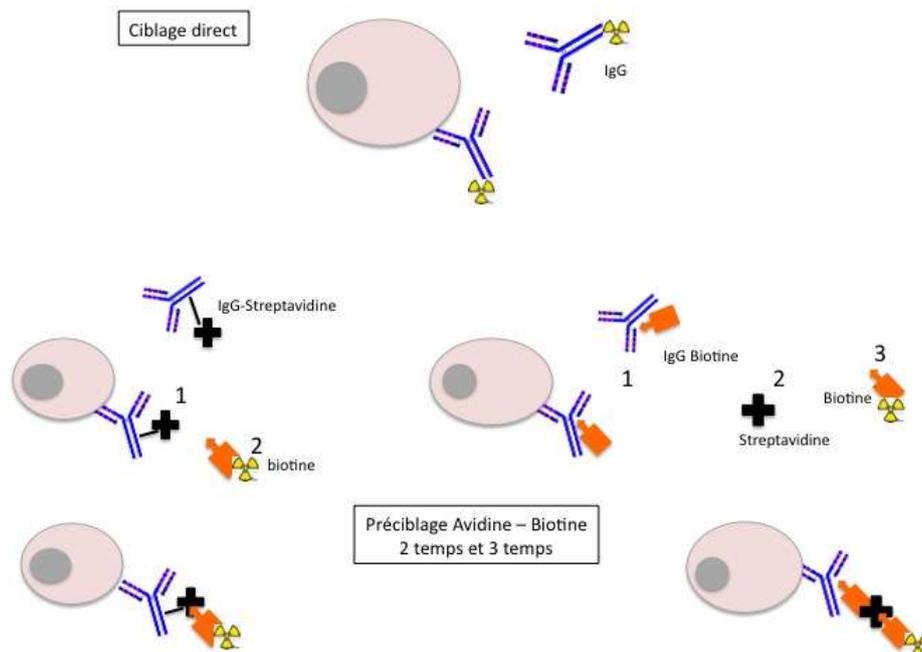
différence significative en termes de survie lors du traitement précoce après implantation tumorale hépatique, effet qui disparaît en cas d'injection retardée (82). Ceci est concordant avec les résultats cliniques obtenus par Liersch et coll. lors de l'utilisation de la RIT en traitement adjuvant après chirurgie hépatique. Le traitement adjuvant de patients à l'aide d'un anticorps monoclonal anti ACE de type IgG1 (labetuzumab) marqué à l'iode-131 après résection curatrice de métastases hépatiques (R0) met en évidence un allongement significatif de la survie médiane par rapport au groupe contrôle (58 vs. 31 mois). Il ne s'agissait cependant pas d'une étude randomisée (83,84).

- *Techniques de préciblage :*

Afin d'obtenir une sélectivité optimale et de limiter la circulation prolongée de l'agent radiomarqué, s'est développé le principe de préciblage. Celui-ci repose sur la séparation entre l'administration de l'agent ciblant (anticorps monoclonal) et d'un agent radiomarqué de faible masse moléculaire. Après fixation tumorale de l'anticorps et élimination de sa forme circulante, la molécule radiomarquée de petite taille à élimination rapide est injectée. Cette méthode a pour but d'augmenter les rapports tumeur/sang et tumeur/organes sains par rapport au ciblage direct.

Plusieurs de ces approches sont basées sur la liaison entre l'anticorps et l'effecteur par le biais du couple avidine ou streptavidine/biotine (85). L'avidine est capable de lier de façon non covalente 4 molécules de biotine avec une constante de liaison très élevée ( $10^{-15}$  M). Le préciblage consiste alors en l'injection première d'un anticorps anti-tumoral couplé à de l'avidine (ou de la biotine) (**Figure 1**). Du fait d'une élimination lente (PM élevé de 175-210 kDa), un intervalle est respecté (1-2 jours) afin de permettre la disparition de la forme

circulante. Une accélération de cette élimination est généralement effectuée par une technique de chasse voire d'adsorption extracorporelle (86). La biotine radiomarquée est alors injectée. Dans une approche en trois étapes, une liaison biotin/avidin/biotine est créée pour optimiser le ciblage et laver les molécules circulantes. Des captations tumorales de 7 à 12% DI/g à 24 heures ont pu être obtenues chez la souris (87,88). Les problèmes majeurs de cette technique sont en premier lieu le caractère immunisant élevé de l'avidine et de la streptavidine (100% des cas dans un essai de phase II sur métastases coliques) limitant la répétition des injections chez l'homme mais également la présence de biotine endogène pouvant interférer dans la réaction (89). Lors d'essais de phase I et II, la toxicité était principalement d'origine digestive. Après injection d'une dose unique de 4,07 GBq/m<sup>2</sup> de biotine marquée à l'yttrium-90, une réponse partielle sur 16 semaines ou une stabilité sur 10 à 20 semaines était obtenue chez respectivement 2 et 4 patients sur 25 souffrant d'un cancer colorectal métastatique (90).



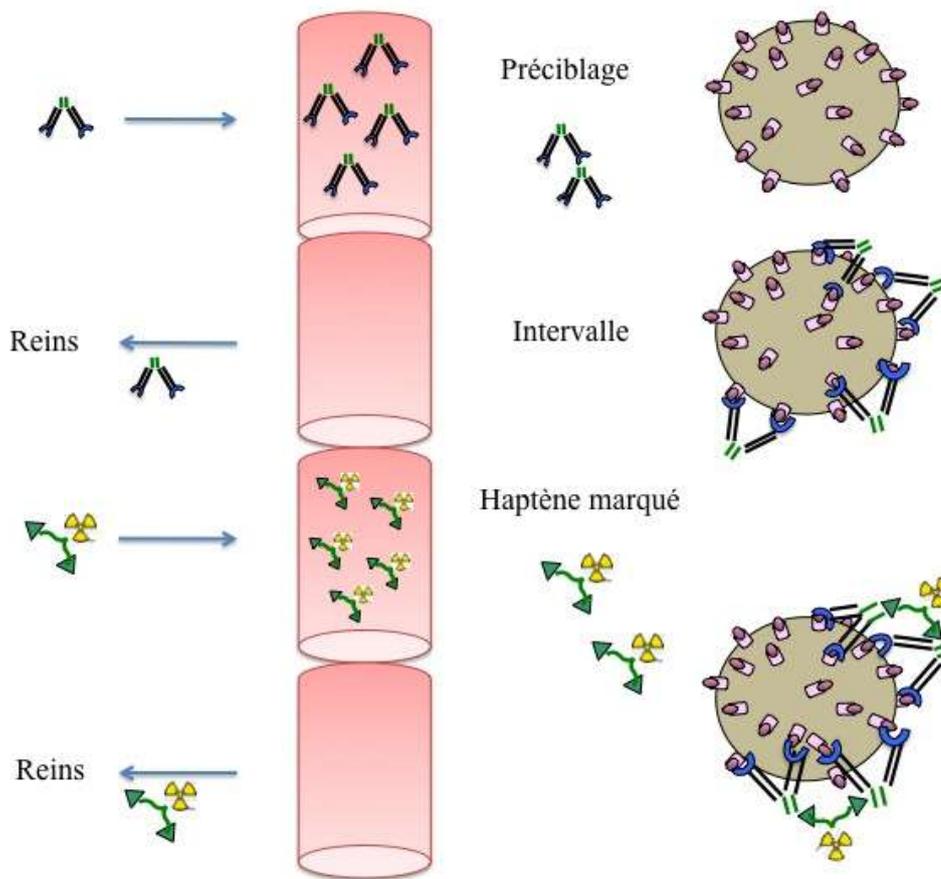
**Figure 1.** Techniques de ciblage en radioimmunothérapie

Une autre approche de préciblage consiste en l'utilisation d'un anticorps bispécifique comprenant un ou deux bras dirigés contre l'antigène tumoral et un bras pour la liaison avec un haptène radiomarqué (**Figure 2**). Le haptène marqué de petit poids moléculaire, comme la biotine marquée, a une élimination rapide. Trois points critiques vont principalement entrer en jeu dans ce système: l'affinité de l'anticorps pour la cible antigénique tumorale afin de maintenir à la fois la spécificité du ciblage et une captation suffisante, l'affinité du haptène pour l'anticorps fixé sur la cible et son activité spécifique (91).

L'utilisation d'un haptène de petit poids moléculaire, à élimination rapide, a pour corollaire un temps de résidence inférieur. Une affinité trop faible du haptène pour l'anticorps expose au risque d'une fixation tumorale faible et rapidement réversible. À l'inverse, une affinité trop forte expose au risque de fixation du haptène à l'anticorps résiduel non fixé à la tumeur. L'affinité du haptène pour l'anticorps fixé doit donc être optimisée. Ceci a été développé à partir des travaux de Le Doussal et de Gautherot et collaborateurs avec le système de réhaussement d'affinité (Affinity Enhancement System, AES) par l'utilisation de haptènes divalents (92). Le but était d'améliorer l'affinité du haptène pour la forme fixée de l'anticorps en comparaison à la forme circulante. Sur un modèle de ciblage lymphocytaire (Ag lyb 8.2), l'étude comparative d'un système de préciblage (AcBs anti-lyb-8.2 x anti dinitrophényl et haptène sous forme mono- ou di-dinitrophényl) met en évidence une supériorité des formes bivalentes à la fois in vitro et in vivo (% DI/g dans la rate de 0,15 à 1,6 vs. 4,5 à 9,6 en fonction des haptènes). Cette affinité accrue serait expliquée par la formation de complexes en pont entre deux anticorps et un haptène bivalent, en comparaison d'une affinité moindre pour la forme circulante (92, 93). Ainsi la forme bivalente s'accompagne d'une augmentation du temps de rétention sur la tumeur

responsable de valeurs d'aires sous la courbe 4 fois supérieures pour la forme bivalente sur un modèle de préciblage anti ACE sur adénocarcinome colique de topographie sous cutanée chez la souris (94). L'utilisation d'un tel système apparaît donc favorable à la réalisation d'une PRIT. Sur un modèle d'adénocarcinome colique chez la souris, un taux de guérison de 33% était obtenu avec la forme bivalente de l'haptène marquée à l'iode-131 contre 0% en cas de ciblage anti ACE direct avec une dose absorbée à la tumeur variant entre 32 et 64 Gy en fonction des protocoles (95).

Enfin, l'activité spécifique du haptène doit être suffisante pour obtenir un effet tumoricide. Une dose de 60-90 Gy est communément admise pour obtenir un effet antitumoral (96). Pour cela, une activité spécifique supérieure à 37 MBq/nmol est alors nécessaire avec un émetteur bêta de type yttrium-90 dans les techniques de préciblage par biotine (97).



**Figure 2.** Préciblage par anticorps bispécifique et haptène marqué

- Technologie "Dock and Lock" :

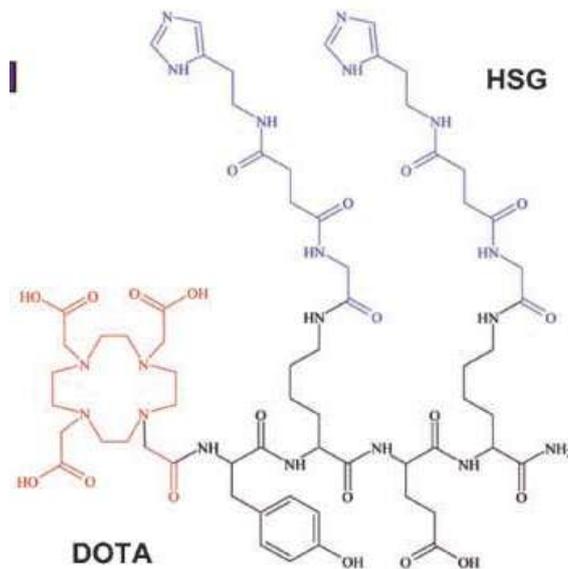
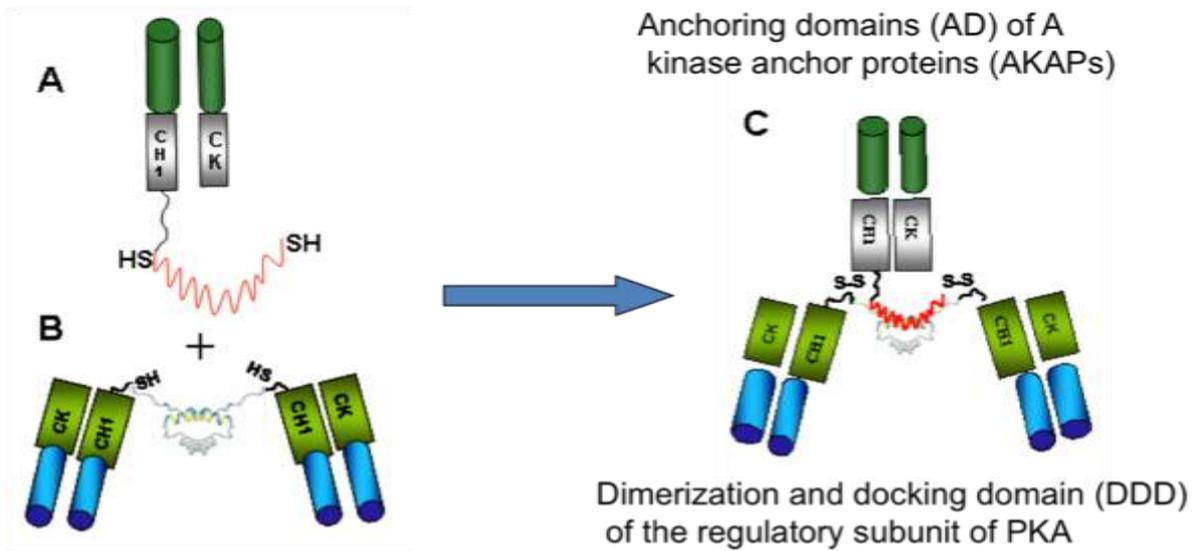
La préparation d'anticorps bispécifiques repose classiquement sur trois techniques possibles : la plus ancienne par voie chimique avec couplage de fragments Fab' à l'aide de liaisons stables thio-ether, l'utilisation de vecteurs selon la technologie d'ADN recombinant et enfin par fusion d'hybridomes produisant les deux anticorps parents (98).

Par ailleurs, Karacay et coll. ont montré une supériorité de la forme bivalente pour l'ACE des anticorps bispécifiques anti ACE x anti DTPA-indium dans le système de précipilage AES sur modèle tumoral sous cutanée de tumeur colique avec le haptène bivalent di DTPA-indium, IMP 192. Cette supériorité intéressait à la fois la captation tumorale de l'anticorps ( $2,6 \pm 0,8$  vs.  $1,5 \pm 0,3\%$  ID/g à 24 h et  $1,4 \pm 0,2$  vs.  $0,4 \pm 0,1$  à 48 h) mais également du haptène marqué ( $9,0 \pm 1,4$  vs.  $5,5 \pm 1,2\%$  DI/g et  $6,4 \pm 1,9$  vs.  $3,7 \pm 0,5\%$  à 3 h et 24 h après injection respectivement) (99). Une nouvelle technique a alors été développée pour la production d'anticorps monoclonaux bispécifiques trivalents, appelée méthode de « Dock and Lock », et mise au point par Rossi et coll. (100). Cette technologie permet de fusionner 3 fragments protéiques de type Fab de manière stable en employant l'interaction spécifique protéine/protéine entre la sous-unité de Protéine-Kinase cAMP-dépendante (Domaine de dimérisation et d'arrimage DDD) et les domaines d'ancrage des protéines kinase A (AD). Un domaine DDD de 44 acides aminés modifié par l'ajout d'un résidu cystéine peut être lié à un composé protéique donné, notamment de type Fab dirigé contre un antigène. Compte tenu de la tendance spontanée à la formation d'un dimère, est alors obtenu un dimère de (Fab), bivalent. Le fragment d'ancrage AD, également modifié par l'ajout de résidus cystéine est lié à un troisième composé de type Fab, anti haptène. La liaison naturelle entre les deux

fragments DDD et AD permet l'obtention d'un composé bispécifique, trivalent : « Dock ». La présence de ponts disulfures assure alors une liaison stable : « Lock » (**Figure 3**).

Le TF2, anticorps humanisé bispécifique trivalent anti ACE, anti HSG est le premier de ces produits. De poids moléculaire 157 kD, il présente une élimination rapide chez la souris, malgré un PM proche d'une IgG, du fait de l'absence de fragment Fc, avec une élimination sanguine proche de 99% seize heures après injection chez la souris. Il reste cependant stable en milieu sérique jusqu'à 7 jours à 37°. Sa fixation sur la cible antigénique est rapide, maximale à 6 h (4%ID/g) pour décroître à 1% vers 16 heures sur un modèle animal de cancer d'origine colique (101).

Les avantages de ce système sont la modularité, permettant de modifier les composés liés en fonction de cibles variées (TF4 : anti CD20 x anti HSG dans les lymphomes non Hodgkiniens, TF10 : anti PAM4 x anti HSG dans les cancers pancréatiques) et une synthèse simple (dosage des composés, ajouts d'oxydo-réducteurs et purification). Le caractère potentiellement immunogène lié aux résidus cystéines sera à évaluer chez l'homme (102).



**Figure 3.** Principes de la technologie Dock and Lock et structure chimique du peptide IMP 325, d'après Rossi (100).

Le choix de l'histamine-succinyl-glycine (HSG) comme haptène est également important. L'HSG est un dérivé de l'histamine qui peut être préciblé avec affinité par un anticorps anti HSG et dont une forme bivalente a pu être produite (104). Initialement marquée à l'iode, le couplage ultérieur à un DOTA (acide tetraazacyclododecanetetraacétique) permet alors l'utilisation de radionucléides variés (105), en particulier celle de l'yttrium-90 dont la liaison avec le DTPA (acide diéthylènetriamine pentaacétique) n'est pas suffisamment stable. De plus, l'anticorps produit contre le haptène DTPA-indium ne reconnaît les complexes du DTPA avec d'autres métaux qu'avec une affinité fortement réduite (94).

La captation tumorale 1,5 heure après injection du haptène préciblé par TF2 atteint  $8,62 \pm 3,53$  % DI/g dans un modèle murin de tumeurs sous-cutanées d'origine colique GW39 contre  $0,44 \pm 0,15$  pour l'haptène injecté seul (105).

La rétention tissulaire du haptène peut également être modifiée en faisant varier la portion peptidique de celui-ci. Une réduction d'un tiers de fixation rénale a ainsi pu être obtenue lors de la modification d'un peptide initial DOTA-anti-HSG IMP 241 en IMP 288 (106).

#### II.5.4. Radionucléides

La radioimmunothérapie préciblée (PRIT) anti ACE utilisant des anticorps et des haptènes bivalents dans le cadre du système AES constitue donc une modalité thérapeutique potentielle de choix dans le cadre du cancer d'origine colorectale. Les peptides conjugués au DOTA permettent un radiomarquage stable avec différents radionucléides.

Deux catégories d'émetteurs sont principalement utilisées : les émetteurs bêta et alpha.

Les principaux émetteurs bêta utilisés en thérapie sont l'iode-131, l'yttrium-90 et le lutétium-177 (107). Si l'irradiation bêta présente un transfert d'énergie linéique (TEL : nombre d'ionisations par unité de trajet) faible (0,2 keV/ $\mu\text{m}$ ) et donc une cytotoxicité moindre, son parcours tissulaire est plus important, de 0,5 à 12 mm (soit 10-1000 diamètres cellulaires). L'action tumoricide est alors majorée par un effet de feu croisé, permettant théoriquement une irradiation locale plus importante en termes de surface. Ceci apparaît intéressant également lorsque la cible antigénique n'est pas accessible ou exprimée par l'ensemble des cellules au sein de la tumeur. La contrepartie est l'irradiation des tissus avoisinants avec un risque toxique. Ces différents émetteurs bêta diffèrent cependant par leur demi-vie, leur énergie maximum et la profondeur de pénétration avec un impact sur leur efficacité thérapeutique en fonction du vecteur et du modèle tumoral utilisé.

L'iode-131 est le radionucléide le plus ancien et le plus couramment utilisé du fait d'un marquage simple et de sa disponibilité. Le traitement par iode-131 des métastases pulmonaires des cancers différenciés de la thyroïde a permis d'améliorer la survie des patients. Une réponse complète était obtenue chez 31% des patients après injection d'une dose de 3,7 GBq d'iode-131. La survie à 15 ans était alors de 89% chez les répondeurs contre 8% chez les non répondeurs. Outre l'âge et la différenciation histologique, les facteurs pronostiques de réponse étaient représentés par la présence d'une fixation tumorale sur les examens scintigraphiques et la faible masse tumorale métastatique au moment du traitement (108).

L'yttrium-90 est un émetteur bêta pur de haute énergie avec un parcours tissulaire de 5 mm, favorable au traitement des tumeurs de taille moyenne. L'émission bêta du lutétium-177, du fait d'une énergie moindre (133 KeV) présente une pénétration moindre dans les tissus, plus favorable au traitement des lésions de petites tailles et aux résidus tumoraux (109). Un risque de toxicité médullaire existe par fixation de l'yttrium libre au niveau osseux (110). La toxicité rénale est également un point clé limitant potentiel. L'utilisation de radiométaux expose au risque accru de toxicité rénale par rétention. Celle-ci semble cependant moindre avec le lutétium-177 comparativement à l'yttrium-90. Une énergie inférieure associée à une pénétration moins marquée serait moins toxique sur le glomérule (111).

Depuis quelques années s'est développée une nouvelle approche exploitant des radionucléides émetteurs alpha. L'émission alpha est constituée d'une particule d'hélium mono énergétique (5,000-8,000 keV). Si près d'une centaine de radionucléides existent, dont la production nécessite pour la plupart un réacteur nucléaire, trois nucléides ont été principalement étudiés du fait de la disponibilité et des impératifs physico-chimiques: l'astate-211, le bismuth-212 et le bismuth-213 et de façon moindre l'actinium-225 (112-115). L'intérêt pour cette émission alpha provient de plusieurs facteurs radiobiologiques: le TEL des alpha est élevé de l'ordre de 100 keV/ $\mu\text{m}$  (60-230), responsable d'une cytotoxicité marquée (5-100 fois/bêta). L'efficacité biologique relative (EBR) est également élevée (3 à 7 en fonction de l'émission). Ce rayonnement alpha est responsable d'altérations plus sévères et complexes de l'ADN avec fragmentations et cassures double brins, dommages chromosomiques. Les radiations à TEL élevé engendrent blocage de la phase G1 du cycle, retard dans la phase G2 de la mitose et apoptose. L'effet sur le cycle cellulaire est à la fois lié

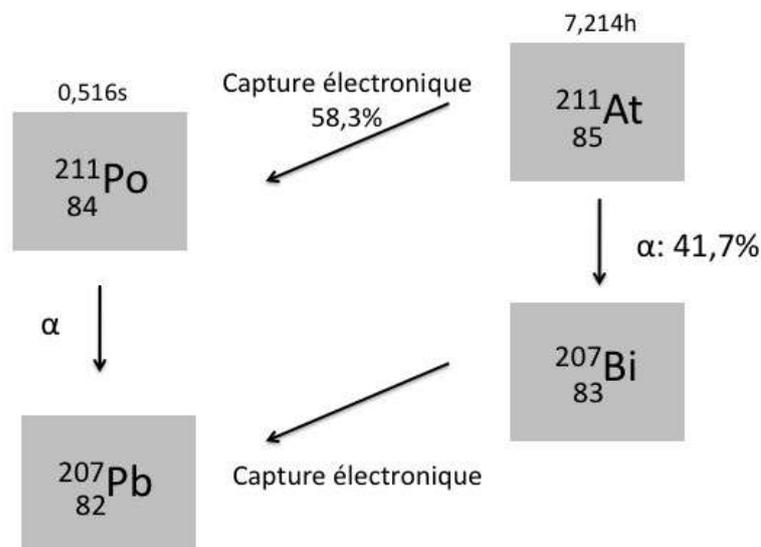
au TEL et à la dose délivrée. La probabilité d'induire une mort cellulaire par une particule alpha est de 20-40%. A l'inverse, son parcours moyen est faible (50-100  $\mu\text{m}$  = 2 à 10 cellules) correspondant à un nombre élevé de phénomènes d'ionisation dans un diamètre cellulaire. L'irradiation alpha semble donc plus adaptée à un faible volume tumoral de façon ciblée, préservant les tissus sains adjacents.

L'utilisation d'un haptène de petite taille à élimination rapide a pour but de limiter les effets toxiques des radionucléides au niveau des organes sains et principalement de la moelle osseuse et des reins. Cela implique par contre la nécessité d'une fixation rapide sur la tumeur compte-tenu de la demi-vie courte de ces radionucléides. La dose toxique à la moelle, représentant une fraction de l'activité sanguine, a été estimée à 4,5 Gy chez l'homme et des estimations à partir des irradiations externes à 30 et 23 Gy respectivement pour le foie et les reins (116,71).

Le bismuth-213 est l'émetteur alpha le plus couramment exploré en radioimmunothérapie. Sa demi-vie plus courte (46 mn) permet de délivrer rapidement la dose aux tissus. Malgré un certain nombre de facteurs contraignants tels que la disponibilité d'un générateur et la nécessité d'une procédure de marquage rapide, la préparation d'anticorps marqué est possible de façon reproductible (117). Le bismuth-213 présente également une néphrotoxicité, lié à la fois au passage de l'anticorps marqué au niveau des reins mais également par fixation et incorporation spécifiques de la fraction libre sur des protéines métallothionéine-like au niveau des cellules rénales avec une accumulation corticale. Le seuil d'apparition d'une néphropathie chronique a été évalué à 11,5 Gy de dose absorbée aux reins après injection de PAI2 marqué (plasminogen activator inhibitor type 2).

Le degré de sévérité est alors linéaire avec l'augmentation de dose (118). A partir d'un modèle de tumeurs ovariennes greffées en sous cutané, la dose administrée présentant une balance effet thérapeutique/toxicité admissible a été mesurée à 11,1 MBq lors de l'injection intraveineuse de fragments scFv. Une telle activité s'accompagnait cependant d'une perte de poids supérieure à 10% au dixième jour. Des doses inférieures apparaissaient inefficaces, les doses supérieures s'accompagnant d'une mortalité élevée (100% et 40% pour 23,7 et 14,8 MBq respectivement) (119).

L'astate-211 présente une demi-vie de 7,2 heures et décroît vers le plomb-207 stable selon deux voies (bismuth-207 par émission alpha (41,7%) et polonium-211 après capture électronique (58,3%)) avec émission de particules alpha d'énergie moyenne 6,8 MeV.



**Figure 4** : Décroissance de l'astate-211, tirée de (113).

Le marquage des anticorps à l'aide d'astate-211 est possible sans modifier leur affinité ni leur spécificité pour les épitopes respectifs avec des activités spécifiques obtenues variant entre 30 et 40 MBq/mg (120). Le marquage d'activités élevées pour la clinique apparaît plus difficile, se heurtant à des facteurs radiolytiques liés à l'importance de l'énergie déposée. Des phénomènes de réduction ainsi engendrés par la radiolyse des substrats sont responsables de l'apparition de formes réduites d'astate, gênant les réactions de marquage (121). La deuxième difficulté provient de l'approvisionnement en astate du fait du nombre limité d'accélérateurs capables de le produire. La demi-vie courte de l'astate-211 ne semble pas être un problème compte tenu de la captation tumorale précoce et de la clairance rapide des organes sains dans le modèle de préciblage. Les études chez l'homme ont principalement porté sur des thérapies intracavitaires (glioblastome). Chez l'animal, la comparaison de l'activité absorbée à la tumeur et aux organes entre un anticorps marqué à l'iode-131 et à l'astate-211 sur modèle sous-cutané de gliome a montré des niveaux d'activité comparables, démontrant une stabilité du marquage avec une dose à la moelle estimée à 0,4 cGy/mCi (122). Les études de radiotoxicité à l'aide d'anticorps monoclonaux marqués à l'astate-211 mettent en évidence, pour les doses les plus élevées, des lésions cardiaques de fibrose périvasculaire du septum interventriculaire, une myélotoxicité, une atrophie pulpaire rouge splénique. La dose létale de 10% des animaux variait entre 46 et 102 kBq/g (123). Concernant la toxicité rénale après radioimmunothérapie à l'astate-211, il est noté une altération dose-dépendante de la capacité de filtration rénale, d'apparition retardée, liée à une atteinte à la fois mésangiale (prolifération, et majoration de la matrice) mais également tubulaire et glomérulaire pouvant aboutir après un délai de 6 mois à une atrophie. Bäck et coll. rapportent qu'une dose absorbée au rein de 7,5-11 Gy (valeur ne tenant pas compte du RBE associé) est responsable d'une altération de 50% de la fonction

rénale chez la souris dans un délai de 31-67 semaines après traitement par un anticorps monoclonal F(ab')<sub>2</sub>. Ceci est à comparer aux doses estimées toxiques après irradiation externe de 23 et 28 Gy responsables d'un risque de néphrite avec insuffisance rénale de 5 et 50% respectivement dans les 5 ans (116, 124).

Des travaux ont également porté sur le potentiel de l'actinium-225 comme radionucléide émetteur alpha. La première voie de production de l'actinium-225 provient de la décroissance du thorium-229 permettant au terme d'un processus de séparation des produits de dégradation (radium et actinium) s'étalant sur 6 semaines d'obtenir une quantité de l'ordre de 3,7 GBq avec une pureté de 96,09 à 99,99% (125). L'autre voie de production provient de l'irradiation protonique de radium-226 dans un cyclotron. La pureté obtenue apparaît comparable à la voie du thorium et les quantités produites peuvent atteindre 0,48 GBq à partir de 30,1 mg de radium-226 (126). La toxicité de l'actinium-225 est liée à une rétention accrue de la forme libre au niveau du foie, du squelette et des reins. La dose maximale tolérée lors de l'injection d'un chélate CHX-DTPA-<sup>225</sup>Ac a été mesurée à 185 kBq liée à la fois à la dose injectée mais également à la toxicité de la forme libre du fait de l'instabilité du complexe. Pour une dose injectée de 92 kBq, la dose absorbée à l'organe est de 8 Gy à la moelle et de 4,5 Gy à la rate, responsable d'une aplasie lymphoïde complète dans ces organes, et de 30 Gy au foie avec présence de dommages réversibles. Ceci souligne la nécessité d'une stabilité du marquage (127). Les produits de désintégration de l'actinium-225 participent également à la néphrotoxicité de cet isotope. Chez la souris, pour une activité injectée de 12,9 kBq à l'aide d'une immunoglobuline IgG<sub>1</sub> marquée, les doses absorbées estimées au rein et au cortex rénal sont de 27,6 et 38,8 Gy respectivement. Les parts des produits de dégradation dans cette dose absorbée sont de 43% pour le bismuth-

213, 28,6% pour l'astate-217, 25,7% pour le francium-221 et de façon négligeable 2% pour l'actinium-225. La demi-vie de 10 jours de l'actinium-225 pourrait participer à une irradiation accrue au niveau rénale associée à ces produits de dégradation (128).

***CHAPITRE II. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE***

La radioimmunothérapie est un outil thérapeutique développé depuis une décennie grâce à différents anticorps et radionucléides. Encourageants dans le cadre des lymphomes non Hodgkiniens, les résultats obtenus dans le cadre des tumeurs solides restent actuellement moins favorables.

Les buts de ce travail sont :

- la mise en place et la validation d'un modèle de métastases intrahépatiques chez la souris nude à partir d'une lignée cellulaire LS-174T d'adénocarcinome colique d'origine humaine exprimant l'ACE et transfectée avec le gène de la luciférase, l'appréciation de l'apport de la bioluminescence (BLI) pour le suivi de la croissance tumorale,
- l'étude de l'influence de la localisation tumorale (tumeurs intrahépatiques vs. sous-cutanées) en termes de résultats de biodistributions à l'aide de systèmes de ciblage direct par anticorps anti ACE (F6) et de préciblage anti ACE (anticorps bispécifique trivalent anti ACE x anti HSG TF2 et haptène bivalent di-HSG, peptide IMP 325 marqué à l'iode-125),
- l'optimisation du système de préciblage anti ACE pour augmenter la dose délivrée à la tumeur (doses molaires, rapport anticorps-peptide, intervalle d'injection),
- la réalisation d'études dosimétriques à partir des données de biodistributions du système de préciblage en fonction de différents radionucléides potentiellement utilisables en thérapie,
- la mise en place préclinique d'essais de radioimmunothérapie préciblée chez la souris (bismuth-213 et lutétium-177) selon les paramètres d'optimisation précédents.

***CHAPITRE III : MODELE ANIMAL***

## **I. RESUME**

La mise en place d'un modèle tumoral animal représente la première étape de ce travail.

Celui-ci doit répondre à plusieurs impératifs :

- être adapté à la problématique explorée,
- présenter des conditions physiopathologiques de développement les plus proches possibles de l'état naturel,
- avoir une facilité d'implantation et de surveillance.

Dans cette optique, nous avons cherché à évaluer la faisabilité d'un modèle de micrométastases hépatiques d'adénocarcinome colique par injection intraportale en utilisant une lignée cellulaire LS-174T d'origine humaine, transfectée par le gène de la luciférase afin d'apprécier la croissance tumorale par bioluminescence.

Les avantages théoriques de ce modèle sont le respect des conditions pathologiques de dissémination hématogène tumorale d'origine colique et d'implantation hépatique malgré le caractère xénogénique de la greffe ainsi que la possibilité de suivi de croissance tumorale par bioluminescence.

### **I.1. Matériels et Méthodes :**

- Lignée cellulaire :

La lignée LS-174T est une lignée d'adénocarcinome colique d'origine humaine (American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA), exprimant l'ACE qui a été transfectée à l'aide du gène pCMV-Luc<sup>+</sup>-SVNeo codant pour la luciférase (Inserm U540, Montpellier, France).

- Implantation :

L'expérimentation était effectuée sur des souris femelles de type NMRI-nu (nu/nu) âgées de 10-12 semaines et de poids compris entre 20 et 30 g (Janvier<sup>®</sup>, Le Genest St Ile, France).

Pour la voie intraportale, après désinfection cutanée par alcool/polividone iodée, une courte incision était pratiquée sur la partie médiane de l'abdomen. Après mobilisation du lobe hépatique gauche puis repérage du pédicule portal, l'injection intraportale d'une quantité variable de cellules dans un volume constant de 0,1 ml était réalisée par le biais d'une aiguille 30 G.

L'hémostase locale était assurée par compression manuelle du point de ponction pendant 30 secondes pour éviter l'hémorragie ou la dissémination locale.

Pour la voie intrasplénique, les cellules étaient injectées dans le parenchyme après exposition de la rate par une courte laparotomie latérale.

- Exploration par bioluminescence :

Après anesthésie générale par voie intrapéritonéale, 1,2 mg de D-luciférine (FluoProbes<sup>®</sup> Interchim Montluçon France) étaient injectés par voie intrapéritonéale. La quantité de lumière produite par bioluminescence était mesurée à l'aide d'une caméra CCD refroidie (PhotonImager<sup>®</sup>, Biospace). Une image en noir et blanc de référence était alors acquise.

Chaque animal était exploré séparément 8 minutes après l'injection du substrat pour une période de 3 minutes. Une image en pseudo-couleur était générée, représentant l'intensité lumineuse (croissante du bleu au rouge) puis une mesure quantitative du nombre de photons émis était effectuée sur la surface abdominale à l'aide du logiciel Photonvision+ (Biospace). Ces images étaient ensuite fusionnées. Ce protocole était standardisé afin d'assurer une reproductibilité inter-individu et inter-examen.

## I.2. Résultats :

### - Injection en cellules isolées :

Plusieurs quantités de cellules ont été injectées après trypsinisation (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 2 et  $3 \times 10^6$  cellules dans un volume de 0,1 ml de PBS).

A J20, aucune lésion n'était détectée macroscopiquement pour les valeurs de 0,1 et  $0,5 \times 10^6$  cellules. Avec une quantité d'un million de cellules, des métastases hépatiques étaient obtenues dans moins de 30% des cas. Pour les valeurs supérieures, les résultats étaient superposables avec une viscosité plus importante majorant le risque d'injection avec diffusion juxtaportale.

Après injection intrasplénique de  $5 \times 10^6$  cellules isolées, la présence de métastases hépatiques n'était obtenue que chez 20% des souris (n=5) à 5 semaines.

### - Injection en agrégats cellulaires :

Dans un deuxième temps,  $1 \times 10^6$  cellules étaient injectées dans un volume identique après simple grattage sans trypsinisation préalable, afin d'obtenir des agrégats cellulaires. Des lésions hépatiques étaient obtenues dans 100% des cas.

Une exploration de la vitalité cellulaire était réalisée après passage par une aiguille 30G à l'aide d'un colorant vital (éosine 0,15%). Le pourcentage de cellules mortes n'était pas significativement différent entre cellules isolées et en amas (6 et 10% respectivement).

- BLI :

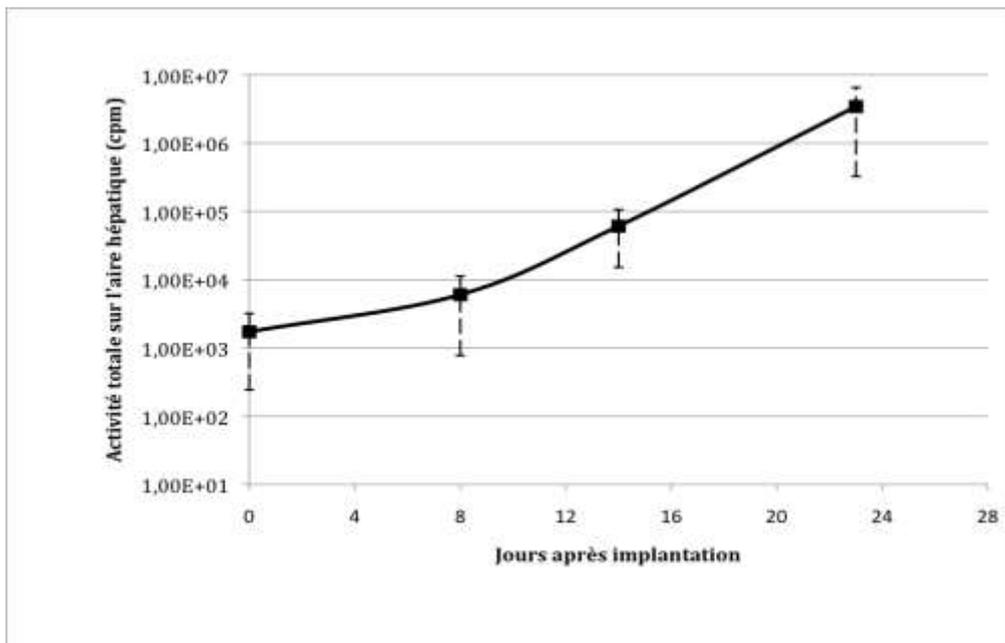
Immédiatement après injection intraportale de  $10^6$  cellules, une activité de bioluminescence était détectable sur l'aire hépatique confirmant la dispersion intrahépatique des cellules (valeur moyenne  $745 \pm 282$  cpm, n=9 souris).

La croissance tumorale était ensuite suivie de façon régulière, permettant d'apprécier la progression tumorale (**Figure 5**).

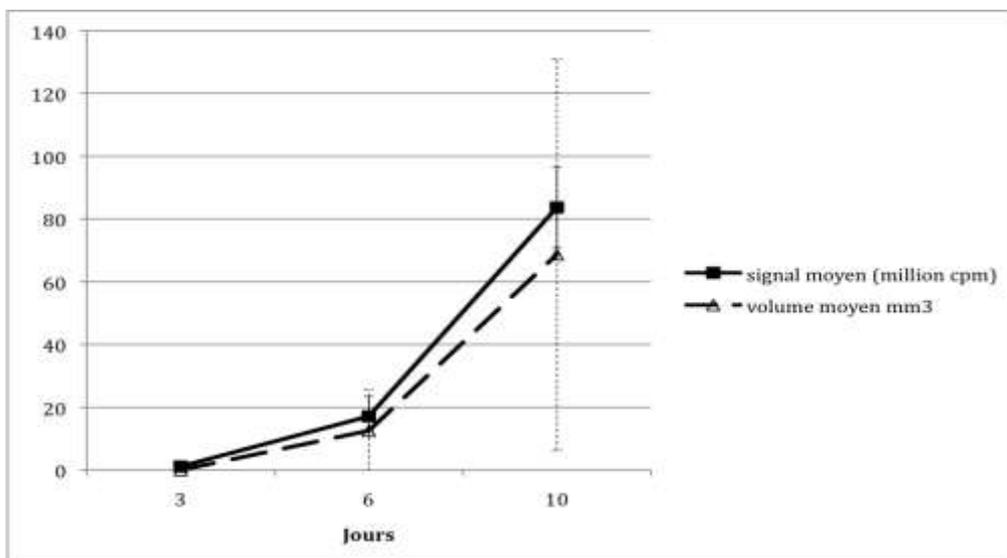
Sur les temps les plus précoces, entre J 0 et J 6, la vitesse de croissance n'apparaissait pas uniforme. Deux populations pouvaient être isolées, correspondant à une croissance plus ou moins rapide. Ceci peut refléter une certaine hétérogénéité dans la quantité et/ou la taille des agrégats injectés.

Dans le cadre des tumeurs sous-cutanées, il existait une bonne corrélation entre la valeur du signal de BLI (en millions cpm) et le volume tumoral ( $\text{mm}^3$ ) (**Figure 6**).

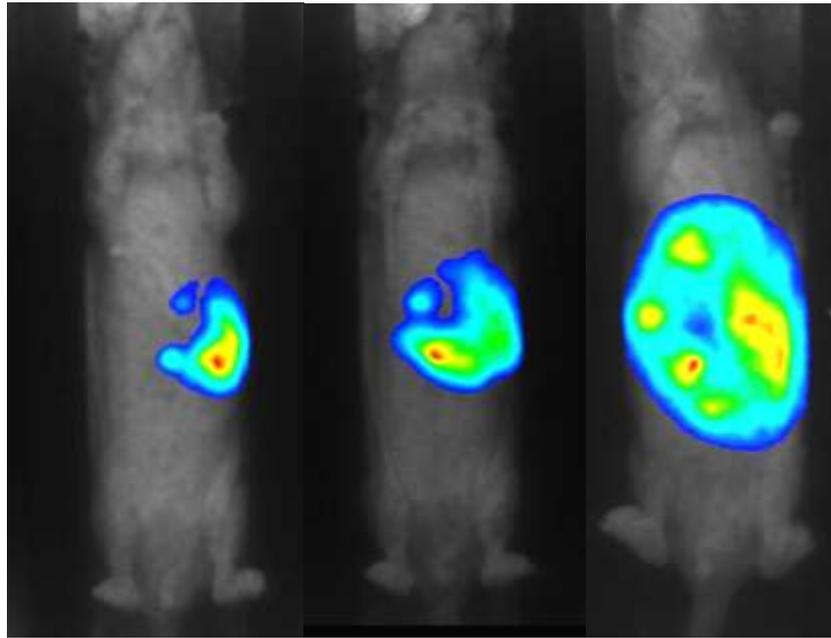
Par contre, il était difficile de corréler le signal de BLI et le poids tumoral pour les métastases hépatiques. La quantification tumorale ne pouvait être évaluée qu'à partir de lésions macroscopiquement visibles, ne tenant donc pas compte des tumeurs microscopiques ou plus diffuses. La valeur seuil arbitraire de 1 million de cpm correspond à des tumeurs macroscopiques multiples réséquées d'un poids total de 150 mg environ. Les valeurs dépassant 30 millions de cpm correspondent à des envahissements massifs du foie (**Figures 7 à 9**).



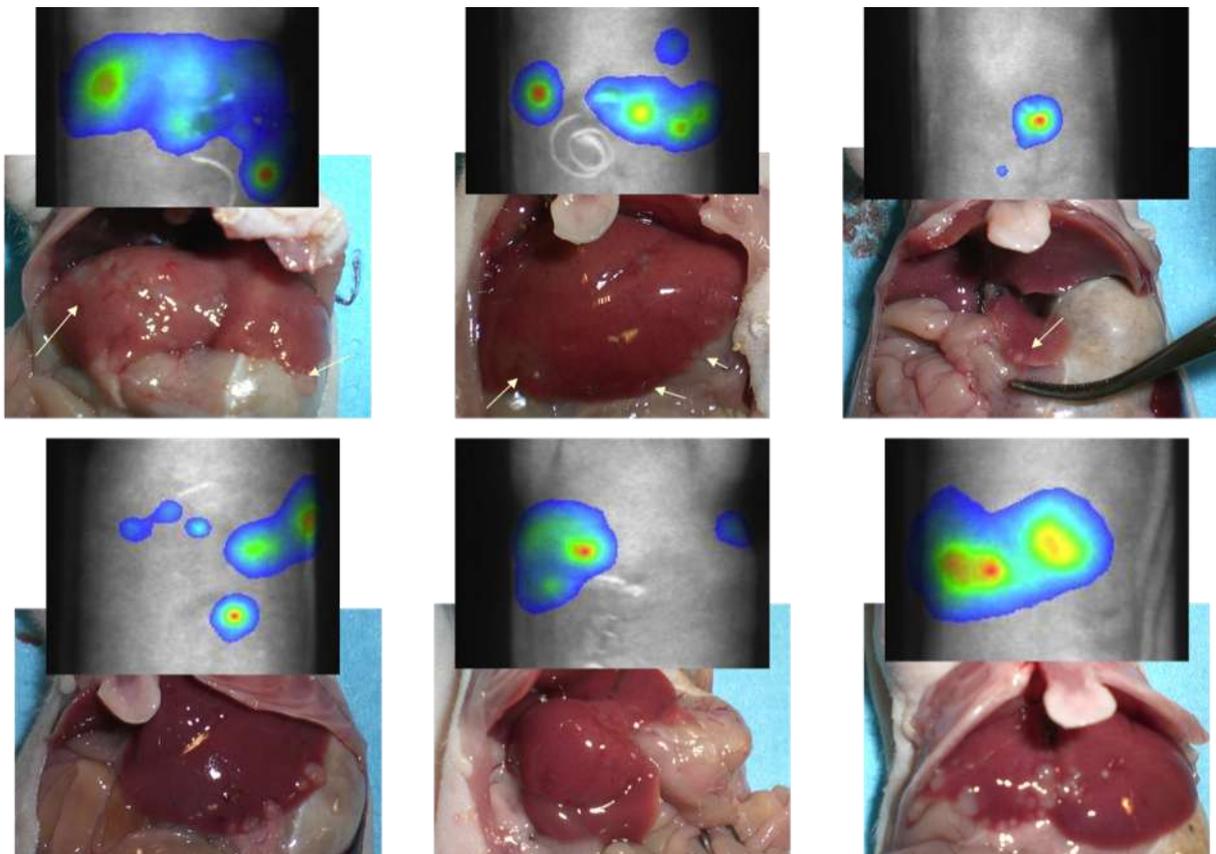
**Figure 5.** Evolution temporelle de l'activité bioluminescente en fonction du temps après injection intraportale de  $10^6$  cellules LS-174T Luc+ (groupe de 4 souris).



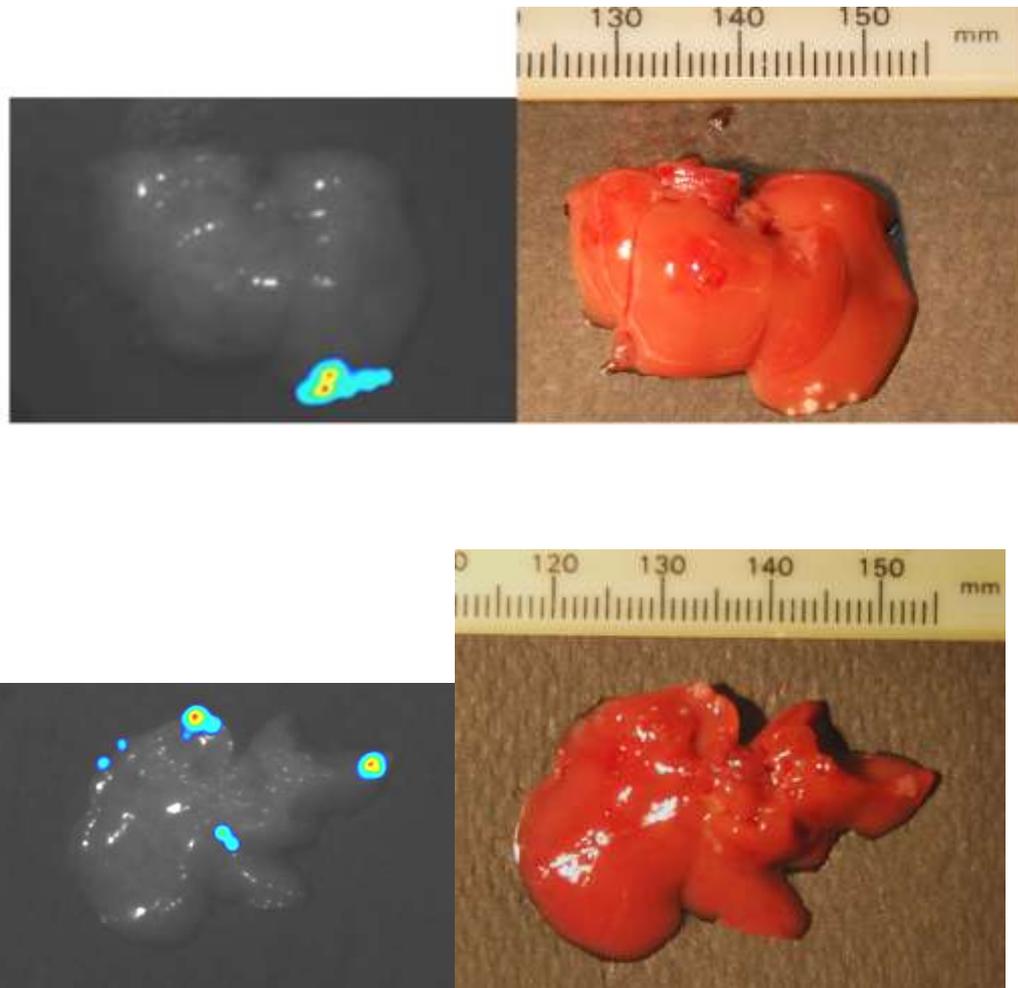
**Figure 6.** Corrélation volume et signal de bioluminescence sur tumeurs de localisation sous-cutanée.



**Figure 7.** Evolution de la bioluminescence in vivo après implantation hépatique par voie portale.



**Figure 8.** Corrélation du signal en bioluminescence et aspect macroscopique.



**Figure 9.** Corrélations du signal de bioluminescence et de l'aspect macroscopique des métastases hépatiques sur foie explanté.

## II. ARTICLE

## Original article

**The intraportal injection model for liver metastasis: advantages of associated bioluminescence to assess tumor growth and influences on tumor uptake of radiolabeled anti-Carcinoembryonic antigen antibody**

Eric Frampas, Catherine Maurel, Philippe Thedrez, Patricia Remaud-Le Saëc, Alain Faivre-Chauvet and Jacques Barbet

**Background** Radioimmunotherapy is emerging as a new tool for adjuvant therapy of colorectal cancer. The liver remains the main site for metastases, carrying a high mortality rate. Many animal models are available but none associates easy, has reliable implantation and in-vivo follow-up for experimental therapeutic studies. The aims of this study were to develop a reliable hepatic metastatic colonic cancer model in mice using the intraportal route for injection, with follow-up by bioluminescence (BLI) and to evaluate the impact of tumor location on tumor antigen direct targeting using radiolabeled anti-CEA (carcinoembryonic antigen) antibodies.

**Methods** Ls-174T Luc+ is a colon carcinoma cell line strongly expressing CEA, transfected with the luciferase gene for BLI. Isolated or aggregated cells ( $1 \times 10^6$ ) were injected through the portal vein. The tumor burden was investigated using BLI to assess hepatic implantation and growth kinetics. The biodistribution of the  $^{125}\text{I}$  anti-CEA antibody fragment (F6) was studied in this model and was compared with subcutaneous implantation.

**Results** The tumor implantation rate was 100% using aggregated cells compared with 26.6% of isolated cells. Photons emitted by  $1 \times 10^6$  cells were detected by BLI immediately after injection and allowed visual confirmation of hepatic distribution. The tumor growth was assessed over time to select homogeneous groups of animals.

**Background**

Colorectal cancer (CRC) represents the third most common cancer in industrialized countries. Despite increasing 5-year relative survival rates, metastatic stages at diagnosis still have a poor prognosis with a 5-year survival of approximately 9% [1]. Hepatic metastases are the main ways of spread in CRC and nearly 40% of these patients will have a disease confined to the liver [2]. For them, surgery still remains the only potential curative therapy. Nevertheless, less than 10% of these patients will undergo hepatic resection, with a postoperative mortality rate of 4.3%, improving 5-year survival to 25–37% [3,4]. New therapies have emerged, including local therapies such as radiofrequency or general therapies with new

Radiolabeled anti-CEA antibody biodistributions showed a significantly higher uptake in hepatic than in subcutaneous tumors.

**Conclusion** The association of hepatic tumor graft through the portal route and BLI provides a reliable animal model and permits sensitive in-vivo detection and follow-up of hepatic metastases. The hepatic model seems to more closely reproduce colon cancer metastases compared with subcutaneous metastasis. The hepatic model is of particular interest for studying radioimmunotherapy. *Nucl Med Commun* 00:000–000 © 2010 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Nuclear Medicine Communications 2010, 00:000–000

**Keywords:** bioluminescence, carcino-embryonic antigen, colon carcinoma, liver metastasis, pretargeting, radioimmunotherapy

Centre de recherche en cancérologie de Nantes-Angers CRCNA, Université de Nantes, INSERM UMR 892, 9 Quai Moncousu, Nantes, France

Correspondence to Dr Eric Frampas, MD, Centre de recherche en cancérologie de Nantes-Angers CRCNA, Université de Nantes, INSERM UMR 892, 9 Quai Moncousu, Nantes 44035, France  
Tel: +33 0240084190; fax: +33 0240084192;  
e-mail: eric.frampas@chu-nantes.fr

Eric Frampas, Catherine Maurel, Philippe Thedrez, and Jacques Barbet contributed to the animal model conception

Catherine Maurel, Patricia Remaud-Le Saëc, and Alain Faivre-Chauvet contributed to radiolabeling

Received 6 September 2010 Revised 19 October 2010  
Accepted 19 October 2010

chemotherapies, antiangiogenic treatments, and targeted therapies. A phase II trial of carcinoembryonic antigen (CEA) radioimmunotherapy showed a 5-year survival rate improvement after liver metastases resection, as adjuvant therapy to eliminate isolated or small clusters of residual tumoral cells [5,6].

To test therapeutic efficiency, animal models of CRC metastases are needed. The requirements for successful animal models have been emphasized and should include faithful reproduction of the biology of human cancer, specific locations of metastases, reliability, reproductibility, and objective endpoints of therapeutic responses [7]. The other main point for a model is to solve a specific

experimental question. Subcutaneous tumor graft remains the easiest model to appreciate tumor growth and potential effects of therapy. As we know, subcutaneous metastases are rare in colonic cancers and this model may not reflect physiopathological conditions. Models of liver metastases have been developed using splenic or portal routes of inoculation [8], tumor growth being mainly appreciated by postmortem analysis [9]. With regard to therapy studies, the main difficulties are to select comparable groups of animals because of individual differences of tumor growth and to evaluate potential responses to therapy using in-vivo techniques. Blood tumor markers such as CEA, when expressed, may partially reflect tumor growth and may have been used in several studies. Imaging techniques such as ultrasound, MRI, positron emission tomography are not always available for small animals and lack sensitivity. Bioluminescence (BLI) imaging is based on the detection of emitted light generated through the reaction of luciferase and a substrate, luciferin, in the presence of ATP and oxygen. In-vivo BLI is a new tool providing reliable data about tumor growth and allows longitudinal follow-up by repeated examinations [10].

The objectives of this study were (i) to propose a reliable animal model of hepatic CRC metastases; (ii) to appreciate hepatic tumor growth with BLI using colonic carcinoma cells expressing the firefly luciferase gene; and (iii) to compare subcutaneous and hepatic tumor models in terms of tumor activity uptake using biodistributions of  $^{125}\text{I}$ -labeled anti-CEA targeting antibody (F6) and autoradiographs.

## Methods

### Cell line

LS174T is a human carcinoma cell line originally obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA), which strongly expresses CEA. The cells were transfected with the luciferase expressing *pCMV-Luc<sup>+</sup>-SVNeo* gene and were selected to obtain a stably transfected cell line (INSERM U540, Molecular and Cellular Endocrinology of Cancers Unit, Montpellier, France). The cells were grown in a monolayer culture in RPMI 1640 (Sigma Aldrich, St Louis, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Biowest, Paris, France) and 1% glutamine under standard conditions. The cells were counted after brief trypsinization under optical microscopy using hematoxylin-eosin. Two types of cells were prepared: isolated cell suspension after trypsinization and aggregated cells by mechanical means without trypsinization and suspended in a physiological serum.

Viability of isolated and aggregated cells was assessed using hematoxylin-eosin by optical microscopy 1 h and 6 h after injection by a 30 G needle.

### Animal models

All surgical procedures were performed in accordance with institutional guidelines.

Naval Medical Research Institute-nu (nu/nu) female mice (Janvier, Le Genest St Ile, France, aged 10–12 weeks, weight 20–25 g) were housed under standard conditions (standard diet and water *ad libitum*). They were anesthetized by an intraperitoneal injection of 0.2 ml of the anesthetic (30 ml PBS, 80 mg/kg of 5 ml ketalar ketamine, 15 mg/kg of 3 ml rompun 2%, from Coveto, Montaigu, France).

For hepatic tumors, the abdomen was cleaned with alcohol and povidone iodine and a short median incision was made. After peritoneum incision, the left hepatic lobe was mobilized to expose the portal vein. LS-174T Luc + aggregated or isolated cells ( $1 \times 10^6$  suspended in 0.1 ml sterile physiological serum) were injected in the portal vein by a 30 G needle. Hemostasis was obtained by pressure on the injection site with a cotton swab for 30 s to avoid hemorrhage and peritoneal spread. The peritoneum and skin were closed with 4-0 resorbable vicryl sutures. No death related to the intraportal procedure occurred.

For subcutaneous tumors,  $1 \times 10^6$  isolated cells in 0.2 ml of sterile physiological serum were injected in the flank. For BLI study,  $5 \times 10^6$  cells were injected and external tumor volume was measured with correlation with the BLI signal over time.

### Bioluminescence parameters

D-Luciferin (potassium salt; FluorProbes Interchim Montluçon France) was dissolved in sterile deionized water and aliquots were stored at  $-20^\circ\text{C}$ .

The mice were anesthetized and the substrate was injected into the peritoneal cavity (1.2 mg per mice). BLI was measured with a highly sensitive cooled charge coupled device camera (PhotonImager, BiospaceLab, Paris, France). A grayscale body surface reference image was collected in a light-tight chamber. Eight minutes after the injection of D-luciferin, mice lying on the back were imaged separately with an integration time of 3 min. A pseudocolor image representing light intensity (blue least intense and red most intense) was generated and the total photon counts were quantified with the Photonvision + software (Biospace) measuring the abdominal region in each mouse, to fit the hepatic region. Grayscale and pseudocolor images were superimposed using the Photonvision + software.

To compare BLI quantification and tumor weight, the animals were killed. All hepatic macroscopical tumors were resected from the surrounding liver and weighed.

For ex-vivo BLI, D-luciferin was injected in the intraperitoneal cavity. The mice were first evaluated under standard BLI conditions. The mice were killed and the livers were immediately resected and a new BLI measurement was achieved.

### Radiolabeling

F6, an anti-CEA antibody (Fab')<sub>2</sub> fragment, 100 kDa, was labeled with  $^{125}\text{I}$  using iodogen. F6 (4.8 nmol) in a

0.1 mol/l phosphate buffer, pH 7.2, and  $^{125}\text{I}$  (100  $\mu\text{Ci}$ ) were incubated for 15–30 min at 20°C in an iodogen-coated tube (100  $\mu\text{g}$  iodogen per tube). The reaction was stopped by transferring the radioactive solution into a fresh tube and the radiolabeled F6 was purified by gel filtration on a PD10 column (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Radiochemical purity was assessed on 1  $\mu\text{l}$  of the solution by precipitation with trichloroacetic acid. After centrifugation, the amount of  $^{125}\text{I}$  bound to the antibody was measured in the precipitate using a  $\gamma$ -scintillation counter (1480 Wizard 3<sup>rd</sup> Wallac, Turku, Finland). Specific activity was 18  $\mu\text{Ci}/\text{nmol}$ .

#### Pharmacokinetics and biodistributions

$^{125}\text{I}$ -labeled F6 antibody (0.4 nmol in 0.1 ml of phosphate buffer, activity 8.3  $\mu\text{Ci}$ ) was injected through the tail vein.

Biodistribution was assessed at three time points after injection (3, 24, and 48 h).

Groups of three to four mice were used for each time point. Animals were killed by cervical dislocation. Tumors were dissected from the surrounding liver. Blood, normal liver, spleen, one kidney, and a muscle fragment were collected and weighed, and the amount of radioactivity was measured using a  $\gamma$ -scintillation counter in parallel with a calibrated radioactive decay standard. The results are expressed as the mean percentage of injected dose per gram of tissue (%ID/g)  $\pm$  standard deviation.

#### Autoradiographs

The intraportal tumor model was used. Seven days after cell graft, tumor growth was appreciated using BLI to confirm hepatic tumor graft. The mice were killed 24 h after the injection of the labeled F6 molecule. The livers were harvested and embedded in hemicellulose with a calibration sample of  $^{125}\text{I}$ . The hemicellulose block was frozen and 30- $\mu\text{m}$ -thick sections of the livers and the calibration samples were cut using a cryoma crotome (Cryomacrocut, Leica, Deerfield, Illinois, USA). The sections were mounted on transparent tape and exposed to phosphor screens directly for 1 h at 20°C. Radioactivity images were scanned using a Phosphorimager (Molecular Dynamics, Orsay, France). The micro-biodistribution of the radiolabeled antibody was studied using a pixel-by-pixel analysis.

#### Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using the nonparametric student's *t* test for rank data because of the small numbers of animals.

## Results

### Metastasis formation

The viability, measured 1 h and 6 h after the injection through a 30 G needle was not significantly different between isolated or aggregated cells (respectively, 94 and

90%). After the injection of  $1 \times 10^6$  isolated cells, tumor grafts were obtained in only 27% of 15 mice, despite standardized conditions compared with 100% of the cases with the same amount of aggregated cells. For later experiments, only aggregated cells were used.

### In-vivo analysis of hepatic colonization

Immediately after tumor graft using the portal route, BLI detected activity over the hepatic area with a mean total activity count of 1733 cpm (standard deviation 1180), followed by an exponential tumor growth (Fig. 1). On day 23, the mice had to be killed because of advanced disease.

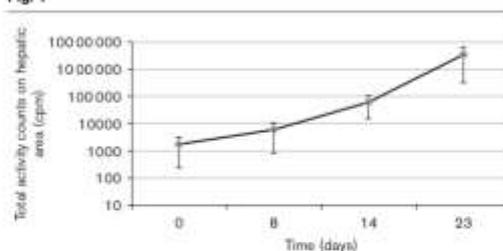
Excised hepatic nodules (150 mg) corresponded to a BLI signal greater than  $1 \times 10^6$  cpm. No secondary decrease in the signal was registered despite advanced disease, even when ascites was present. Fig. 2 shows the correlation between focal external BLI signal and macroscopic lesions. The BLI signal of small metastases could still be detected a few minutes after liver explantation (Fig. 3).

The comparison of the BLI external signal and the external tumoral volume in subcutaneous tumors showed parallel growth over time (Fig. 4).

### Biodistribution studies

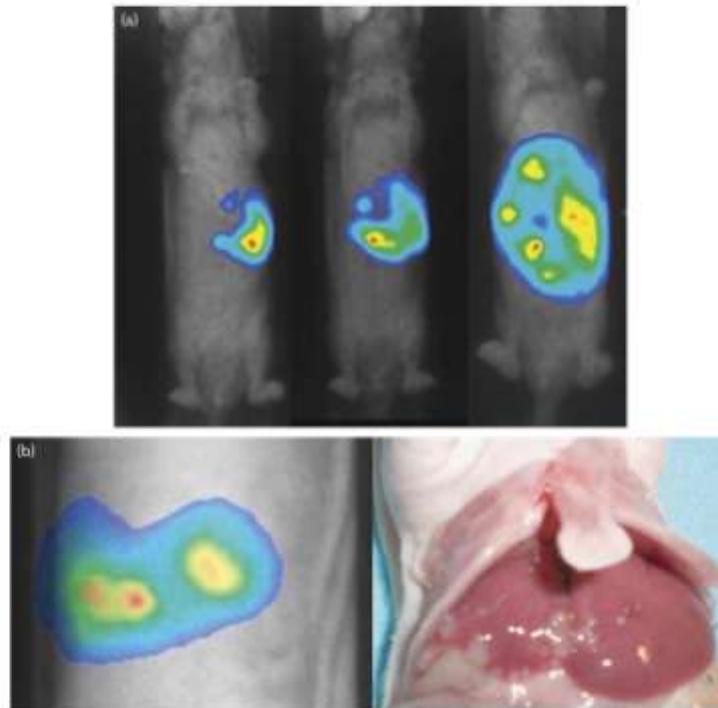
The biodistribution of  $^{125}\text{I}$ -labeled F6 was evaluated in nude mice. The results (Table 1) showed that F6 rapidly cleared from the blood, starting between 15.7 and 19.5% ID/g at 3 h to decrease below 1% 48 h after injection in both models (not significant). Reflecting the rapid renal filtration of F6, uptake in kidneys rapidly decreased with less than 1% ID/g after 24 h. Results in the different normal organs were independent of tumor location. The tumor uptake of  $^{125}\text{I}$ -labeled F6 reached a peak at the same time (24 h) for both subcutaneous and intrahepatic models. It was found to be significantly higher ( $\alpha = 0.05$ ) in hepatic tumors at 3 h and 24 h after

Fig. 1



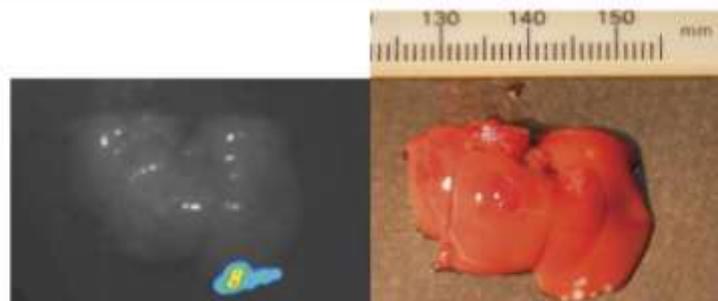
Graphs of bioluminescence (BLI) signal after intraportal injection of  $1 \times 10^6$  LS174T Luc+ cells in 4 mice. BLI can be detected immediately after injection, confirming the cell viability.

Fig. 2



In-vivo bioluminescence image of mice bearing LS174 Luc+ liver metastases. Tumors were implanted using the intraportal route. A representative animal is shown with focus on the abdominal area. The relative intensity of the photon counts per pixel is represented in color, from the least intense violet blue to the highest red. (a) Tumor progression over time at day 5, 10, and 15 after graft. (b) Anatomical correlation after laparotomy clearly shows corresponding liver tumors as white nodules in another mouse.

Fig. 3



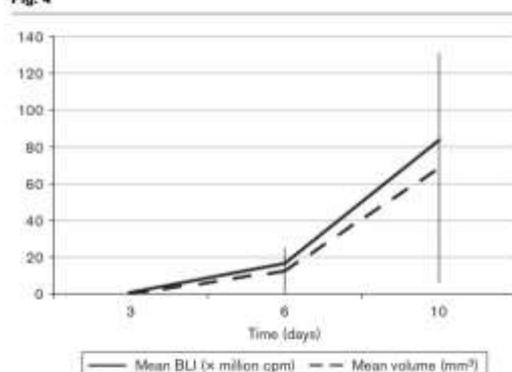
Ex-vivo bioluminescence (BLI) images of small hepatic metastases: After external in-vivo BLI the animal was killed and the liver was immediately explanted. A new BLI measurement was achieved: a BLI signal was still obtained from the small metastases.

injection ( $24.81 \pm 7.69$  vs.  $8.29 \pm 6.0$  and  $44.90 \pm 12.92$  vs.  $20.44 \pm 4.67\%$ ID/g). Uptakes in normal liver were higher in the intrahepatic model, and this may be because of microscopic deposits in macroscopically healthy livers. On account of a faster clearance of F6, which has renal elimination and specific tumor uptake, the tumor/blood and /kidney ratios were higher at 48 h.

#### Autoradiographs

Each slice showed multiple white tumor nodules. Autoradiographs were taken to confirm tumor uptake, 24 h after F6 injection. Autoradiographic data of livers clearly showed selective uptake of F6 in the tumor colonies within the liver (Fig. 5). Profile counts showed homogeneous deposits in small tumors in contrast with predominant peripheral deposits when tumor sizes grew.

Fig. 4



Follow-up in subcutaneous tumors. Comparison of tumor volume and bioluminescence (BLI) signal after injection of  $5 \times 10^6$  isolated cells. Data are plotted as mean volumes and photon counts with error bars. A parallel growth can be observed between tumor volume and BLI signal.

#### Discussion

This study investigated the importance of tumor location using a model of human CRC metastases in mice (LS174T cell line). We found that hepatic tumors presented a higher uptake of radiolabeled antibodies compared with subcutaneous tumors. Therefore, we propose a hepatic model using the intraportal route of spread with BLI for rapid assessment of tumor graft and growth that could be used to assess radioimmunotherapy.

The liver is the main site of distant spread of CRC with a fatal outcome, and hepatic metastases become a major target for therapies. Many animal models have already been developed, each one including advantages and limitations. When studying metastatic tumor growth, researchers need models that imitate human disease, to compare effects of therapy.

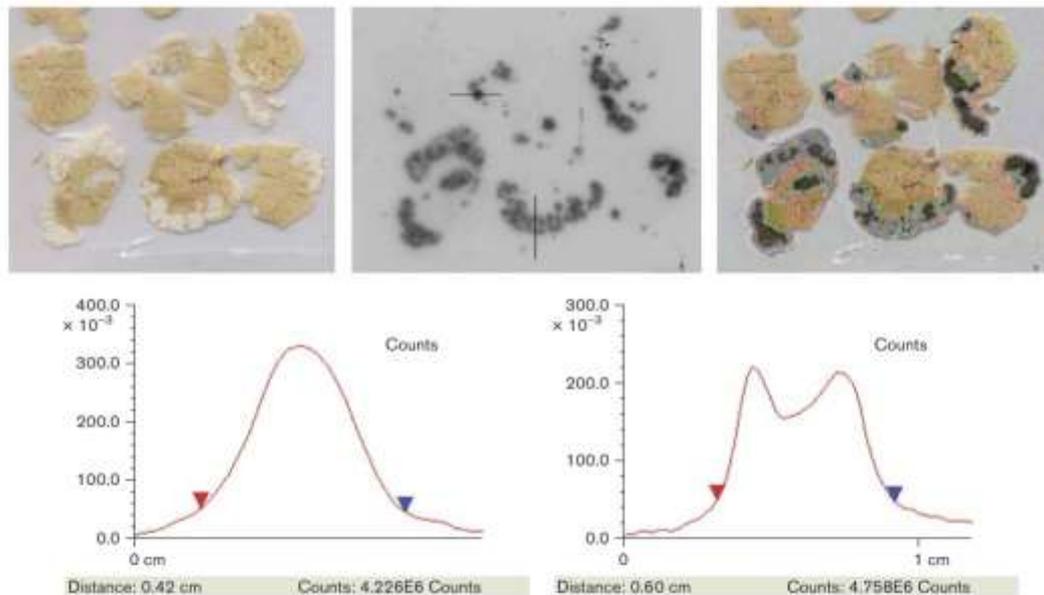
Ectopic subcutaneous tumor grafting is easy to implement, especially to screen large numbers of animals, but does not represent the best model. The subcutaneous environment greatly differs from the highly vascular hepatic architecture and does not reflect the metastatic process, as shown by the presence of a fibrous capsule surrounding the locally growing subcutaneous tumors [11,12]. To exhibit growth characteristics similar to human colonic metastases, hepatic models are needed. Many parameters have been described as influencing metastatic behavior such as cell origin (from primitive tumors or earlier metastatic sites) or location of injection. Subcutaneous or intramuscular injections do not produce frequent visceral metastases [13]. More physiopathological ways have been described: spread from orthotopic injections in the colon with or without secondary excision of the primary lesion, intravenous systemic injections, intrasplenic injection followed by splenectomy, and direct intrahepatic or intraportal injections. According to the different techniques and types of cells, the hepatic spread may vary from 0 to 100% of cases [8,14]. Hepatic metastases were obtained in 54% of cases after intrasplenic injection of  $2 \times 10^6$  cells of the LS-174T cell line [9]. The intraportal injection model seems superior

Table 1 Biodistribution of 0.4 nmol  $^{125}\text{I}$ -labeled F6 for subcutaneous and intrahepatic LS174T Luc+ tumors

Tissue	$^{125}\text{I}$ -F6 (0.4 nmol)					
	Subcutaneous			Hepatic		
	3 h (n=2)	24 h (n=2)	48 h (n=2)	3 h (n=4)	24 h (n=4)	48 h (n=4)
Tumor (weight, g)	$8.29 \pm 6.00$ (0.09 ± 0.06)	$20.44 \pm 4.67$ (0.02 ± 0.02)	$12.50 \pm 0.00$ (0.01 ± 0.01)	$24.81 \pm 7.69$ (0.08 ± 0.08)	$44.90 \pm 12.9$ (0.19 ± 0.14)	$15.8 \pm 10.64$ (0.68 ± 1.22)
Blood	$15.72 \pm 3.93$	$4.15 \pm 0.48$	$0.54 \pm 0.23$	$19.50 \pm 1.17$	$2.40 \pm 1.42$	$0.70 \pm 0.42$
Liver	$2.90 \pm 0.54$	$0.93 \pm 0.05$	$0.27 \pm 0.23$	$5.36 \pm 2.26$	$6.77 \pm 4.67$	$4.51 \pm 4.45$
Kidney	$6.93 \pm 3.15$	$1.80 \pm 0.02$	$0.24 \pm 0.08$	$5.27 \pm 0.99$	$1.08 \pm 0.45$	$0.34 \pm 0.14$
Muscle	$0.82 \pm 0.06$	$0.42 \pm 0.01$	$0.09 \pm 0.00$	$0.59 \pm 0.09$	$0.29 \pm 0.09$	$0.12 \pm 0.06$
Spleen	$2.80 \pm 0.33$	$0.95 \pm 0.05$	$0.15 \pm 0.03$	$3.11 \pm 0.31$	$0.70 \pm 0.25$	$0.26 \pm 0.11$
Stomach	$8.45 \pm 1.39$	$5.73 \pm 1.88$	$0.09 \pm 0.02$	$4.25 \pm 0.35$	$2.08 \pm 0.88$	$0.89 \pm 0.93$
Bone	$3.29 \pm 0.06$	$5.99 \pm 6.39$	$0.19 \pm 0.02$	$2.97 \pm 0.76$	$0.63 \pm 0.23$	$0.24 \pm 0.06$

The results are expressed in %ID/g ± standard deviation.

Fig. 5



Intrahepatic model of colon cancer metastases. Macroscopic slices and  $^{125}\text{I}$  labelled F6 [anticarcinoembryonic antigen (Fab')<sub>2</sub>] corresponding deposits (autoradiograph) with image fusion confirmed selective tumor uptake of the radiolabeled antibody. For the smallest lesions (1–4 mm), the uptakes on profile counts appeared homogeneous (left) compared with the largest ones (5–6 mm) with predominant peripheral deposits (right).

to local hepatic implantation, allowing reproducible induction of hepatic metastases in up to 89% of animals [15,16]. This model also reproduces the natural spread of CRC and does not need excision of a primary site. In our study, metastases were obtained in 100% of cases with aggregated cells, and less than 30% with isolated cells. This was reported earlier by Topal *et al.* [17] who observed metastases in 81% of rats after intraportal injection of aggregated cells versus 16% with the same number of isolated cells. Two essential mechanisms of metastases development are respected in this study. First, the aggregated cells, obtained without trypsinization, keep their surface adhesion molecules when injected. Then, the use of a direct administration route through the portal vein allows vascular embolization and trapping of clusters of viable cells in the hepatic portal branches to rapidly exceed the host defense, in contrast with the potential dormant isolated cells [18]. Viability of aggregated cells after needle injection could be a limiting factor, but we did not find any difference of viability compared with isolated cells.

Tumor growth is traditionally monitored by repetitive measurements for external lesions or the end-point stage for internal tumors that often require killing of the animal. Several imaging modalities may assess tumor

proliferation in animal models, such as ultrasound, MRI, or positron emission tomography but are not efficient for detecting small tumors. BLI provides a new strategy for in-vivo longitudinal studies of solid or diffuse tumors in small animals [19]. In the presence of its substrate, D-luciferin, the luciferase-transfected cells emit a 562 nm light that can be detected by an external sensitive camera. It allows detection of small amounts of cells as low as  $1 \times 10^5$  in the peritoneal cavity and  $1 \times 10^6$  in the circulation [20].

In this study, confirmation of hepatic spread was shown immediately after portal injection by diffuse luminescence over the hepatic area. Rapid tumor growth was obtained during the following days with an exponential rate and killing was mostly needed on day 23 for advanced disease. After the induction of reliable hepatic metastases, the other main point was to obtain a rapid in-vivo screening to select homogeneous groups to assess different therapeutic responses.

BLI, with quantitative data, seems sensitive for confirming longitudinal tumor growth. BLI is based on the external detection of emitted light from tumor cells but numerous factors are known to influence detection sensitivity. Tumor parameters, such as luciferase activity

expression over time, depth of tumor in the animal, animal positioning, type of anesthetic, and imaging parameters including amount and route of injection (intravenous or intraperitoneal) of the substrate, and acquisition time may affect BLI [21–24].

Thin skin and low liver deepness in nude mice avoid light alteration because of fur or tissue thickness. Earlier studies showed a good correlation between a BLI signal and tumor weight or volume in different sites (subcutaneous, intraperitoneal tumors) [20,25,26] and conventional imaging such as MRI [27]. In this study, we found a parallel increase in BLI signal and tumor volume for subcutaneous lesions over time. For hepatic tumors, the comparison between weight and BLI signal was more difficult to evaluate and it could be explained by multifocal lesions and microscopic invasion, which could not be excised from the surrounding tissue. Nevertheless, using standardized protocols, each animal serves as its own reference, allowing longitudinal follow-up.

Radioimmunotherapy of tumors is an emergent option using radiolabeled monoclonal antibodies directed against tumor-associated antigens. To optimize targeted methods, several parameters have to be studied and the use of the most physiopathological model is important to avoid false-positive or false-negative results when translating clinical trials from animals to humans. The extent of antibody location within the tumor is of major importance for successful radioimmunotherapy and tumor uptake may differ within the same cell line depending on tumor location. The hepatic tumor model seems to be the most favorable one to study the radiolabeled antibody uptake and to estimate potential dosimetry for several reasons, including the number and the accessibility of targets. CEA concentration in liver tumors from LS174T has been reported earlier to be significantly higher than in other tissues [28]. A higher radiolabeled antibody uptake is also favored by the liver's vascular environment compared with the subcutaneous models that have earlier been considered to alter responses to drugs [29,30]. Furthermore, Fidarova *et al.* [31], using a fluorescently labeled anti-CEA antibody, described a higher distribution in liver metastases despite fewer intratumoral vessels, with diffusion occurring from a highly vascular surrounding capsule. The presence of intratumoral vessels did not increase relative to antibody uptake, suggesting that diffusion from the capsule represents the main way of antibody access. Our study confirms higher tumor uptake in liver metastases emphasizing the need for hepatic models of colorectal metastases.

Radioimmunotherapy has shown its ability to be an effective treatment modality for microscopic liver metastases [32]. Tumor size is certainly another critical point when studying the efficiency of radioimmunotherapy in solid tumors. With higher intratumoral uptake measured in small deposits with prolonged retention at later time

points (96 h) compared with large or diffuse involvements [33] and with homogeneous uptake, small metastases appear as the best targets for radioimmunotherapy. With BLI, monitoring of tumors can be achieved to select very small tumors, using quantitative data to optimize therapeutic trials. Optimal models are therefore needed before improving antibody specificities and type of radionuclides [34–36].

## Conclusion

Our model of hepatic colonic cancer metastasis, associating an intraportal route of injection and BLI, provides an accurate model for tumor induction and in-vivo follow-up allowing therapeutic trials with large in-vivo animal screening. Biodistribution data clearly show the impact of tumor location for radiolabeled antibody targeting and tumor dosimetry so that hepatic tumors are needed to optimize dosimetry and later radioimmunotherapies.

## Acknowledgements

The authors thank TARCC 'Targeted Alpha-Radionuclides to combat cancer'. E.F. was responsible for tumor model conception, participated to animal procedures, data analysis, and drafted the manuscript. C.S.M. and P.T. participated in the tumor model and animal related procedures. C.S.M., P.R.L., and A.F.C. were responsible for radiolabeling. J.B. established objectives of this study and participated to data analysis. All authors read and approved the final manuscript.

The authors declare no competing interests.

## References

- Jackson-Thompson J, Ahmed F, German RR, Lai SM, Friedman C. Descriptive epidemiology of colorectal cancer in the United States, 1998–2001. *Cancer* 2006; **107**:1103–1111.
- Chong G, Cunningham D. Improving long-term outcomes for patients with liver metastases from colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 9063–9066.
- Cummings LC, Payes JD, Cooper GS. Survival after hepatic resection in metastatic colorectal cancer. A population based study. *Cancer* 2007; **109**:718–726.
- Liersch T, Meller J, Kulle B, Behr TM, Markus P, Langer C, *et al.* Phase II trial of carcinoembryonic antigen radioimmunotherapy with <sup>125</sup>I-labetuzumab after salvage resection of colorectal metastases in the liver: five-year safety and efficacy results. *J Clin Oncol* 2005; **23**:6763–6770.
- Liersch T, Meller J, Bittrich M, Kulle B, Becker H, Goldenberg DM. Update of carcinoembryonic antigen radioimmunotherapy with <sup>125</sup>I-labetuzumab after salvage resection of colorectal metastases: comparison of outcome to a contemporaneous control group. *Ann Surg Oncol* 2007; **14**:2577–2590.
- Topal B, Kautman L, Aerts R, Penninckx F. Patterns of failure following curative resection of colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 2003; **29**:246–253.
- Kilón JJ, Radinsky R, Fidler IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev* 1999; **17**:279–284.
- Brand MI, Caellas S, Dietz DW, Mison JW, Vladavljevic A. Development of a reliable colorectal cancer liver metastasis model. *J Surg Res* 1996; **63**:425–432.
- Tibbets LJA, Doremus CM, Tzanakaki GN, Vezaridis MP. Liver metastases with 10 human cell lines in nude mice and association with carcinoembryonic antigen production. *Cancer* 1993; **71**:315–321.

- 10 Smakman N, Martens A, Kranenburg O, Borel Rinkes IHM. Validation of bioluminescence imaging of colorectal liver metastases in the mouse. *J Surg Res* 2004; **122**:225-230.
- 11 Hejtelk MW, Kranenburg O, Borel Rinkes IHM. Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Dig Surg* 2005; **22**:18-25.
- 12 De Vore DP, Houches DP, Overjens AA, Dh GS, Hutson TB. Collagenase inhibitors retarding invasion of a human tumor in nude mice. *Exp Cell Biol* 1980; **48**:367-373.
- 13 Gavazzi R, Campbell DE, Jessup JM, Casey K, Fidler IJ. Metastatic behavior of tumor cells isolated from primary and metastatic colorectal carcinomas implanted into different sites in nude mice. *Cancer Res* 1986; **46**:1928-1933.
- 14 Cespedes MV, Espina C, Garcia-Cabezas MA, Trias M, Boluda A, Gomez del Pulgar MT, et al. Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites. *Am J Pathol* 2007; **170**:1077-1085.
- 15 Thalheimer A, Otto C, Bueter M, Bert B, Gattenlohner S, Gasser M, et al. Tumor cell dissemination in a human colon cancer animal model: orthotopic implantation or intraportal injection? *Eur Surg Res* 2006; **42**:195-200.
- 16 Thalheimer A, Otto C, Bueter M, Bert B, Gattenlohner S, Gasser M, et al. The intraportal injection model: a practical animal model for hepatic metastases and tumor cell dissemination in human colon cancer. *BMC Cancer* 2009; **9**:29. doi:10.1186/1471-2407-9-29.
- 17 Topal B, Rooskam T, Fevery J, Penninckx F. Aggregated colon cancer cells have a higher metastatic efficiency in the liver compared with nonaggregated cells: an experimental study. *J Surg Res* 2003; **112**:31-37.
- 18 Panu Y, Ribeiro J, Chretien Y, Nordlinger B. Dormant liver metastases: an experimental study. *Br J Surg* 1992; **79**:221.
- 19 Klek CPW, Overmeer RM, Niers TMH, Versteeg HH, Richel DJ, Buckle T, et al. Validity of bioluminescence measurements for noninvasive imaging of tumor load in small animals. *Biotechniques* 2007; **43**:S7-S13.
- 20 Edinger M, Sweeney TJ, Tucker AA, Olomu AB, Negrin RS, Contag CH. Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models. *Neoplasia* 1999; **1**:303-310.
- 21 Brulkewitz S, Mendonca M, Stantz K, Comerford K, Bigsby R, Hutchins G, et al. The expression level of luciferase within tumour cells can alter tumour growth upon in vivo bioluminescence imaging. *Luminescence* 2007; **22**:221-228.
- 22 Keyaris M, Verschueren J, Bos TJ, Tchouate-Gankam LO, Peleman C, Breckpot K, et al. Dynamic bioluminescence imaging for quantitative tumour burden assessment using IV or IP administration of D-luciferin: effect on intensity, time kinetics and repeatability of photon emission. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; **35**:999-1007.
- 23 Zinn KR, Scoban AA, O'Quinn D, Weaver C, Bugger K, Lamar D, et al. Noninvasive bioluminescence imaging in small animals. *ILAR J* 2008; **49**:103-115.
- 24 Cui K, Xu X, Zhao H, Wong STC. A quantitative study of factors affecting in vivo bioluminescence imaging. *Luminescence* 2008; **23**:292-295.
- 25 Jenkins DE, Horrig YS, Oh Y, Dusch J, Puchio T. Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive in vivo detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice. *Breast Cancer Res* 2005; **7**:R444-R454.
- 26 Zaamari S, Rumping G, Floot B, Lyons S, Stewart FA. In vivo bioluminescence imaging of locally disseminated colon carcinoma in rats. *Br J Cancer* 2004; **90**:1259-1264.
- 27 Rihemtulla A, Stegman LD, Cardozo SI, Gupta S, Hall DE, Contag CH, Rice SD. Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. *Neoplasia* 2000; **2**:491-495.
- 28 Vogel CA, Galmiche MC, Westermann P, Sun LD, Pelegri A, Foll S, et al. Carcinoembryonic antigen expression, antibody localization and immunodetection of human colon cancer liver metastases in nude mice: a model for radioimmunotherapy. *Int J Cancer* 1996; **67**:294-302.
- 29 Pocard M, Tesku H, Salmon RJ, Dubiloux B, Poupon MF. Efficiency of orthotopic xenograft models for human colon cancer. *In vivo* 1996; **10**:463-469.
- 30 Wilmanns C, Fan D, O'Brien CA, Bucana CD, Fidler IJ. Orthotopic and ectopic organ environments differentially influence the sensitivity of murine colon carcinoma cells to doxorubicin and 5-fluorouracil. *Int J Cancer* 1992; **52**:99-104.
- 31 Fitarova EF, El Mir E, Boer GM, Qureshi U, Deuring JLI, Robson MP, et al. Microdistribution of targeted fluorescently labeled anti-carcinoembryonic antigen antibody in metastatic colorectal cancer: implications for radioimmunotherapy. *Clin Cancer Res* 2008; **14**:2639-2646.
- 32 De Jong GM, Hendriks T, Eek A, Oyen WJG, Heekamp S, Bleichrodt RP, Boerman OC. Radioimmunotherapy improves survival of rats with microscopic liver metastases of colorectal origin. *Ann Surg Oncol* 2009; **16**:2065-2073.
- 33 Deuring JLI, Flynn AA, Qureshi U, Whiting S, Boer GM, Green A, et al. Localization of radiolabeled anti-CEA antibody in subcutaneous and intrahepatic colorectal xenografts: influence of tumor size and location within host organ on antibody uptake. *Nucl Med Biol* 2009; **36**:883-894.
- 34 Shanley RM, Goldenberg DM. Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunocjugates. *CA Cancer J Clin* 2006; **56**:226-243.
- 35 Shanley RM, Karacay H, Cardillo TM, Chang CH, Mc Bride WJ, Rossi EA, et al. Improving the delivery of radionuclides for imaging and therapy of cancer using pretargeting methods. *Clin Cancer Res* 2005; **11** (19 Suppl):7109-7121.
- 36 Wang JYC. Basic immunology of antibody targeted radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; **66**:S8-S14.

### III. DISCUSSION

Le foie représente le site métastatique le plus fréquent en cas de tumeur colique, lié au drainage veineux mésentérico-porte. L'obtention d'un modèle le plus proche des conditions physiopathologiques est donc nécessaire dans l'optique d'essais thérapeutiques.

Les premiers modèles de carcinogénèse ont utilisé différents carcinogènes (diméthylhydrazine DMH, azoxyméthane AOM) par voie orale, sous-cutanée, intrarectale ou musculaire. Une carcinogénèse locale était obtenue dans 30 à 100% des cas en fonction de la voie d'administration. Cependant, des métastases ne survenaient que chez 23 à 31% des souris (129).

Afin de pallier cette limite, l'implantation de cellules tumorales a été développée à partir de différents sites. L'implantation sous-cutanée ou intramusculaire ne produit qu'exceptionnellement des métastases viscérales (foie ou poumons) (130).

L'implantation orthotopique au niveau de la paroi colique, avec ou sans exérèse secondaire de la tumeur primitive, présente certainement la meilleure similitude avec les conditions physiopathologiques. Si une implantation locale peut être obtenue dans 75 à 88% des cas en fonction des lignées employées, la dissémination hépatique est largement inférieure, entre 0 et 67% des cas avec une fréquence de carcinose péritonéale associée entre 29 et 100% (131,132). Les désavantages majeurs sont également représentés par le délai d'obtention de ces métastases (30-130 jours) et un risque de développement tumoral local ou de carcinose prédominant.

L'implantation par voie splénique avec ou sans splénectomie secondaire est également employée. Après injection intrasplénique de 10 lignées différentes d'adénocarcinome colique, un développement métastatique intrahépatique était observé entre 0 et 70% des cas, sans rapport avec le degré de différenciation tissulaire tumoral. La lignée LS-174T permettait d'obtenir des lésions hépatiques dans 54% des cas (133). L'injection intrasplénique apparaît cependant supérieure à l'injection caecale pour l'obtention de métastases (134). Le site d'origine des cellules semble par contre influencer le potentiel métastasique. Les lignées issues de tumeurs primitives présentent un potentiel moindre que celles cultivées à partir de localisations secondaires (de 40 à 100%) (135).

Afin de respecter au mieux les conditions de dissémination hépatique par voie vasculaire, s'est développée la technique d'injection par voie portale. Les résultats sont favorables avec développement de MH dans plus de 89% des cas, chez l'animal immunocompétent ou non, après injection de  $1 \times 10^6$  cellules. Cette quantité est suffisante pour obtenir une diffusion hépatique avec une mortalité opératoire faible (0-10%), des quantités plus élevées étant responsables d'une mortalité supérieure (30-40%) (136,137) (**Tableau 4**).

Implantation	Développement local (%)	Métastases hépatiques (%)	Avantages	Inconvénients
Sous cutanée (130,132,134)	80-100	0		
Intramusculaire (130,132,134)	100	0		
Intraveineuse (134)		0		
Colique (131,137)	75-88	0-67	Conditions physiopathologiques optimales	Difficultés de la greffe colique Atteinte multifocale : ganglions 57-100% carcinose 29-100%
Splénique (135)	0-90	0-70	Pousse rapide (3-4 semaines)	- Double site tumoral - Technique plus longue si splénectomie associée
Intraportale (136,137)		>89	Facilité Pousse rapide (3-4 semaines)	Mortalité 0-10% Thrombose portale 10%

**Tableau 4.** Modèles tumoraux de tumeurs d'origine colique chez l'animal.

L'utilisation d'agrégats cellulaires augmente l'efficacité métastatique à quantité égale en comparaison des cellules isolées (81% vs. 16% pour une quantité de  $0,5 \times 10^6$  cellules), ceci pouvant être expliqué par un phénomène de capture cellulaire au niveau du réseau portal distal et par l'absence de cellules isolées détruites ou dormantes au niveau hépatique (138).

L'injection intraportale de  $10^6$  cellules en agrégats apparaît donc le modèle le plus efficace pour induire de façon reproductible des métastases hépatiques dans des conditions physio-pathologiques les plus proches des conditions naturelles. Sa mise en œuvre impose cependant certaines contraintes en termes de nombre d'animaux implantés lors de chaque session en cas d'études nécessitant des cohortes importantes (durée d'intervention de 10 à 15 mn par animal).

Après implantation, le deuxième défi est l'évaluation de la croissance tumorale. La bioluminescence est une technique d'imagerie optique *in vivo* non invasive basée sur la détection externe de lumière émise lors d'une réaction enzymatique entre la luciférase et son substrat, la D-luciférine en présence d'oxygène, de magnésium et d'ATP. La luciférase la plus souvent employée est extraite de la luciole (*Photinus pyralis*). La lumière émise présente une bande de longueur d'onde comprise entre 530 et 640 nm avec un pic à 560 nm. Cette longueur d'onde permet la pénétration de la lumière à travers plusieurs cm de tissus et sa détection par une caméra CDD externe, l'animal étant placé dans une chambre noire. Le bruit de fond lumineux est limité par le refroidissement du système optique. Les photons reçus par la caméra sont transformés en électrons pour générer une image. L'intensité de la lumière émise est présentée en échelle colorimétrique matérialisant le nombre de photons

émis par région puis fusionnée avec une photographie noir et blanc de l'animal. Des mesures quantitatives peuvent être réalisées à l'aide de régions d'intérêt.

Du fait d'une demi-vie biologique de 2 h, la production de luciférase doit être continue pour permettre son exploitation en imagerie. Le système enzymatique peut être transfecté au niveau de lignées cellulaires tumorales à l'aide de plasmides ou de virus (notamment avec le CMV). La stabilité de la transfection permettra donc l'expression de la luciférase tout au long de la croissance tumorale.

Son substrat, la D-luciférine passe la barrière hémato-encéphalique et les différents compartiments vivants. L'administration peut se faire par voie intraveineuse ou intrapéritonéale. La voie intrapéritonéale est la plus souvent employée du fait de sa facilité, avec cependant un risque d'injection intradigestive. Keyaerts et coll. ont cependant montré une meilleure reproductibilité et une meilleure sensibilité de la voie intraveineuse en comparaison de la voie intrapéritonéale (139).

La sensibilité de cette technique est dépendante de plusieurs paramètres (140) :

- Le type de lignée cellulaire et son niveau d'expression de luciférase. Un niveau d'expression élevé de luciférase peut altérer la croissance tumorale. Cette altération ne semble pas due au niveau d'expression lui-même, mais à un effet négatif de la réaction luciférine-luciférase avec une utilisation compétitive de l'ATP et de l'O<sub>2</sub> au niveau intracytoplasmique (141),
- La quantité de substrat injecté,
- Le protocole d'acquisition (délai, durée, positionnement de la source, proximité avec la caméra),

- La sensibilité de la caméra,
- Des facteurs pouvant faire barrage à l'émission lumineuse à partir de la tumeur (profondeur de la source, fourrure) entraînant une perte par un facteur 100 des photons par cm traversé (142),
- Des facteurs liés au protocole d'examen : variation en fonction du type d'anesthésique employé, du positionnement de l'animal (143).

Chaque exploration doit donc être réalisée dans des conditions standardisées, chaque animal représentant alors sa propre référence. La normalisation du signal relativement au signal initial permet également de diminuer la variation entre les animaux.

L'appréciation de la croissance tumorale est fondamentale chez le petit animal. Elle va reposer sur la mesure répétée du volume tumoral en cas de lésions sous cutanées. En cas de tumeur profonde, celle-ci implique un sacrifice à des délais préétablis, nécessitant alors de multiplier le nombre d'animaux.

La facilité de réalisation de la BLI en temps réel, son coût peu élevé permettent par contre une utilisation en routine pour le monitoring de la croissance tumorale, en comparaison des autres moyens d'imagerie chez le petit animal (IRM, micro-TEP).

Jenkins et coll. ont montré une corrélation élevée ( $r^2 = 0,97$ ) entre le volume de tumeurs sous cutanées, ainsi que le poids total de poumons présentant des métastases pulmonaires et les données de la bioluminescence (144). Ceci est retrouvé dans notre étude pour les lésions sous-cutanées. Sur un autre modèle de métastases pulmonaires de

mélanome, une bonne corrélation était également observée lors de la confrontation avec les macro-lésions. Par contre, ceci n'était pas retrouvé lors de l'analyse à partir du lysat tissulaire prenant en compte toutes les lésions quelle que soit leur taille. Une explication avancée est la faible importance dans l'émission de lumière des lésions les plus petites (145). La corrélation semble plus difficile lors de l'exploration des métastases hépatiques. Ceci est lié aux différents facteurs inhérents à la technique de BLI et notamment la situation intrahépatique des lésions, variable en profondeur, ainsi qu'au type d'estimation du volume tumoral (pesée des macrolésions, analyse microscopique, pesée de l'organe). Ceci est en accord avec les données de la littérature qui ne semblent pas toutes concordantes. Une étude de la croissance de métastases hépatiques de cellules de lignée cancéreuse colique CT26 par voie splénique rapporte une corrélation élevée entre l'activité en BLI et le poids du foie jusqu'à des poids de 6 g ainsi que le degré d'invasion hépatique ( $r = 0,98$ ) (146). Dans un autre modèle hépatique, il existait également une bonne corrélation entre le signal lumineux et le poids du foie mais jusqu'à un poids de 3,5 g avec un  $r^2 = 0,90$ , diminuant à 0,60 au delà (147). Ceci a été initialement rapporté aux phénomènes hypoxiques et nécrotiques au sein des lésions de plus grande taille (148). D'autres facteurs tels que la présence d'ascite dans les lésions évoluées, l'augmentation d'épaisseur tissulaire induite par les tumeurs ont également été avancés. L'hémoglobine et la mélanine n'absorbent que peu l'émission lumineuse à 560 nm.

La BLI reste sensible. La quantité minimale de cellules détectables in vivo varie en fonction du site et du type cellulaire. En implantation sous-cutanée ou péritonéale, 100 à 1000 cellules peuvent être détectées. Sur le modèle de métastases hépatiques précédent, l'inoculat minimal détectable était de  $10^2$  cellules (147).

Dans une étude critique de la littérature sur la validité de la BLI dans l'évaluation de la charge tumorale, Klerk et coll. rapportent une bonne corrélation lorsque les tumeurs profondes sont sous formes localisées et uniformes en comparaison à d'autres techniques d'imagerie (dimensions en IRM, poids, FACS) (145).

Si la BLI permet une exploration sensible de la croissance tumorale, elle permet également d'apprécier un effet thérapeutique anti-tumoral. Une courbe de survie de type Kaplan-Meier n'est plus le seul témoin d'un effet potentiel, surtout si celui-ci est transitoire. Le nombre d'animaux peut également être diminué dans les différents bras d'étude. De tels protocoles ont été utilisés sur des modèles de métastases osseuses de sarcome ou pulmonaires (149).

Le modèle d'injection par voie intraportale en agrégats, bien que de mise en place plus contraignante que le modèle sous-cutané, apparaît comme un modèle fiable et reproductible d'implantation métastatique de cellules d'adénocarcinome colique chez la souris. La bioluminescence associée permet d'apprécier *in vivo*, de façon quantitative, la croissance tumorale. Malgré l'absence de corrélation entre signal émis et poids tumoral dans les organes profonds, chaque animal devient sa propre référence. Il devient alors possible d'homogénéiser les groupes d'animaux mais également de fixer de nouveaux critères objectifs d'effets thérapeutiques plus adaptés que la perte de poids, le décès ou des critères nécropsiques.

***CHAPITRE IV : OPTIMISATION DU PRECIBLAGE ET ETUDE DOSIMETRIQUE***

## I. RESUME

La technique de préciblage en radioimmunothérapie a été développée dans le but d'associer une bonne sélectivité anti tumorale et une réduction des effets toxiques sur les organes radiosensibles (moelle, reins), à l'aide d'un couple anticorps bispécifique - haptène radio-marqué de petit poids moléculaire à demi-vie courte.

Nous avons, dans un premier temps, cherché à comparer l'influence de la localisation tumorale (intra hépatique ou sous-cutanée) en termes de biodistribution à l'aide d'un système de ciblage direct employant un anticorps anti ACE F(ab')<sub>2</sub>, F6, marqué à l'iode-125 puis du système de préciblage anti ACE (anticorps trivalent bispécifique anti ACE x anti HSG, TF2 et haptène di-HSG, peptide IMP 288).

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à optimiser les conditions d'administration de la technique de préciblage à partir du modèle de tumeurs sous-cutanées, plus simple à mettre en place. L'emploi de deux composés nécessite alors de prendre en compte trois paramètres, quel que soit le radionucléide utilisé :

- la dose molaire d'anticorps,
- le ratio anticorps/haptène,
- l'intervalle d'injection.

Enfin, une étude dosimétrique comparative a été réalisée pour différents radionucléides émetteurs alpha ou bêta afin d'évaluer les radioéléments les plus propices dans ce système de préciblage.

## I.1. Matériels et méthodes :

### - Modèle animal :

Pour les tumeurs sous-cutanées, 5 millions de cellules LS-174T étaient injectées. Pour les tumeurs intrahépatiques, un million de cellules en agrégats étaient injectées par voie intraportale.

### - Anticorps et peptides :

#### *Ciblage direct* :

F6 (Immunotech, Marseille, France) est un fragment de type  $F(ab')_2$  de poids moléculaire (PM) 100 kDa, préparé par digestion pepsinique à partir d'un anticorps monoclonal IgG<sub>1</sub> anti ACE.

#### *Préciblage* :

Le TF2 est une construction trivalente et bispécifique comprenant trois fragments Fab, élaborée selon la technologie de "Dock and Lock" (100). Le TF2 est composé de deux fragments Fab d'anticorps monoclonal humanisé hMN-14, spécifique pour l'ACE (anti-CEACAM5) et d'un fragment Fab d'anticorps monoclonal humanisé h679 reconnaissant spécifiquement le haptène histamine-succinyl-glycine (HSG). Son poids moléculaire est voisin de 156 kDa.

L'IMP 288 (DOTA-D-Tyr-D-Lys (HSG)-D-Glu-D-Lys (HSG)-NH<sub>2</sub>), (Immunomedics Inc., New Jersey, Etats-Unis), PM 1456 Da, est un peptide possédant deux résidus HSG pouvant se lier au TF2. Pour éviter de trop grandes différences de charge avec les haptènes marqués avec des

métaux radioactifs, le haptène est saturé avec de l'indium stable pour le marquage à l'iode (dénommé alors IMP 325 : In-DOTA-D-Tyr-D-Lys (HSG)-D-Glu-D-Lys (HSG)-NH<sub>2</sub>).

- Radio-marquage :

Le F6 était marqué à l'<sup>125</sup>I à l'aide d'iodogène. 4,8 nmol de F6 diluées dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,2, étaient incubées 15-30 minutes à 20°C avec 3,7 MBq d'iode-125 dans un tube contenant l'iodogène (100 µg de iodogène par tube). La réaction était stoppée en transférant la solution radioactive dans un tube frais et le F6 marqué purifié par filtration sur gel sur colonne PD10 (Pharmacia, Uppsala, Suède). La pureté radiochimique était contrôlée sur 1 µl de solution par précipitation à l'aide d'acide trichloroacétique. Après centrifugation, la quantité d'iode-125 fixée à l'anticorps était mesurée à l'aide d'un compteur gamma (1480 Wizard 3" Wallac, Turku, Finlande). L'activité spécifique obtenue était de 0,8 MBq/nmol.

La procédure de marquage du TF2 était identique à celle du F6. La fraction immunoréactive était de 90%, la pureté radiochimique de 98%. L'activité spécifique injectée était de 0,8 MBq/nmol.

Le marquage de l'IMP 325 était réalisé à l'iode-125 (150). L'activité spécifique après purification était de 30 MBq/nmol. La fraction immunoréactive était de 90%.

L'IMP 288 était également marqué au lutétium-177 afin de rechercher des modifications de captation induites par les radiométaux au niveau tumoral ou des organes sains et notamment des reins. L'activité spécifique était de 60 MBq/nmol et la fraction immunoréactive de 93,5%.

- Biodistributions :

Des groupes de trois à quatre souris étaient employés pour chaque point. Les animaux étaient sacrifiés par dislocation cervicale. Les tumeurs étaient prélevées et pesées. Dans le cadre des tumeurs intrahépatiques, l'ensemble des lésions macroscopiques était réséqué du foie adjacent. Du sang, des échantillons des différents organes étaient collectés puis pesés et la radioactivité mesurée à l'aide d'un compteur gamma avec un échantillon standard étalonné. Les résultats étaient exprimés en pourcentage moyen de la dose injectée par gramme de tissu (%DI/g  $\pm$  déviation standard).

- Autoradiographies :

Sept jours après injection intraportale, la croissance tumorale était confirmée par bioluminescence. Les animaux étaient sacrifiés 24 heures après injection intraveineuse de F6 ou de TF2 marqué à l'iode-125. Les foies étaient prélevés puis fixés dans un bloc d'hémicellulose avec un échantillon étalonné. Le bloc était congelé afin de réaliser des coupes congelées de 30  $\mu$ m d'épaisseur à l'aide d'un cryo-macrotome (Cryomacrocut, Leica, Deerfield, IL). Les coupes, disposées sur une feuille transparente, étaient ensuite exposées sur écran phosphore durant une heure à 20°C. Les images de radioactivité sont scannées à l'aide d'un Phosphorimageur (Molecular Dynamics, Orsay, France). Le profil de fixation de l'anticorps marqué était étudié à l'aide d'un profil d'analyse pixel-par-pixel (Logiciel Image J).

- Analyse statistique :

Compte-tenu des petits effectifs, les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test  $t$  non paramétrique de Student sur données rangées (seuil  $\alpha=0,05$ ).

- Voie d'administration :

La voie d'administration était intraveineuse pour le F6.

Pour le TF2, une courbe de cinétique sanguine était réalisée après injection de 0,4 nmol marquée à l'iode-125 par voie veineuse et intrapéritonéale (1, 3, 6, 24 et 48 h) puis une étude de biodistribution était réalisée 24 h après injection afin de déterminer la voie d'injection la mieux adaptée notamment si des quantités importantes de TF2 s'avéraient nécessaires (limites des volumes injectables par voie intraveineuse chez le petit animal).

- Evaluation des doses et intervalles d'injection anticorps-peptide sur modèle sous-cutané :

L'influence du rapport anticorps/peptide était explorée en faisant varier la quantité du peptide marqué à l'iode-125 (rapport 10/1 et 2/1) pour une quantité fixe d'anticorps (0,4 nmol).

Dans un deuxième temps, trois intervalles d'injection (5, 10 et 15 h) ont été évalués pour des doses fixes (TF2 0,4 nmol et peptide 0,04 nmol) avec un sacrifice 24 h après l'injection du peptide.

Une comparaison entre peptide marqué à l'iode-125 et au lutétium-177 était réalisée sur modèle de tumeurs sous-cutanées dans les conditions de rapport molaire anticorps/peptide 10/1 et un intervalle 24 h avec une dose de 0,4 nmol de TF2.

- Etude dosimétrique :

Les données de biodistributions ont été ajustées selon un modèle multicompartmental. Les courbes d'activité dans le sang étaient bien ajustées par un modèle bicompartimental. Les activités dans les tumeurs et les reins étaient représentées comme la somme d'un compartiment en équilibre rapide avec le sang et d'un compartiment tissulaire spécifique de

distribution. Ce modèle était employé pour dériver par intégration des temps 0 à 144 heures, à partir des données de biodistribution du système de préciblage (TF2 0,4 nmol, IMP 0,04 nmol, intervalle 24h) sur modèles de tumeurs sous-cutanées, les activités cumulées (Bq.s), en tenant compte de la demi-vie des radionucléides et de l'activité spécifique disponible d'isotopes variés.

Deux études de biodistribution ont également été réalisées avec des doses molaires plus importantes (2/0,1 et 5/0,27 nmol).

Les doses absorbées ont été estimées pour plusieurs émetteurs alpha (astate-211, bismuth-213) et bêta (iode-131, lutétium-177, yttrium-90) afin de sélectionner les radionucléides les plus efficaces.

Celles-ci ont été calculées en multipliant les activités cumulées (Bq.s) provenant des cinétiques et les facteurs S (Gy/Bq.s) obtenus des manières suivantes :

- pour l'astate-211 et le bismuth-213, les émissions alpha étaient considérées comme non pénétrantes. Les autres types d'émissions étaient négligés.
- pour le lutétium-177, l'yttrium-90 et l'iode-131, les facteurs S pour les reins provenaient d'un modèle de souris nude de 30g (151, 152), et les facteurs S des tumeurs (diamètres: 1mm, 3 mm et 6 mm, en retenant une distribution homogène) des données de Bardiès et coll. (153).
- les facteurs S pour le sang étaient dérivés d'OLINDA, en prenant pour modèle une sphère de 1g (154) pour le lutétium-177, l'yttrium-90 et l'iode-131, et en considérant des rayonnements alpha non pénétrants pour l'astate-211 et le bismuth-213.

Les données d'émissions étaient issues du MIRD (données des radionucléides et schémas de décroissance) (155).

Les activités spécifiques retenues ont été déterminées à partir de nos données de marquage propres pour l'iode-131 (74 MBq/nmol), le bismuth-213 (85 MBq/nmol), et des données de la littérature pour l'yttrium-90 (130 MBq/nmol), le lutétium-177 (86 MBq/nmol) et l'astate-211 (55 MBq/nmol) (156, 157).

## **I.2. Résultats :**

### **- Ciblage direct (F6) :**

Sur les trois temps explorés, le pic de la captation tumorale se situait à 24 h pour les deux types de tumeurs intrahépatiques (44,90%) et sous-cutanées (20,44%) (**Tableau 5**).

Il était significativement plus élevé ( $\alpha=0,05$ ) dans les tumeurs intrahépatiques aux temps 3 h et 24 h après injection ( $24,81 \pm 7,69$  vs.  $8,29 \pm 6,0$  et  $44,90 \pm 12,92$  vs.  $20,44 \pm 4,67$  % DI/g).

Les résultats dans les autres organes n'étaient pas significativement différents selon la localisation tumorale. Les rapports tumeur sur organe étaient donc supérieurs pour les lésions hépatiques, liés à une captation tumorale accrue.

Une captation plus élevée était également observée au niveau du foie macroscopiquement normal dans le modèle de tumeurs intrahépatiques. Une hypothèse pourrait être la présence de fixations tumorales microscopiques au sein d'un foie présumé sain.

		<sup>125</sup> I-F6 (0.4 nmol)					
Tumeurs		sous-cutanées			hépatiques		
		3 h	24 h	48 h	3 h	24 h	48 h
Tissus		n=2	n=2	n=2	n=4	n=4	n=4
Tumeur		8,29 ± 6,00	20,44 ± 4,67	12,50 ± 0,00	24,81 ± 7,69	44,90 ± 12,9	15,8 ± 10,64
(poids,g)		(0,09 ± 0,06)	(0,02 ± 0,02)	(0,01 ± 0,01)	(0,08 ± 0,09)	(0,19 ± 0,14)	(0,88 ± 1,22)
Sang		15,7 ± 3,93	4,15 ± 0,48	0,54 ± 0,23	19,50 ± 1,17	2,49 ± 1,42	0,70 ± 0,42
Foie		2,80 ± 0,54	0,93 ± 0,05	0,27 ± 0,23	5,36 ± 2,26	6,77 ± 4,67	4,51 ± 4,45
Rein		6,93 ± 3,15	1,80 ± 0,02	0,24 ± 0,08	5,27 ± 0,99	1,08 ± 0,45	0,34 ± 0,14
Muscle		0,82 ± 0,06	0,42 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,59 ± 0,09	0,29 ± 0,09	0,12 ± 0,06
Rate		2,80 ± 0,33	0,95 ± 0,05	0,15 ± 0,03	3,11 ± 0,31	0,70 ± 0,25	0,26 ± 0,11
Estomac		8,45 ± 1,39	5,73 ± 1,88	0,09 ± 0,02	4,25 ± 0,35	2,08 ± 0,88	0,89 ± 0,93
Os		3,29 ± 0,06	5,99 ± 6,39	0,19 ± 0,02	2,97 ± 0,76	0,63 ± 0,23	0,24 ± 0,06

**Tableau 5.** Etude de biodistribution du F6 marqué à l'iode-125

sur tumeurs sous-cutanées et intrahépatiques LS-174T.

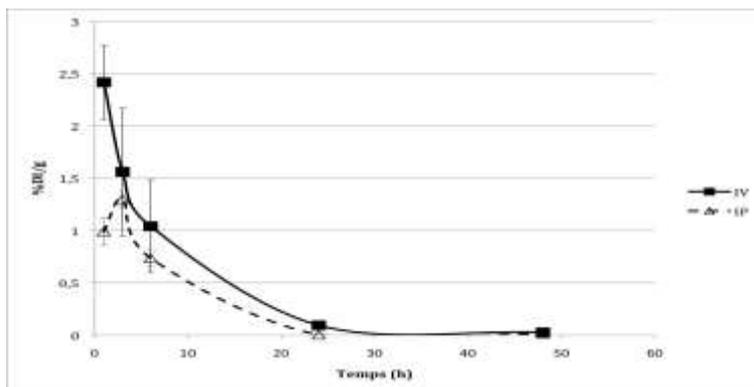
- TF2 :

L'étude de la cinétique sanguine du TF2 mettait en évidence une élimination très rapide de l'anticorps quelle que soit la voie d'injection, intraveineuse (IV) ou intrapéritonéale (IP). Moins de 2,5% DI/g étaient retrouvés dans le sang à 1 heure après injection IV. A 24 heures, seuls  $0,09 \pm 0,04$  % DI/g étaient détectables (**Figure 10**).

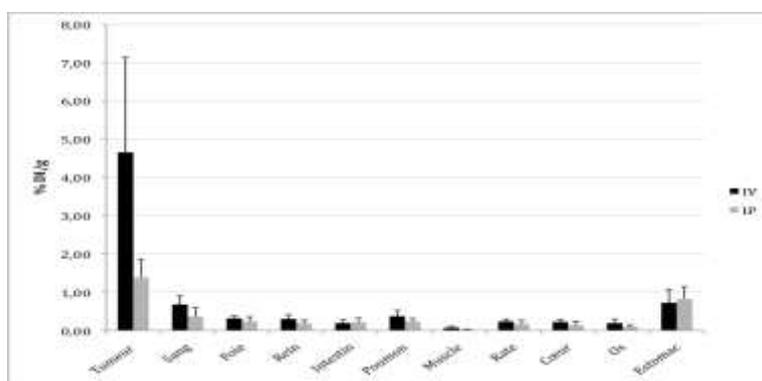
Après injection IP, la diffusion de la molécule du compartiment péritonéal vers le compartiment sanguin s'accompagne d'une augmentation progressive initiale de la concentration sanguine du TF2 avec un maximum atteint à 3 h. Il s'ensuit une décroissance rapide avec des valeurs restant inférieures à la voie intraveineuse aux différents temps. Dans les deux cas, moins de 0,1% DI/g étaient mesuré à 24 heures.

Au niveau tumoral, le maximum de captation était obtenu au temps le plus précoce étudié (1,5 h), décroissant de façon progressive dans le temps. Cependant, la comparaison de la fixation tumorale à 24 h montrait une captation significativement plus élevée après injection par voie intraveineuse par rapport à la voie intrapéritonéale ( $4,65 \pm 2,48$  vs.  $1,38 \pm 0,48$ , pour  $\alpha = 0,05$ ) (**Figure 11**).

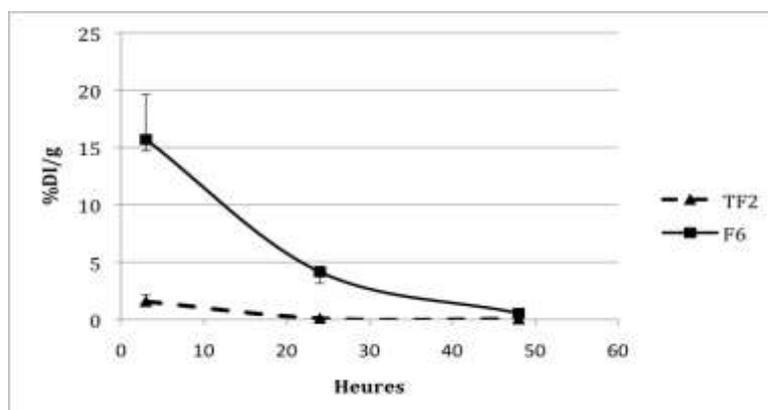
Comparativement au TF2, le F6 présentait une élimination sanguine plus lente dans les deux modèles avec des valeurs comprises entre 15,7 et 19,5 % ID/g à 3 h pour décroître ensuite en dessous de 1% 48 h après injection. A 24 heures, la quantité présente dans le sang était cependant 3 à 4 fois supérieure à celle du TF2 (**Figure 12**). La captation rénale diminuait également rapidement du fait de l'élimination rénale avec moins de 1% DI/g après 24 h.



**Figure 10.** Cinétique sanguine chez la souris du TF2 en fonction de la voie d'administration intraveineuse (IV) ou intrapéritonéale (IP). Injection de 0,4 nmol de  $^{125}\text{I}$ -TF2.



**Figure 11.** Comparaison des données de biodistribution du  $^{125}\text{I}$ -TF2 (0.4 nmol) sur tumeurs sous cutanées 24 h après injection intraveineuse et intrapéritonéale. Les résultats sont exprimés en % DI/g (poids tumoral moyen IV :  $0,131 \pm 0,096$  g, IP :  $0,096 \pm 0,082$  g).

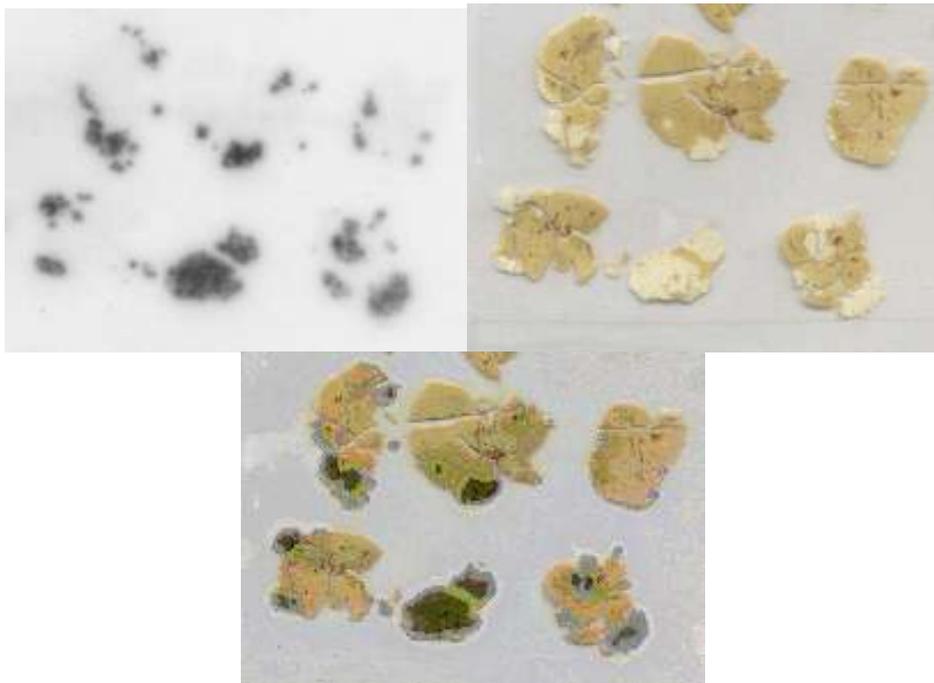


**Figure 12.** Cinétique sanguine comparée après injection de 0,4 nmol de  $^{125}\text{I}$ -F6 et  $^{125}\text{I}$ -TF2.

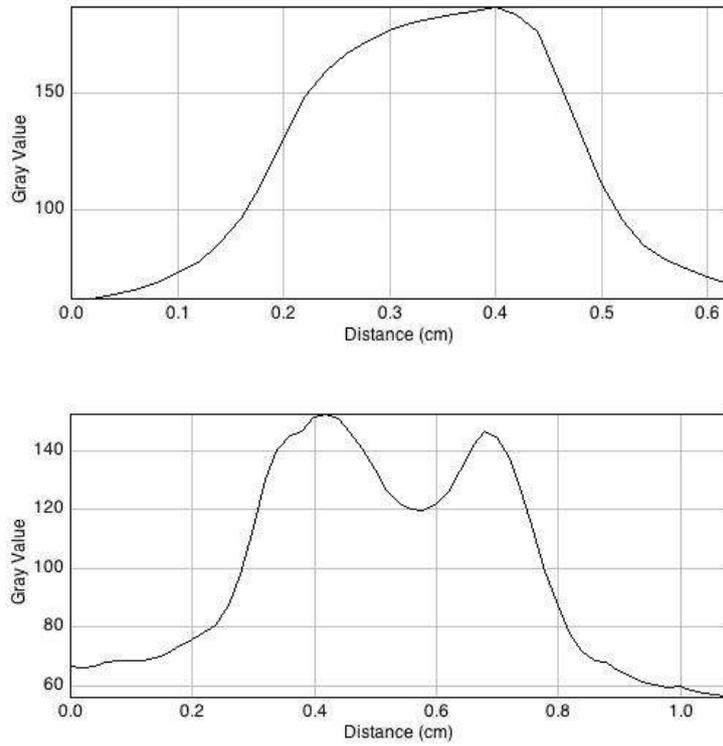
- Etude autoradiographique:

L'exploration par autoradiographie confirmait la fixation sélective des deux anticorps au niveau des tumeurs intrahépatiques. Le profil du dépôt du F6 apparaissait homogène au sein des lésions de petite taille (3-4 mm de diamètre), avec une topographie plus marginale pour les lésions à partir de 5-6 mm.

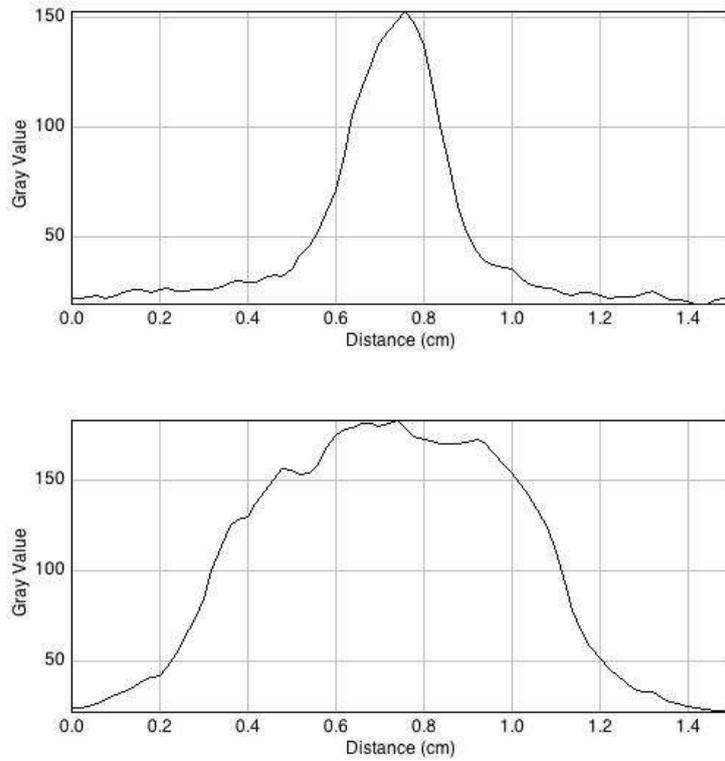
Le profil de captation du TF2 apparaissait homogène à la fois dans les lésions de petite taille de moins de 3-4 mm, mais également dans les lésions plus volumineuses (**Figures 13 à 15**).



**Figure 13.** Autoradiographie du <sup>125</sup>I-TF2 sur tumeurs intrahépatiques, coupe macroscopique correspondante et image de fusion.



**Figure 14.** Profils autoradiographiques de fixation du F6 sur tumeur intrahépatique en fonction de la taille tumorale.

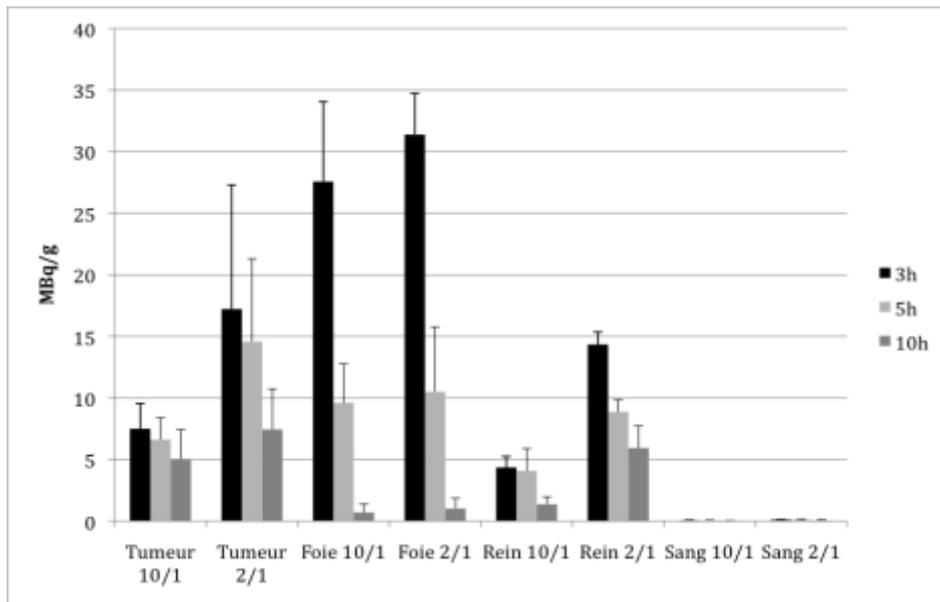


**Figure 15.** Profils autoradiographiques de fixation du TF2 sur tumeur intrahépatique.

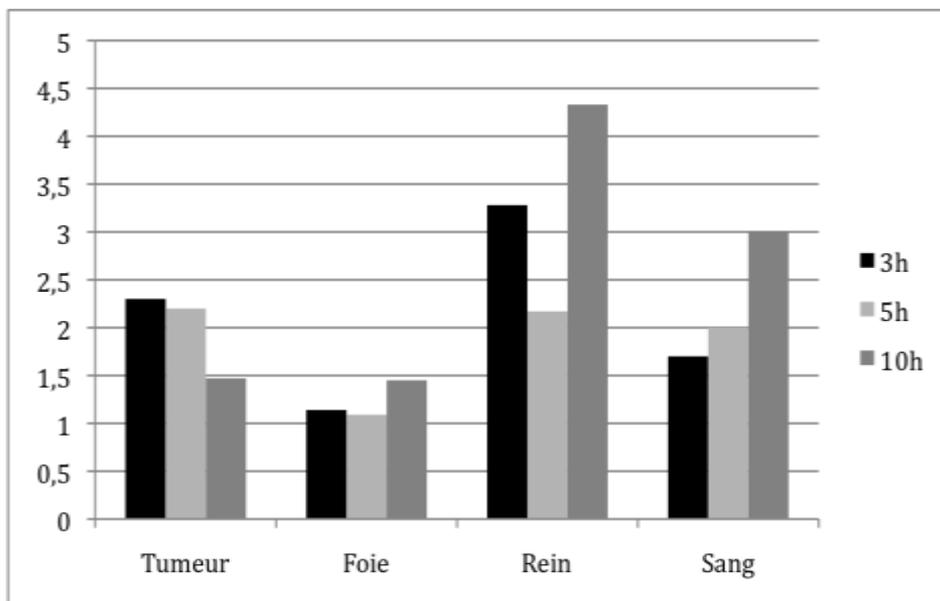
- Influence des doses molaires et des intervalles :

Deux rapports anticorps/peptide ont été explorés (10/1 et 2/1) pour une dose fixe d'anticorps (0,4 nmol) et un intervalle de 24 heures (**Figures 16 et 17**). Les valeurs de captation tumorale (%DI/g) sur modèle sous cutané étaient significativement plus élevées à 5 h et 10 h après injection du peptide radiomarqué à l'iode-125 pour le rapport 10/1 (non significatif au temps précoce de 3 h). Pour une activité injectée 5 fois supérieure avec le rapport 1/2, l'activité au niveau de la tumeur (MBq/g) était multipliée par un facteur 2,3 mais surtout par 4,3 au niveau des reins.

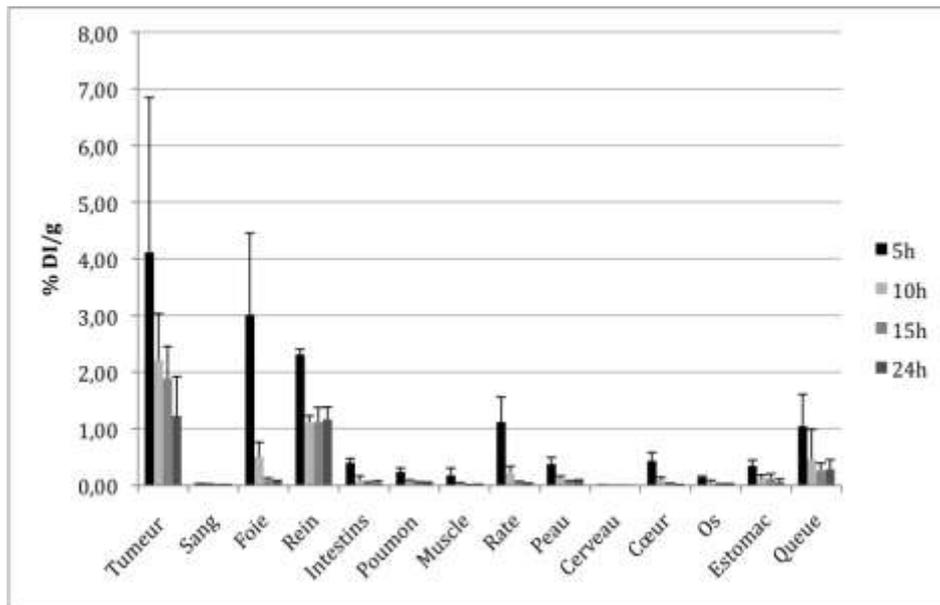
Concernant l'impact de l'intervalle d'injection sur la fixation tumorale, seul l'intervalle le plus court (5 h) présentait une différence significative avec le délai de 24 h (**Figure 18**). En revanche, l'analyse des rapports tumeurs/organes mettait en évidence un profil moins favorable avec une diminution marquée du rapport tumeur/foie (1,36 pour 5 h vs. 21 pour l'intervalle 15 h) (**Figure 19**).



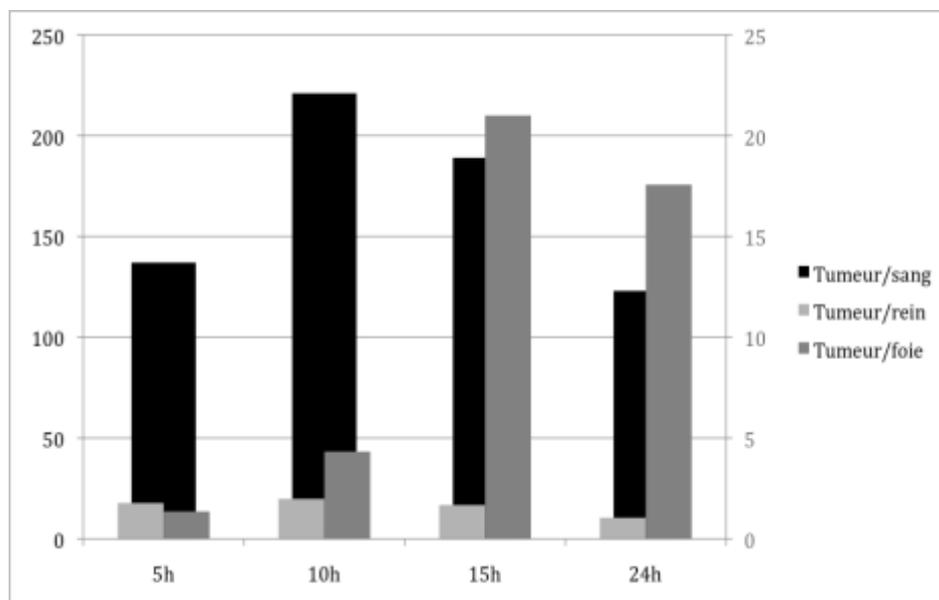
**Figure 16.** Biodistributions comparées de deux doses de peptide préciblé marqué à l'iode-125 (0,04 et 0,2 nmol) pour une dose fixe de TF2 (0,4 nmol) et un intervalle constant de 24 h sur tumeurs sous-cutanées.



**Figure 17.** Rapports des doses entre les deux ratio de préciblage du peptide marqué à l'iode-125 (0,2 / 0,04 nmol) sur tumeurs sous-cutanées.



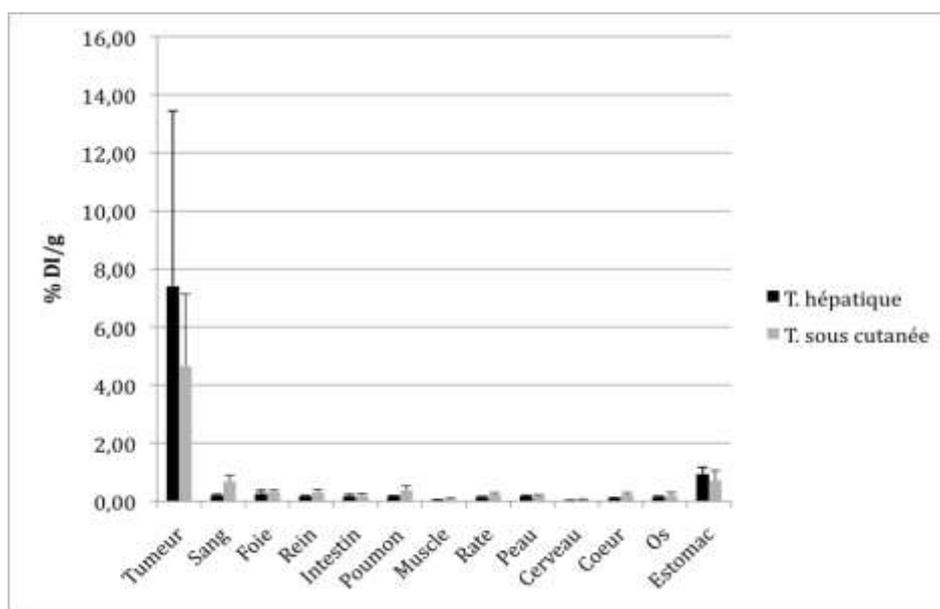
**Figure 18.** Biodistributions comparées au temps 24 h après injection du peptide lors des variations de l'intervalle de préciblage (TF2 0,4 nmol,  $^{125}$ I-IMP 0,04 nmol) sur tumeurs sous-cutanées.



**Figure 19.** Rapports des fixations tumeurs sur organes sains en fonction de l'intervalle d'injection du peptide préciblé (TF2 0,4 nmol et  $^{125}$ I-IMP 0,04 nmol). Les rapports les plus élevés concernent les rapports tumeur/sang (échelle de gauche), l'échelle de droite correspondant aux rapports tumeur/rein et tumeur/foie.

- Comparaison des modèles sous-cutané et intrahépatique :

La captation tumorale du TF2 seul (0,4 nmol) n'apparaissait pas significativement différente à 24h après injection entre tumeurs sous-cutanées et intrahépatiques ( $\alpha=0,05\%$ ) (**Figure 20**).



**Figure 20.** Biodistributions comparées au temps 24 h après injection de 0,4 nmol de  $^{125}\text{I}$ -TF2 entre tumeurs sous-cutanées et intrahépatiques.

En revanche, lors du préciblage par TF2-IMP, la fixation tumorale du peptide était significativement supérieure à 1 heure et 24 heures sur le modèle de tumeurs intrahépatiques par rapport à la localisation sous-cutanée avec une valeur trois fois supérieure à 24 heures (**Tableau 6**).

Les rapports tumeurs/organes étaient élevés (1410 ; 19,6 et 11,2 respectivement pour le sang, le foie et le rein à 24 heures après injection du peptide).

TF2 (0,4 nmol) - <sup>125</sup> I IMP (0,04 nmol), intervalle 24h						
Tissus	Localisation sous-cutanée			Localisation hépatique		
	1 h n=3	24 h n=4	48 h n=3	1 h n=5	24 h n=3	48 h n=3
Tumeur (poids,g)	8,96 ± 1,62 (0,3 ± 0,11)	4,53 ± 3,18 (0,29 ± 0,1)	4,32 ± 2,07 (0,54 ± 0,47)	15,51 ± 7,03 (0,21±0,08)	14,10 ± 5,22 (0,19±0,04)	4,59 ± 1,12 (0,09±0,03)
Sang	0,29 ± 0,26	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,73 ± 1,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Foie	0,24 ± 0,07	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,02	1,13 ± 0,78	0,72 ± 0,63	0,05 ± 0,01
Rein	2,68 ± 0,65	1,26 ± 0,16	1,06 ± 0,12	2,38 ± 1,61	1,26 ± 0,13	0,60 ± 0,11
Muscle	0,15 ± 0,03	0,03 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,28 ± 0,16	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,00
Rate	0,20 ± 0,04	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	1,20 ± 1,73	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,00
Estomac	2,48 ± 0,22	0,18 ± 0,10	0,07 ± 0,06	1,66 ± 1,63	0,32 ± 0,24	0,03 ± 0,02
Os	0,26 ± 0,10	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00	1,52 ± 1,15	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01

**Tableau 6.** Biodistribution comparée du peptide préciblé entre tumeurs LS-174T d'implantation sous cutanée et intrahépatique.

- Etude de biodistribution prolongée sur modèle sous-cutané :

Afin de réaliser une étude dosimétrique ultérieure et de permettre une modélisation, une évaluation précise de la cinétique de fixation du système de préciblage était nécessaire, incluant à la fois des temps précoces compte tenu d'une fixation rapide de l'haptène observée lors des biodistributions initiales et des temps tardifs pour l'élimination, tant au niveau tumoral que des organes sains.

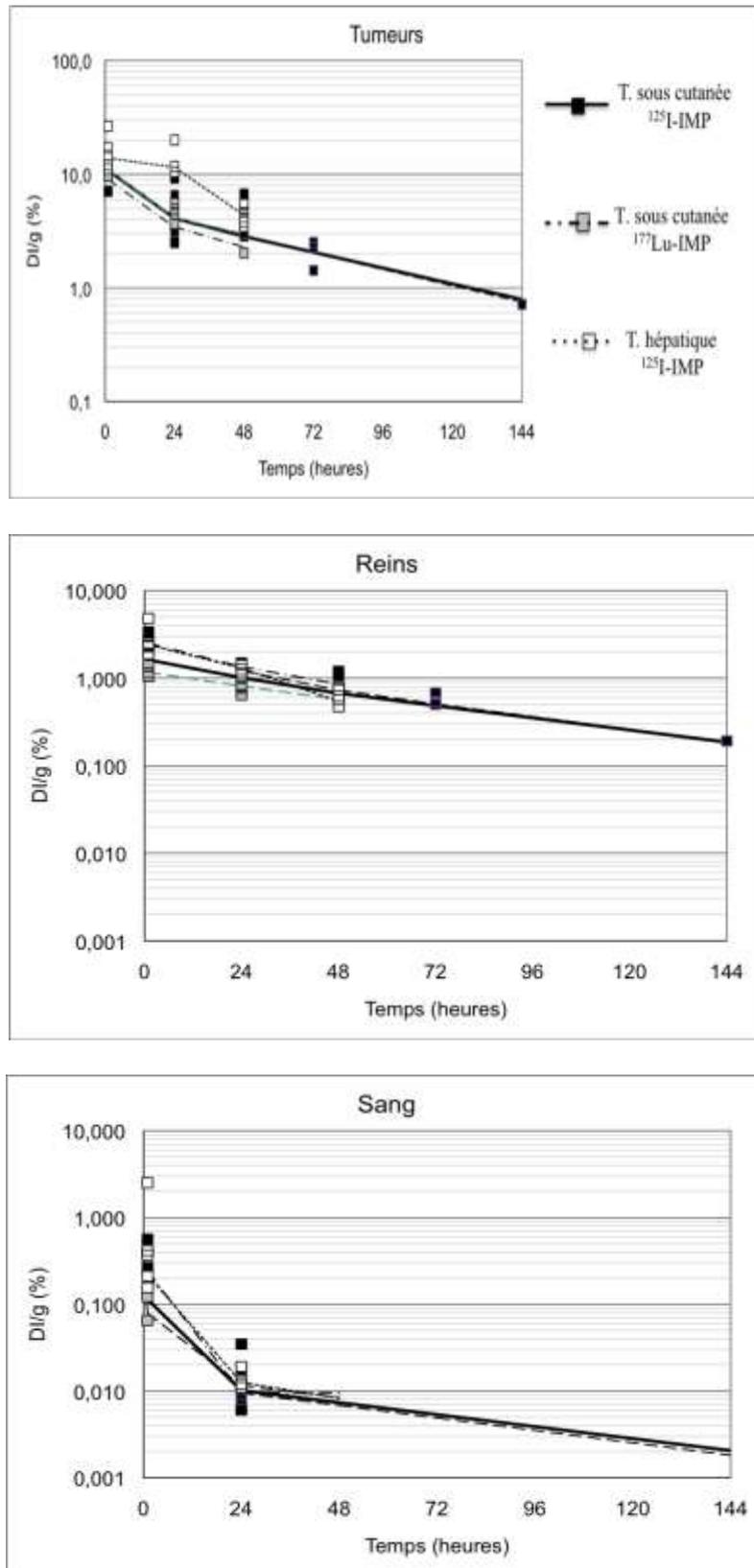
La captation tumorale était rapide, avec un maximum atteint précocement, entre 1 et 2 heures après l'injection du peptide (~9 %DI/g). La clairance au niveau de la tumeur était ensuite progressive, pour atteindre moins de 1 %DI/g à 144 heures (**Tableau 7 et Figures 21**). Au niveau sanguin, l'activité était rapidement éliminée, avec moins de 1% DI/g à 1 heure. A 24 h, l'activité résiduelle était négligeable.

Au niveau rénal, la captation présentait une décroissance progressive, inférieure à 1% DI/g à 48 heures. La fixation restait faible dans les autres organes.

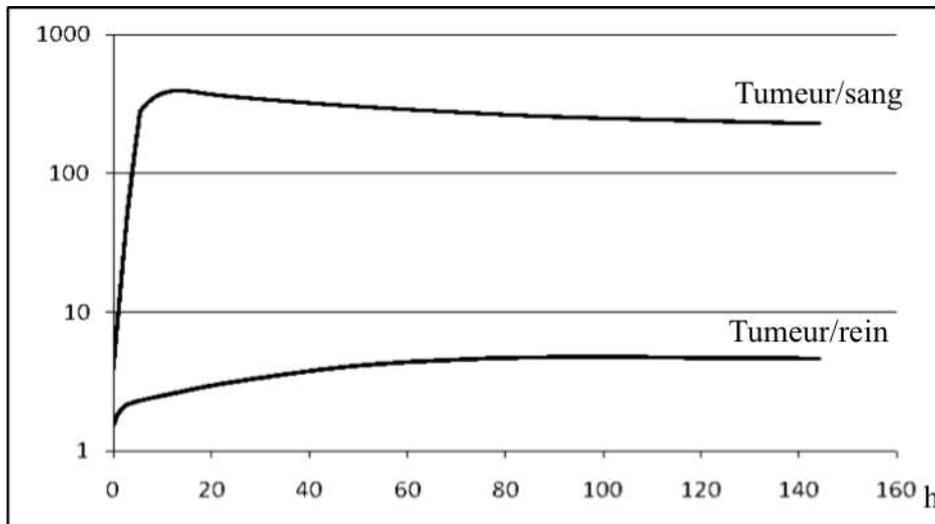
Les rapports tumeur/ tissus non tumoraux étaient particulièrement élevés, dépassant 100/1 à 5 heures pour le sang (**Figure 22**).

Préciblage $^{125}\text{I}$ IMP 325 (TF2 0,4 nmol, IMP-325 0,04 nmol, intervalle 24h)									
	15 mn	30mn	1h	2h	5h	24h	48h	72h	144h
	n=3								
Tissus									
Tumeur	6,95±1,28	7,39±1,49	8,96±1,62	9,13±4,42	5,52±1,47	4,63±1,76	4,04±0,89	2,07±0,57	0,75±0,03
Sang	2,33±0,49	1,05±0,04	0,29±0,26	0,41±0,10	0,05±0,02	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,01
Foie	0,80±0,09	0,43±0,03	0,24±0,07	0,30±0,03	8,00±2,63	0,05±0,01	0,04±0,01	0,04±0,00	0,02±0,00
Rein	6,21±0,88	3,31±0,26	2,68±0,65	4,66±0,82	3,40±1,51	1,26±0,15	0,69±0,11	0,57±0,09	0,19±0,02
Intestin	0,80±0,09	0,42±0,02	0,53±0,48	0,45±0,23	1,39±0,46	0,04±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01	0,01±0,01
Poumon	1,81±0,19	0,96±0,06	0,52±0,15	0,73±0,20	0,66±0,17	0,10±0,10	0,04±0,01	0,03±0,02	0,01±0,00
Muscle	0,63±0,11	0,32±0,08	0,15±0,03	0,10±0,04	0,24±0,12	0,12±0,18	0,01±0,00	0,01±0,00	0,02±0,03
Rate	0,59±0,03	0,34±0,03	0,20±0,04	0,25±0,07	4,20±1,71	0,04±0,01	0,05±0,04	0,03±0,00	0,02±0,00
Peau	2,22±0,27	1,13±0,15	0,99±1,03	0,59±0,17	1,07±0,46	0,09±0,00	0,06±0,02	0,04±0,01	0,03±0,01
Cerveau	0,12±0,05	0,07±0,00	0,04±0,01	0,06±0,03	0,02±0,02	0,00±0,00	0,01±0,01	0,00±0,00	0,00±0,01
Coeur	0,92±0,07	0,42±0,03	0,20±0,06	0,15±0,03	1,59±0,69	0,01±0,01	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
Os	0,53±0,20	0,50±0,16	0,25±0,09	0,13±0,09	0,58±0,11	0,02±0,00	0,01±0,00	0,02±0,02	0,01±0,02
Estomac	1,62±0,26	1,10±0,17	2,48±0,22	2,76±1,47	0,70±0,2	0,04±0,01	0,05±0,05	0,02±0,01	0,02±0,01
Queue	3,11±1,70	2,29±0,64	1,31±0,77	1,11±0,22	1,74±0,8	0,18±0,08	0,19±0,13	0,10±0,03	0,05±0,05

**Tableau 7.** Biodistribution prolongée du système préciblé sur modèle tumoral sous-cutané LS-174T chez la souris.



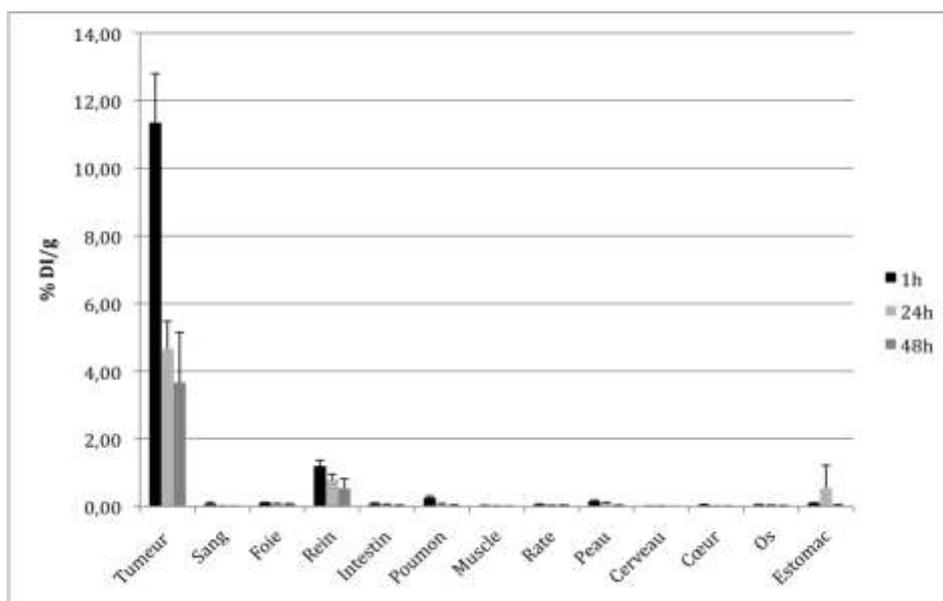
**Figure 21.** Cinétiques modélisées de l'activité de l'IMP préciblé en fonction du modèle tumoral et du radionucléide.



**Figure 22.** Evolution temporelle des rapports tumeur/ tissus non tumoraux après injection du peptide préciblé sur modèle de tumeurs sous-cutanées.

- Comparaison Iode-125 et Lutétium-177 :

La comparaison des % DI /g au niveau des tumeurs sous cutanées ne met pas en évidence de différence significative ( $\alpha=0,05\%$ ) entre le peptide marqué à l'iode-125 ou au lutétium-177. Au niveau rénal, il existe même une tendance à des valeurs inférieures avec le lutétium-177 qui n'atteint pas la significativité (**Figure 23**).



**Figure 23.** Biodistribution sur tumeurs sous-cutanées du peptide préciblé marqué au lutétium-177. (TF2 0,4 nmol, lutétium 177-IMP 0,04 nmol, intervalle 24 h)

- Dosimétrie :

L'évaluation dosimétrique a été réalisée à partir des données de biodistributions selon différentes doses molaires de TF2 et de peptide iode 125-IMP325 (**Tableaux 8 et 9**). Les valeurs fournies ne tiennent pas compte d'un facteur d'efficacité biologique relative (EBR) pour les émetteurs alpha.

Pour une dose molaire équivalente de peptide, les doses absorbées aux tumeurs les plus importantes seraient obtenues avec les émetteurs alpha astate-211 et bismuth-213.

Pour une faible dose molaire de peptide (0,04 nmol), l'émetteur alpha astate-211 permettrait alors d'obtenir la dose absorbée à la tumeur la plus importante (8,3 Gy). La dose absorbée au rein serait cependant également la plus élevée (3,9 Gy) des isotopes étudiés.

Lors de l'augmentation de la dose molaire de peptide, la dose absorbée avec l'astate-211 au niveau du rein deviendrait rapidement limitante.

Des doses molaires plus importantes de peptide (0,27 nmol) seraient nécessaires pour obtenir une dose élevée à la tumeur (10,9 Gy) avec le bismuth-213, en restant dans des limites de doses pour le sang et le rein.

Pour les émetteurs bêta, les doses absorbées au niveau des tissus sains resteraient faibles quelles que soient les doses de peptides utilisées. L'yttrium-90 permettrait cependant de délivrer une dose absorbée à la tumeur élevée de 47,4 Gy pour les tumeurs du plus grand diamètre considéré (6 mm) avec 0,27 nmol de peptide. Les doses les plus faibles seraient obtenues avec l'iode-131 et le lutétium-177.

<sup>125</sup>I-IMP 325 préciblé, intervalle 24h

TF2/IMP (nmol)	0,4/0,04			2/0,1			5/0,27		
	1h	24h	48h	1h	24h	48h	1h	24h	48h
	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3	n=4	n=3	n=3
Tissus									
Tumeur	8,96±1,6	4,63±1,8	4,04±1,8	15,77±1,4	11,98±0,1	6,94±1,1	11,03±2,8	9,9±2,5	7,46±0,4
Sang	0,29±0,3	0,01±0,0	0,01±0,0	0,20±0,0	0,00±0,0	0,00±0,0	0,37±0,1	0,01±0,0	0,01±0,0
Foie	0,24±0,1	0,05±0,0	0,04±0,0	0,18±0,0	0,11±0,1	0,05±0,0	0,25±0,0	0,23±0,0	0,10±0,0
Reins	2,68±0,6	1,26±0,1	0,69±0,1	2,53±0,3	1,17±0,1	0,79±0,0	2,74±0,3	1,67±0,4	0,94±0,2

**Tableau 8.** Résultats des données de biodistribution sur tumeurs sous-cutanées en fonction des doses d'anticorps et de peptide.

IMP 325 préciblé, intervalle 24h, tumeurs sous-cutanées

	TF2 0,4 nmol, IMP 0,04 nmol					TF2 2 nmol, IMP 0,1 nmol					TF2 5 nmol, IMP 0,27 nmol				
	<sup>131</sup> I	<sup>177</sup> Lu	<sup>90</sup> Y	<sup>211</sup> At	<sup>213</sup> Bi	<sup>131</sup> I	<sup>177</sup> Lu	<sup>90</sup> Y	<sup>211</sup> At	<sup>213</sup> Bi	<sup>131</sup> I	<sup>177</sup> Lu	<sup>90</sup> Y	<sup>211</sup> At	<sup>213</sup> Bi
	Tum.														
1 mm	0,7	0,8	0,8	8,3	1,3	3,2	3,8	3,4	32,6	5,3	8,4	9,9	8,7	73,4	11,0
3 mm	0,9	1,26	2,3	8,3	1,3	4,2	5,8	10,2	32,6	5,3	11,1	15,2	25,9	73,3	10,9
6 mm	1,0	1,4	4,1	8,3	1,3	4,5	6,5	18,6	32,5	5,3	11,9	16,9	47,4	73,3	10,9
Rein	0,3	0,4	1,2	3,9	0,8	0,5	0,7	2,1	5,7	1,1	1,6	2,3	7,1	17,5	3,1
Sang	0,01	0,01	0,05	0,15	0,16	0,01	0,02	0,1	0,3	0,3	0,04	0,1	0,3	0,8	1,0

**Tableau 9.** Doses absorbées (Gy) à la tumeur, au rein et au sang en fonction des doses molaires du système de préciblage et du radionucléide employé (ces valeurs ne tiennent pas compte d'un facteur 5 additionnel de RBE pour les émetteurs alpha).

## II. ARTICLE

## Pretargeted radioimmunotherapy of colorectal cancer metastases: models and pharmacokinetics predict influence of the physical and radiochemical properties of the radionuclide

Eric Frampas · Catherine Maurel · Patricia Remaud-Le Saëc · Thibault Mauxion · Alain Faivre-Chauvet · François Davodeau · David M. Goldenberg · Manuel Bardès · Jacques Barbet

Received: 19 May 2011 / Accepted: 2 August 2011  
© Springer-Verlag 2011

### Abstract

**Purpose** We investigated influences of pretargeting variables, tumor location, and radionuclides in pretargeted radioimmunotherapy (PRIT) as well as estimated tumor absorbed doses.

**Methods** LS-174T human colonic carcinoma cells expressing carcinoembryonic antigen (CEA) were inoculated in nude mice. Biodistribution of a bispecific anti-CEA x anti-hapten antibody, TF2, and of a TF2-pretargeted peptide was assessed and a multi-compartment pharmacokinetic model was devised. Tissue absorbed doses were calculated for  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{211}\text{At}$ , and  $^{213}\text{Bi}$  using realistic specific activities. **Results** Under conditions optimized for tumor imaging (10:1 TF2 to peptide molar ratio, interval time 15–24 h), tumor uptake reached  $\sim 9 \text{ ID/g}$  in subcutaneous tumors at 2 h with very low accretion in normal tissues (tumor to blood ratio  $>20:1$  after 2 h). For a low dose of peptide (0.04 nmol),  $^{211}\text{At}$  is predicted to deliver a high absorbed

dose to tumors [41.5 Gy considering a relative biologic effect (RBE) of 5], kidneys being dose-limiting.  $^{90}\text{Y}$  and  $^{213}\text{Bi}$  would also deliver high absorbed doses to tumor (18.6 for  $^{90}\text{Y}$  and 26.5 Gy for  $^{213}\text{Bi}$ , taking RBE into account, for 0.1 nmol) and acceptable absorbed doses to kidneys. With hepatic metastases, a twofold higher tumor absorbed dose is expected. Owing to the low activities measured in blood, the bone marrow absorbed dose is expected to be without significant toxicity.

**Conclusion** Pretargeting achieves high tumor uptake and higher tumor to background ratios compared to direct RIT. Short-lived radionuclides are predicted to deliver high tumor absorbed doses especially  $^{211}\text{At}$ , with kidneys being the dose-limiting organ.  $^{177}\text{Lu}$  and  $^{131}\text{I}$  should be considered for repeated injections.

**Keywords** Radioimmunotherapy · Pretargeting · Bispecific antibody · Colonic cancer · Mice · Radionuclide

E. Frampas (✉) · C. Maurel · P. Remaud-Le Saëc · T. Mauxion · A. Faivre-Chauvet · F. Davodeau · M. Bardès · J. Barbet  
Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers (CRCNA),  
Université de Nantes, Inserm, UMR 892,  
8 quai Moncousi, BP 70721, 44007 Nantes cedex 3, France  
e-mail: eric.frampas@chu-nantes.fr

D. M. Goldenberg  
Immunomedics, Inc.,  
Morris Plains, NJ, USA

D. M. Goldenberg  
Garden State Cancer Center,  
Center for Molecular Medicine and Immunology,  
Morris Plains, NJ, USA

### Introduction

Despite screening campaigns, more than 20% of patients with colorectal cancer will be diagnosed with hepatic metastases and have a spontaneous 5-year survival of only 0–1% [1]. Improvement in chemotherapy has resulted in a significant survival improvement (20.3 vs 15.6 months) [2], but surgery remains the only curative treatment. Radiosensitive hematologic malignancies, such as non-Hodgkin's lymphoma, have benefited from radioimmunotherapy (RIT), a targeted radiotherapy directed against tumor-associated antigens. Nevertheless, RIT has not been as successful in solid

malignancies. The major reasons are a low radiosensitivity and a difficult penetration of the antibodies in solid tumors, reducing the absorbed dose achieved [3]. Dosimetry data previously demonstrated that RIT delivers <30 Gy to tumors at the maximum tolerated activity [4], which appears to be sufficient for lymphoma but not for solid neoplasms.

Thus, the challenge in RIT is to deliver a tumoricidal absorbed dose while sparing normal tissues from toxicity. Due to their long circulating half-life, directly radiolabeled immunoglobulins expose normal tissues and especially the red marrow to excessive radiation that causes hematologic toxicity. Smaller vector molecules were proposed, such as F(ab')<sub>2</sub> antibody fragments, diabodies, or minibodies. These molecules show rapid clearance but also relatively poor tumor accretion, thus not increasing tumor absorbed doses [5]. Another strategy is to provide efficient tumor accretion, while rapidly eliminating non-targeted radioactivity, by using pretargeting strategies. In pretargeting, an unlabeled bispecific antibody, binding both to the tumor antigen and to a small molecule carrying the radionuclide, is first injected. Once accumulated in the tumors and cleared from blood, a selective radioactivity accretion can be achieved with the injection of the radiolabeled hapten while the unbound fraction of activity rapidly clears from blood [6]. Pretargeting with an anti-carcinoembryonic antigen (CEA)-anti-diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) bispecific antibody and a <sup>131</sup>I-bivalent In-DTPA hapten was shown to greatly improve tumor to blood activity ratios in solid tumors [7].

Because pretargeting involves two injections, first the pretargeting agent to prelocalize in the tumor and then the radiolabeled peptide, several parameters must be optimized in order to deliver an efficient absorbed dose to the tumor. This includes kinetics of the different agents, molar doses, molar ratios, and interval of injections to obtain the maximal tumor uptake and tumor to organ ratio [8]. Optimal parameters have been reported previously for imaging in order to gain maximal tumor to organ ratios [9]. In this study, we investigated a novel pretargeting system using a bispecific trivalent antibody against CEA and the histamine-succinyl-glycine (HSG) hapten, TF2, recently developed by the dock-and-lock (DNL) technology [10, 11]. The activity carriers consisted of a DOTA-di-HSG peptide, IMP288, and its In<sup>3+</sup>-loaded form, IMP325, which can be radiolabeled stably with various radionuclides for therapy. Herein, we report biodistribution kinetics of the DOTA-di-HSG peptide pretargeted with the bispecific antibody (bsMAb) TF2 under a variety of conditions to optimize the pretargeting procedure in nude mice for subcutaneous tumors and hepatic metastases of the human colorectal cancer xenograft, LS-174T, expressing CEA. The

kinetics were then fitted to a multi-compartment model to calculate the total number of disintegrations in tissues of interest (tumor, blood, and kidneys) for various radionuclides, based on specific activities achievable in practice. S-factor values from a voxel-based model of the mouse were then used to derive absorbed doses in tumors and kidneys in order to evaluate the most efficient radionuclides in this procedure [12].

## Materials and methods

### Preparation and radiolabeling of the bsMAb (TF2)

TF2 was kindly provided by Immunomedics, Inc. and IBC Pharmaceuticals, Inc. (Morris Plains, NJ, USA). Other chemical reagents were provided by Sigma-Aldrich (Strasbourg, France), <sup>125</sup>I from NEN (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) and <sup>177</sup>Lu from IDB (Petten, The Netherlands). TF2 is a bispecific trivalent antibody, composed of three Fab fragments, assembled by the DNL method, using the natural binding between the regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinase A and the anchoring domains of A kinase anchoring protein. Two Fab fragments come from the humanized monoclonal antibody hMN-14 (labetuzumab, Immunomedics, Inc.), which has binding specificity for human CEACAM5, and one fragment from the humanized monoclonal antibody h679, which specifically binds the HSG hapten. TF2 (156 kDa) has two functional CEA and one HSG binding sites and is stable in serum, retaining 98% of its bispecific binding activity after 7 days [10]. TF2 was radioiodinated with <sup>125</sup>I using iodogen, with 0.4 nmol of TF2 in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, and <sup>125</sup>I (3.7 MBq). The immunoreactive fraction was measured on a tube coated with MAb 14.12.13 to 90%. The ratio of fixation was between 90 and 96%. The specific activity of TF2 was 0.89 MBq/nmol.

### Radiolabeling of the IMP288 and IMP325 peptides

Both peptides were kindly provided by Immunomedics, Inc. The IMP288 peptide (DOTA-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>) contains two HSG moieties and a single DOTA for metal binding. IMP288 was radiolabeled with <sup>177</sup>Lu; 15 μl of ammonium acetate 2.5 mol/l was added to <sup>177</sup>Lu-chlorate solution (150 μl; 1,200 MBq; HCl 0.1 N) in order to obtain <sup>177</sup>Lu-acetate, pH 5.5. The peptide IMP288 in 0.1 M acetate buffer pH 5.5 (20 nmol, 10 μl) was then added and incubated for 20 min at 100°C. To stop the reaction, 15 μl of 0.1 M DTPA solution and 50 μl of ascorbate were added. The radiolabeled solution was controlled by instant thin-layer chromatography on silica gel strips using 0.1 M

citrate buffer, pH 5.0. Under these conditions,  $^{177}\text{Lu}$ -IMP288 has a chromatographic ratio of 0 to 0.1 and free  $^{177}\text{Lu}$  of 1.0. The specific activity was 60 MBq/nmol, and the immunoreactive fraction was 93.5%.

For radiiodination, IMP288 is merely saturated with nonradioactive indium. The  $\text{In}^{3+}$ -loaded IMP288 (In-DOTA-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>) is given the new designation IMP325. The D-tyrosine residue of IMP325 can be labeled with radioactive iodine. IMP325 was radiolabeled according to a previously reported procedure [13]: 4  $\mu\text{l}$  of a 2 mmol/l solution of IMP325 (8 nmol) in 0.5 mol/l sodium phosphate, pH 4.0, was added to 100  $\mu\text{l}$  of a buffer composed of 1.0 mol/l phosphate, 1.0 mol/l acetic acid, and 0.75 mol/l ammonium hydroxide, pH 2.0. The mixture was transferred to a vial containing 370 MBq of  $\text{Na}^{125}\text{I}$ ; 100  $\mu\text{g}$  of iodogen dissolved in 20  $\mu\text{l}$  of dimethylformamide (DMF) was added and briefly mixed on a vortex mixer. After 15–20 min, the contents were added to 400  $\mu\text{l}$  of a freshly prepared quenching buffer (0.1 mol/l cysteine in 0.5 mol/l sodium phosphate, pH 7.4). The mixture was purified by reverse-phase chromatography with a Waters Oasis HLB column. Unbound iodine was removed by washing the column with 2.0 ml of the cysteine buffer followed by 2.0 ml of water. The labeled peptide was eluted with 400  $\mu\text{l}$  of 1:1 ethanol/water mixture. The specific activity of  $^{125}\text{I}$ -IMP325 after HLB purification was 30 MBq/nmol. The IR was measured with a 679 MAb-coated tube. The immunoreactive fraction was measured as 90%.

#### Animal experiments

##### Cell line

LS-174T is a human colonic carcinoma cell line obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), which strongly expresses CEA. Cells were grown in monolayer culture in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Biowest, Paris, France) and 1% glutamine. Aggregated cells were prepared by mechanical means without trypsinization and suspended in saline solution.

##### Animal models

All surgical procedures were performed in accordance with institutional animal welfare guidelines. NMRI-nu (nu/nu) female mice (Janvier<sup>®</sup>, Le Genest St Isle, France; 10–12 weeks old, weight 20–25 g) were housed under standard conditions (standard diet and water ad libitum). They were anesthetized by intraperitoneal injection of 0.2 ml of anesthetic mixture (30 ml phosphate-buffered saline, 5 ml

Ketalar<sup>®</sup> ketamine 80 mg/kg, 3 ml Rompun<sup>®</sup> 2% 15 mg/kg, from Coveto, Montaigu, France). For subcutaneous tumors,  $1 \times 10^6$  isolated cells in 0.2 ml of sterile physiologic serum were injected into the right flank. For hepatic tumors, a short median incision was made and LS-174T Luc + aggregated cells ( $1 \times 10^6$  suspended in 0.1 ml sterile physiologic serum) were injected into the portal vein via a 30-G needle [14]. Antibodies and haptens were injected via the tail vein.

#### Biodistribution studies

A blood pharmacokinetic study with 0.4 nmol of intravenously injected  $^{125}\text{I}$ -TF2 was first investigated. Groups of three to four mice were used for each time point. Animals were euthanized by cervical dislocation. Tumors were dissected from surrounding subcutaneous tissue or liver. Blood, normal liver, spleen, one kidney, and a muscle fragment were collected and weighed, and the amount of radioactivity was measured with a gamma scintillation counter in parallel with a calibrated standard. The results are expressed as the mean percentage of injected dose per gram of tissue (%ID/g)  $\pm$  standard deviation (SD).

Biodistribution of the pretargeted labeled peptide was first assessed in subcutaneous tumors from 15 min to 144 h, with a 24-h time interval between injection of 0.4 nmol of TF2 and 0.04 nmol of  $^{125}\text{I}$ -IMP325. In order to optimize radionuclide delivery to tumors, other pretargeting time intervals (5, 10, and 15 h) were then explored under the same dosing conditions. Uptake of labeled IMP in tumor and tissues was evaluated with a fixed dose of TF2 (0.4 nmol), but with various TF2 to IMP ratios (10:1 and 2:1), with a 24-h pretargeting time interval and sacrificing 24 h after the injection of the radiolabeled peptide. Two other conditions with higher molar doses of peptide (TF2 2 nmol, IMP 0.1 nmol and TF2 5 nmol, IMP 0.27 nmol, interval 24 h) were evaluated to study absorbed doses to the tumors, blood, and kidneys. Biodistribution of  $^{177}\text{Lu}$ -IMP288 was also monitored in subcutaneous tumors to evaluate potential alteration of uptakes with the radiometal-labeled peptide, especially concerning kidneys.

The subcutaneous and hepatic metastatic models of LS-174T were then compared with  $^{125}\text{I}$ -labeled peptide (TF2 0.4 nmol, IMP 0.04 nmol, interval 24 h).

#### Pharmacokinetic analysis

Time-activity curves generated from the biodistribution data were fitted to a multi-compartment model by nonlinear, least-squares regression. Basically, blood pharmacokinetics was described by a linear two-compartment model. Tumor and kidney time-activity curves were then fitted considering

that the activity measured in these tissues corresponded to the activity transferred from the central compartment into an additional compartment. Only tumor and kidneys were evaluated, since these are the only tissues that accumulate enough activity for a meaningful pharmacokinetic study. The same model was used for data obtained with the  $^{125}\text{I}$ -labeled peptide in subcutaneous tumors and for hepatic metastases and with the  $^{177}\text{Lu}$ -labeled peptide in subcutaneous tumors. Areas under the fitted curves were calculated from activity injection up to 144 h by numerical integration, after multiplication by exponentials representing the physical decay of various radionuclides of interest ( $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{211}\text{At}$ , and  $^{213}\text{Bi}$ ).

#### Dosimetry

Dosimetry was calculated from the biodistribution kinetics for 0.04, 0.1, and 0.27 nmol of radiolabeled pretargeted peptide. Radiation doses absorbed by the tumor, blood, and kidneys were calculated, based on radioactive concentrations from tissue samples (Bq/g). Cumulated activities (Bq.s) were measured, taking into account the maximal specific activity of the radiolabeled peptide obtained from our data ( $^{131}\text{I}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ) or described previously in the literature ( $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ) [15, 16]. For  $^{211}\text{At}$ , the lowest specific activity was considered (as for  $^{177}\text{Lu}$ ). Absorbed dose calculations were estimated by multiplying cumulated activity (Bq.s) obtained from biokinetics assessment and S-factors (Gy/Bq.s). S-factors were obtained as follows:

- For  $^{211}\text{At}$  and  $^{213}\text{Bi}$ , alpha emissions in absorbed dose calculations were considered as non-penetrating radiations. Other types of emissions were ignored.
- For  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{90}\text{Y}$  and  $^{131}\text{I}$ , S-factors for kidneys were obtained from a voxel-based model of nude mice weighing 30 g [12, 17], and tumor S-factors (diameters 1, 3, and 6 mm, assuming homogeneous activity distribution) were derived from Bardiès et al. [18].
- Blood S-factors were derived by assuming a 1-g sphere, from OLINDA [19] for  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{90}\text{Y}$  and  $^{131}\text{I}$ , or by considering alpha radiations as non-penetrating for  $^{211}\text{At}$  and  $^{213}\text{Bi}$ .

Emission data were obtained from the MIRD radionuclide data and decay schemes [20]. Absorbed doses are given in Gy, not corrected for relative biologic effect (RBE), except when explicitly stated otherwise in the text. For alpha emitters, a RBE of 5 was considered, as recommended for projecting the possible deterministic biologic effects associated with an estimated absorbed dose [21]. This is in accordance with previously reported values for myelo- and nephrotoxicity of  $^{211}\text{At}$  compared to external beam irradiation [22, 23].

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the nonparametric Student's *t* test for log-rank data, due to the small numbers of animals, using  $\alpha=0.05\%$ .

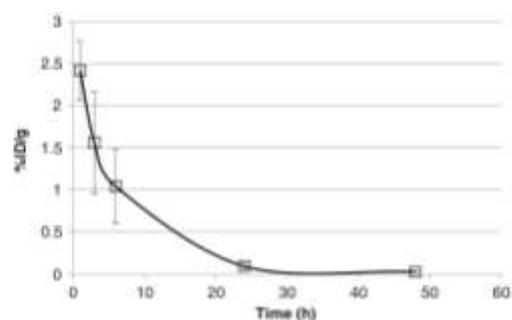
#### Results

##### Optimization of pretargeting in subcutaneous tumors

Mice injected with TF2 showed rapid blood clearance following IV injections. The activity in the blood rapidly decreased from 2.3%ID/g at 1 h to less than 0.1%ID/g 24 h after injection (Fig. 1).

Activity biodistribution was studied over 6 days for subcutaneous tumors with the pretargeting system (0.4 nmol of TF2, 0.04 nmol of  $^{125}\text{I}$ -IMP325, time interval of 24 h) (Table 1). Rapid tumor accretion was observed and, at 2 h after injection, tumor uptake reached  $9.1\pm 4.4\%$ ID/g. The later slow clearance from tumors led to  $0.7\pm 0.1\%$ ID/g at 144 h. By contrast, blood clearance was fast, with less than 1%ID/g in the blood 30 min after injection and nearly undetectable after 24 h (0.01%ID/g). The levels in normal tissues were low except kidneys ( $6.2\pm 0.9$  at 15 min, decreasing to just  $0.7\pm 0.1\%$ ID/g at 48 h after injection). High tumor to non-tumor ratios were achieved as early as 30 min, improving over time. One hour after injection, there were 30- and 3-fold more activity in tumor than in the blood and kidneys, respectively (Table 2). Pharmacokinetics and subcutaneous tumor uptake were quite similar for the  $^{125}\text{I}$ -labeled and the  $^{177}\text{Lu}$ -labeled peptides (Table 3). The lower uptake (%ID/g) in kidneys with the  $^{177}\text{Lu}$ -peptide at the different time points was not significant.

Regarding the influence of the time interval between injections, only the shortest time interval (5 h) showed a



**Fig. 1** Activity in blood after intravenous injection of 0.4 nmol of  $^{125}\text{I}$ -TF2. TF2 rapidly clears from blood with less than 0.1%ID/g 24 h after injection

**Table 1** Biodistribution of pretargeted  $^{125}\text{I}$ -radiolabeled IMP325 in subcutaneous LS-174T colonic carcinoma tumors in nude mice<sup>a</sup>

Tissues	15 min <i>n</i> =3	30 min <i>n</i> =3	1 h <i>n</i> =3	2 h <i>n</i> =3	5 h <i>n</i> =3	24 h <i>n</i> =3	48 h <i>n</i> =3	72 h <i>n</i> =3	144 h <i>n</i> =3
Tumor <sup>b</sup>	6.95±1.28	7.39±1.49	8.96±1.62	9.13±4.42	5.52±1.47	4.63±1.76	4.04±0.89	2.07±0.57	0.75±0.03
Blood	2.33±0.49	1.05±0.04	0.29±0.26	0.41±0.10	0.05±0.02	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.01
Liver	0.80±0.09	0.43±0.03	0.24±0.07	0.30±0.03	8.00±2.63	0.05±0.01	0.04±0.01	0.04±0.00	0.02±0.00
Kidney	6.21±0.88	3.31±0.26	2.68±0.65	4.66±0.82	3.40±1.51	1.26±0.15	0.69±0.11	0.57±0.09	0.19±0.02
Intestine	0.80±0.1	0.42±0.02	0.53±0.48	0.45±0.23	1.39±0.46	0.04±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01
Lung	1.81±0.19	0.96±0.06	0.52±0.15	0.73±0.20	0.66±0.17	0.10±0.10	0.04±0.01	0.03±0.02	0.01±0.00
Muscle	0.63±0.11	0.32±0.08	0.15±0.03	0.10±0.04	0.24±0.12	0.12±0.18	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.03
Spleen	0.59±0.03	0.34±0.03	0.20±0.04	0.25±0.07	4.20±1.71	0.04±0.01	0.05±0.04	0.03±0.00	0.02±0.001
Skin	2.22±0.27	1.13±0.15	0.99±1.03	0.59±0.17	1.07±0.46	0.09±0.00	0.06±0.02	0.04±0.01	0.03±0.01
Brain	0.12±0.05	0.07±0.00	0.04±0.01	0.06±0.03	0.02±0.02	0.00±0.00	0.01±0.01	0.00±0.00	0.00±0.01
Heart	0.92±0.07	0.42±0.03	0.20±0.06	0.15±0.03	1.59±0.69	0.01±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
Bone	0.53±0.20	0.50±0.16	0.25±0.09	0.13±0.09	0.58±0.11	0.02±0.00	0.01±0.00	0.02±0.02	0.01±0.02
Stomach	1.62±0.26	1.10±0.17	2.48±0.22	2.76±1.47	0.70±0.20	0.04±0.01	0.05±0.05	0.02±0.01	0.02±0.01

<sup>a</sup>The molar dose of TF2 was 0.4 nmol and that of IMP325 was 0.04 nmol, with a pretargeting time interval of 24 h

<sup>b</sup>Results are given as mean %ID/g ± SD

higher tumor uptake compared to the 24-h interval ( $4.1 \pm 2.7$  vs  $1.2 \pm 0.7$ ,  $\alpha=0.05\%$ ). If tumor to organ ratios were not different for blood and kidney, significantly lower tumor to liver ratios were observed with the shortest delays (5- and 10-h intervals) compared to longer ones of 15 and 24 h (1.4:1 and 4.3:1 at 5 h vs 21:1 and 17.6:1 at 24 h,  $\alpha=0.05\%$ ). The main disadvantages of short intervals are relatively high activity uptake in kidneys, liver, and spleen ( $3.0 \pm 1.4$  and  $2.3 \pm 0.1$ , respectively, compared to  $4.1 \pm 2.7\%$  ID/g in tumors), potentially leading to radiotoxic effects in case of PRIT (Fig. 2).

Activity biodistribution was studied for two TF2 to peptide ratios (10:1 and 2:1) with a fixed amount of antibody

(0.4 nmol) and pretargeting interval (24 h) (Fig. 3). At a ratio of 10:1, tumor uptake (%ID/g) was significantly higher at 5 and 10 h after the injection of  $^{125}\text{I}$ -IMP325 ( $\alpha=0.05\%$ ). Considering absolute values, a higher activity should be delivered to the tumors at a 2:1 ratio for the same time points after injection (significant,  $\alpha=0.05\%$ ). Nevertheless, this was counterbalanced by higher activities in kidneys and blood by a factor of 2 to 3.

With higher molar doses of TF2 and peptide, the peak of tumor accretion (expressed as %ID/g) was not significantly higher, but tumor uptake remained higher at later time points: at 48 h after injection, tumor activity was  $7.5 \pm 0.4$

**Table 2** Subcutaneous tumor to non-tumor ratios for the biodistributions of pretargeted  $^{125}\text{I}$ -IMP325 (TF2 0.4 nmol, IMP 0.04 nmol)

Pretargeting interval	TF2 (0.4 nmol) pretargeted $^{125}\text{I}$ radiolabeled IMP325 (0.04 nmol)						
	24 h		5 h		10 h		15 h
After IMP injection	30 min	2 h	24 h	48 h	24 h		
Tumor	1	1	1	1	1	1	1
Liver	17.2	30.4	92.6	101	1.3	4.3	21
Kidney	2.2	1.9	3.7	5.8	1.8	2.0	1.7
Blood	7.0	22.3	463	404	137	221	189
Lung	7.7	12.5	46.3	202	17.1	31.6	37.8
Spleen	21.7	36.5	115.7	80.8	3.7	10.5	37.8
Stomach	6.7	3.3	115.7	80.8	11.7	18.4	15.7
Small intestine	17.6	20.3	115.7	202	10.3	24.5	47.2
Tumor weight (g)	$0.67 \pm 0.22$	$0.19 \pm 0.03$	$0.18 \pm 0.05$	$0.42 \pm 0.08$	$0.3 \pm 0.06$	$0.14 \pm 0.12$	$0.15 \pm 0.08$

**Table 3** Effect of tumor location and radionuclide on biodistribution of IMP288 (0.04 nmol) pretargeted by TF2 (0.4 nmol)

Tissues	Pretargeted <sup>a</sup> <sup>125</sup> I-IMP325						Pretargeted <sup>a</sup> <sup>177</sup> Lu-IMP288		
	Subcutaneous tumors			Hepatic metastases			Subcutaneous tumors		
	1 h <i>n</i> =3	24 h <i>n</i> =4	48 h <i>n</i> =3	1 h <i>n</i> =5	24 h <i>n</i> =3	48 h <i>n</i> =3	1 h <i>n</i> =3	24 h <i>n</i> =4	48 h <i>n</i> =3
Tumor <sup>b</sup>	8.96±1.62	4.53±3.18	4.32±2.07	15.5±7.03	14.1±5.22	4.59±1.12	11.3±1.45	4.17±0.7	2.96±1.23
Weight (g)	0.30±0.11	0.29±0.1	0.54±0.47	0.21±0.08	0.19±0.04	0.09±0.03	0.41±0.39	0.54±0.07	0.20±0.22
Blood	0.29±0.26	0.02±0.01	0.01±0.01	0.73±1.00	0.01±0.00	0.00±0.00	0.07±0.06	0.00±0.00	0.00±0.00
Liver	0.24±0.07	0.05±0.00	0.05±0.02	1.13±0.78	0.72±0.03	0.05±0.01	0.10±0.02	0.06±0.02	0.05±0.02
Kidney	2.68±0.65	1.26±0.16	1.06±0.12	2.38±1.61	1.26±0.13	0.60±0.11	1.19±0.18	0.72±0.13	0.43±0.22
Spleen	0.20±0.04	0.04±0.01	0.03±0.01	1.20±1.73	0.06±0.01	0.03±0.00	0.05±0.02	0.02±0.01	0.03±0.01

<sup>a</sup> Pretargeting time interval 24 h

<sup>b</sup> Results are given as mean %ID/g ± SD

vs 4.0±1.8 with 5 nmol of TF2+0.27 of IMP325 and 0.4 nmol TF2+0.04 nmol of IMP325, respectively (Table 4).

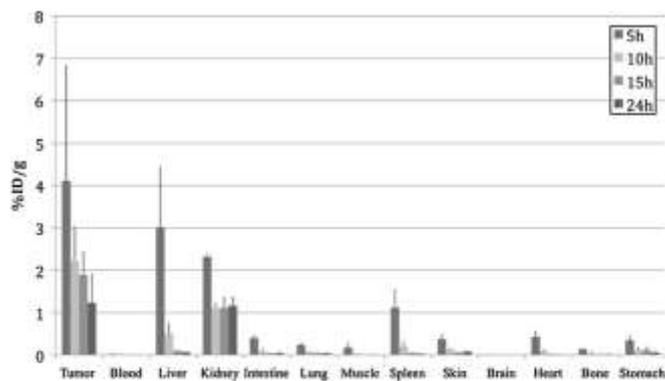
#### Subcutaneous and hepatic model comparison

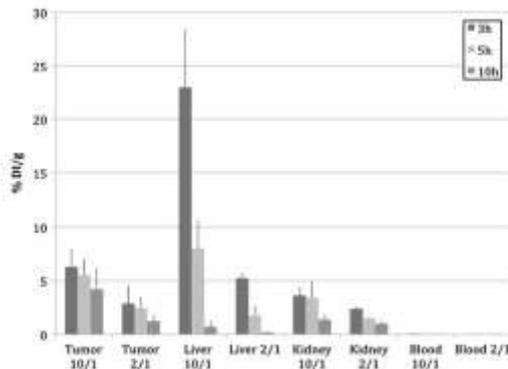
Tumor uptake of TF2 is not different at 24 h after injection (4.65±2.48 and 7.40±6.04%ID/g, respectively, for subcutaneous and hepatic tumors). Autoradiography confirmed selective targeting of TF2 (Fig. 4). In contrast, tumor uptake of the pretargeted radiolabeled peptide was higher in hepatic tumors at comparable times of 1 and 24 h (for  $\alpha$ =0.05%), with a factor of 3 at 24 h (Table 3). Tumor to organ ratios were high (1,410:1, 19.6:1, and 11.2:1, respectively, for blood, liver, and kidneys) 24 h after hapten injection. A higher uptake in the macroscopic normal liver is also observed with the hepatic metastases model that could be explained by microscopic tumor foci.

#### Dosimetry

Biodistribution data were fitted using a multi-compartment model. Blood activity-time curves were well fitted using a two-compartment model. Activities in the tumor and in the kidneys were represented as the sum of one compartment in fast equilibrium with blood and of a tissue-specific distribution compartment. All data could be fitted using the same model (Fig. 5). The model was used to derive, by integration from time 0 to 144 h, the cumulated activities (Bq.s) taking into account the radionuclide decay half-lives and achievable specific activity for various isotopes. Indeed, the DOTA group of the IMP288 peptide may be used for labeling with most metal radionuclides, whereas the D-Tyr group may be used for radioiodination (in that case, the DOTA group is saturated by a nonradioactive metal, e.g., indium). For astatine labeling, the hydroxyl group of the D-Tyr residue may be replaced by a dibutyl-

**Fig. 2** Effects of various pretargeting time intervals (5, 10, 15, and 24 h) on subcutaneous tumor and organ uptakes measured 24 h after <sup>125</sup>I-IMP325 (TF2 0.4 nmol, IMP 0.04 nmol). Shortening the pretargeting time interval increases tumor uptake but also in normal tissues especially kidney and liver





**Fig. 3** Effects of TF2 and peptide molar ratios (10/1 and 2/1) on subcutaneous tumor and organ uptakes with a fixed pretargeting time interval (24 h) and dose of TF2 (0.4 nmol). Mice were necropsied 3, 5, and 10 h after hapten injection

stannyl or dimethyl-stannyl group that will allow stable labeling with astatine using procedures described in the literature. The synthesis of these derivatives is in progress in the laboratory.

Based on these results, absorbed doses in the tumor, blood, and kidneys were calculated, assuming that the activity-carrying peptide was labeled to a realistic specific activity (Table 5). The short-lived radionuclide <sup>211</sup>At appeared efficient to deliver a high absorbed dose to tumors with a low molar dose of peptide (0.04 nmol). The absorbed doses to the tumors were 8.3 Gy for subcutaneous tumors (41.5 Gy considering an RBE of 5), with acceptable absorbed doses to the kidneys (3.9 Gy). Under the same conditions, the other radionuclides delivered low absorbed doses to the tumors, kidneys, and blood as well. The <sup>177</sup>Lu-labeled peptide showed lower kidney accretion than In-labeled IMP (not significant for  $\alpha=0.05\%$ ).

With a molar dose of 0.1 nmol, the  $\beta$ -particle emitter, <sup>90</sup>Y would be able to deliver higher absorbed doses (18.6 Gy) to the largest tumors (6 mm). The alpha emitter

<sup>213</sup>Bi would also be efficient (26.5 Gy with RBE). With both radionuclides, renal and blood doses would remain below toxic doses. For the highest molar dose of peptide (0.27 nmol), <sup>213</sup>Bi was predicted to deliver an efficient absorbed dose to the subcutaneous tumor of 54.5 Gy (with RBE) with acceptable absorbed dose to the kidney and blood (3.1 and 1.0 Gy, respectively). <sup>90</sup>Y would permit high doses to the tumors in contrast to particularly low doses to normal tissues. <sup>211</sup>At could not be considered further due to toxic absorbed doses to healthy tissues.

The beta emitters, <sup>131</sup>I and <sup>177</sup>Lu, would deliver the lowest absorbed doses to the tumors. Nevertheless, absorbed doses to normal tissues are low (less than 2.3 Gy in kidneys and 0.1 Gy in blood).

From comparisons between subcutaneous and hepatic tumors, a twofold higher absorbed dose to the tumors is expected in hepatic metastases with the same amount of peptide administered (Table 6).

**Discussion**

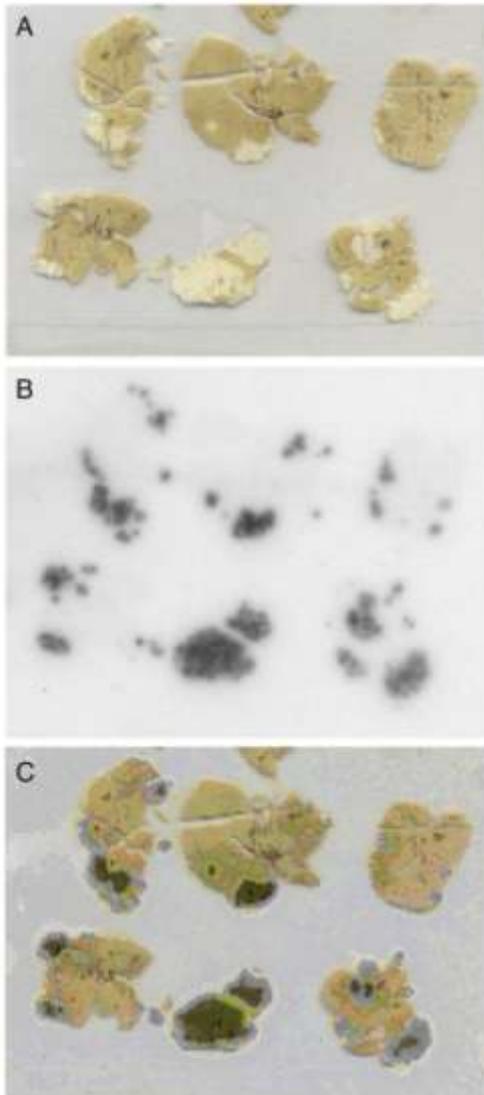
In this study, we investigated the optimization of a pretargeting procedure for radioimmunotherapy with a bispecific anti-CEA x anti-hapten antibody TF2 and the di-HSG-DOTA peptide IMP288. We demonstrate that short-lived radionuclides are predicted to have favorable pharmacokinetics and biodistribution properties, and a good toxicity profile for therapy.

Compared to conventional direct targeting, the pretargeting process (PRIT) provides separate administrations of the antibodies and the radiolabeled effector. This model introduces new complexities to optimize the treatment protocol. Three main parameters are known to influence pretargeting efficiency: molar doses and structure of each compound, time interval between injections, and bispecific antibody to peptide ratios [24]. TF2, like other DNL constructs, is a trivalent bispecific antibody that is bivalent for the tumor antigen, CEA. This bivalency is expected to increase tumor accretion as

**Table 4** Biodistribution of pretargeted <sup>125</sup>I-radiolabeled IMP325 for various molar amounts of TF2 and of IMP325 in subcutaneous LS-174T colonic tumors in nude mice

TF2/IMP (nmol)	0.4/0.04			2/0.1			5/0.27		
	1 h n=3	24 h n=3	48 h n=3	1 h n=3	24 h n=3	48 h n=3	1 h n=4	24 h n=3	48 h n=3
Tissues <sup>a</sup>									
Tumor	8.96±1.62	4.63±1.8	4.04±1.8	15.77±1.38	11.98±0.65	6.94±1.13	11.03±2.77	9.90±2.46	7.46±0.38
Blood	0.29±0.26	0.01±0.0	0.01±0.0	0.20±0.04	0.00±0.0	0.00±0.00	0.37±0.12	0.01±0.01	0.01±0.01
Liver	0.24±0.07	0.05±0.0	0.04±0.0	0.18±0.02	0.11±0.08	0.05±0.01	0.25±0.04	0.23±0.05	0.10±0.05
Kidney	2.68±0.65	1.26±0.16	0.69±0.1	2.53±0.34	1.17±0.13	0.79±0.00	2.74±0.31	1.67±0.37	0.94±0.22

<sup>a</sup> Results are given as mean %ID/g ± SD

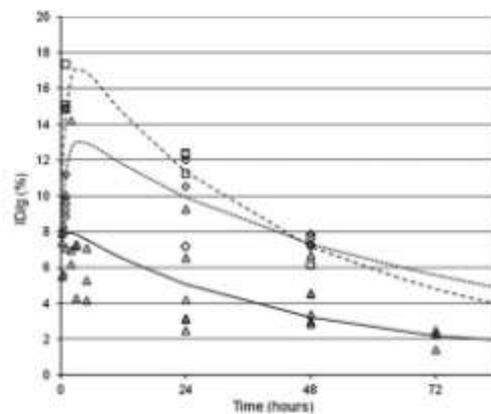


**Fig. 4** TF2 selective uptake of hepatic tumors. **a** Anatomical slice, **b** Autoradiographs of  $^{125}\text{I}$ -radiolabeled TF2 (0.4 nmol) obtained 24 h after TF2 injection, **c** Corresponding fusion image assessing selective and homogeneous fixation on tumors

compared to the previously used bispecific monovalent antibodies, which had only one binding site for the tumor antigen and one for the haptén [25]. In murine tumor models, tumor uptake of DNL constructs varied from 3%ID/g with

anti-CEA-TF2 at 18 h after injection to 5%ID/g at 24 h for anti-CD20-TF4 [15, 26]. In our study, TF2 uptake in subcutaneous tumors reached  $4.6 \pm 2.5\%$  ID/g 24 h after intravenous injection.

The pretargeting time interval is of major importance. A too-short interval may lead to insufficient elimination of circulating bispecific antibody and to the formation of circulating bispecific antibody-peptide complexes that reduce clearance of the injected activity. If too long, the bispecific antibody may clear from the tumor target before the radiolabeled peptide is available. TF2 presents a rapid blood clearance in mice, being longer in rabbits or human [27]. To avoid bispecific antibody-peptide complex formation in blood, a concentration of bispecific antibody lower than 1% ID/g has been recommended before the injection of the radiolabeled peptide [28]. Less than 2.5 and 0.09%ID/g were measured in blood, respectively, at 1 and 24 h following injection. This is consistent with the higher tumor uptake measured with a short pretargeting time interval (5 h), counterbalanced by higher normal tissue uptakes, particularly in liver, kidneys, and spleen, with potential toxic side effects in case of PRIT. On the other hand, a previous study indicated that a longer pretargeting time interval such as 48 h reduces blood concentration of the antibody and increases the tumor to blood ratio, allowing the injection of higher activities for PRIT. Nevertheless, kidney uptake was not decreased by this longer pretargeting time interval [27]. Therefore, for the explored model, intervals between 15 and



**Fig. 5** Activity uptake kinetics in tumors for varying molar amounts of TF2 and  $^{125}\text{I}$ -labeled IMP325. For the same pretargeting time interval of 24 h, various doses of TF2 and  $^{125}\text{I}$ -labeled IMP325 were injected to subcutaneous tumor-bearing mice, *Triangles and solid line*: 0.4 nmol of TF2 and 0.04 nmol of  $^{125}\text{I}$ -labeled IMP325; *squares and dashed lines*: 2.0 nmol of TF2 and 0.1 nmol of  $^{125}\text{I}$ -labeled IMP325; *diamonds and dotted lines*: 5.0 nmol of TF2 and 0.27 nmol of  $^{125}\text{I}$ -labeled IMP325

**Table 5** Dosimetry results for IMP325 pretargeted to subcutaneous tumors\*

	TF2 0.4 nmol, IMP 0.04 nmol					TF2 2 nmol, IMP 0.1 nmol					TF2 5 nmol, IMP 0.27 nmol				
	<sup>131</sup> I	<sup>177</sup> Lu	<sup>90</sup> Y	<sup>211</sup> At <sup>b</sup>	<sup>213</sup> Bi <sup>b</sup>	<sup>131</sup> I	<sup>177</sup> Lu	<sup>90</sup> Y	<sup>211</sup> At <sup>b</sup>	<sup>213</sup> Bi <sup>b</sup>	<sup>131</sup> I	<sup>177</sup> Lu	<sup>90</sup> Y	<sup>211</sup> At <sup>b</sup>	<sup>213</sup> Bi <sup>b</sup>
Activity (MBq) <sup>c</sup>	3.0	3.4	5.2	2.2	3.4	7.4	8.6	13.0	5.5	8.5	20.0	23.2	35.0	15.0	23.0
Tissues	Absorbed doses <sup>d</sup> (Gy)					Absorbed doses <sup>d</sup> (Gy)					Absorbed doses <sup>d</sup> (Gy)				
Tumor 1 mm	0.7	0.8	0.8	8.3	1.3	3.2	3.8	3.4	32.6	5.3	8.4	9.9	8.7	73.4	11.0
Tumor 3 mm	0.9	1.3	2.3	8.3	1.3	4.2	5.8	10.2	32.6	5.3	11.1	15.2	25.9	73.3	10.9
Tumor 6 mm	1.0	1.4	4.1	8.3	1.3	4.5	6.5	18.6	32.5	5.3	11.9	16.9	47.4	73.3	10.9
Kidney	0.3	0.4	1.2	3.9	0.8	0.5	0.7	2.1	5.7	1.1	1.6	2.3	7.1	17.5	3.1
Blood	0.01	0.01	0.05	0.2	0.2	0.01	0.02	0.1	0.3	0.3	0.04	0.1	0.3	0.8	1.0

\* Absorbed doses (Gy) were calculated using radionuclide data decays and S-factors from a voxel-based model of nude mouse of 30 g

<sup>b</sup> RBE for alpha emitters was not considered in these values

<sup>c</sup> Specific activities (MBq/nmol): <sup>131</sup>I: 74, <sup>177</sup>Lu: 86, <sup>90</sup>Y: 130, <sup>211</sup>At: 55, <sup>213</sup>Bi: 85

24 h appear as the most appropriate, considering tumor uptake and tumor to organ ratios.

Compared to direct targeting with IgG or F(ab')<sub>2</sub> fragments, maximum tumor uptake appears lower. Tumor uptake of a <sup>90</sup>Y-anti-CEA IgG was reported as high as 20.5%ID/g at 24 h, remaining relatively constant over 7 days, compared to the highest uptake of 9.1%ID/g of the pretargeted peptide at 2 h in this study. In our model, a radiolabeled anti-CEA F(ab')<sub>2</sub> antibody fragment showed a maximum tumor uptake of 20.4±4.7%ID/g in subcutaneous tumors and 44.9±12.9%ID/g in hepatic metastases 24 h after administration [14]. Despite lower tumor uptake, the pretargeting strategy results in selective tumor targeting, with minimal toxicity to normal tissues, especially radiosensitive tissues such as bone marrow, due to the rapid clearance of small-sized radioactivity carriers. The amount of peptide in normal tissues remained particularly low, leading to high tumor to non-tumor ratios, especially in the blood [tumor to blood ratio 463 and 1,410 in subcutaneous tumors and in hepatic tumors, respectively, as compared to 4.9 and 18.0 for direct targeting

with the anti-CEA F(ab')<sub>2</sub> antibody]. Blood activity of the radiolabeled hapten never exceeded ~2%ID/g as opposed to 22.6%ID/g in previous reports with IgGs [26, 29]. Since bone marrow toxicity is directly related to the residence time of radioactivity in the blood, the pretargeting strategy appears safer than direct targeting with high molecular weight vectors. For this pretargeting system, the optimal antibody to hapten ratio is between 10:1 and 20:1 with a pretargeting time interval between 15 and 24 h. Under these conditions, maximum tumor uptake reached 9–11%ID/g 1 h after injection, with 30-fold more activity in the tumor than in the blood. Activity rapidly decreased in radiosensitive organs, reaching 1%ID/g in the blood and the kidneys, respectively, 30 min and 24 h after injection.

The DOTA-di-HSG peptide IMP288 allows stable radiolabeling with several radionuclides for pretargeted therapy. For astatine labeling, di-HSG peptides derivatized with dimethyl- or dibutyltin are being prepared. The specific activities that may be achieved in practice, used for dosimetry calculations, come from data obtained in our laboratory for

**Table 6** Comparison of dosimetry results for subcutaneous and hepatic metastases

Tumor diameter (mm)	Subcutaneous tumors					Hepatic metastases					
	1	3	6	Kidney	Blood	1	3	6	Kidney	Blood	
Organ (g)				0.147	1.0				0.147	1.0	
Isotope	Activity (MBq)					Absorbed doses <sup>d</sup> (Gy)					
<sup>131</sup> I	3.0	0.7	0.9	1	0.3	0.01	1.3	1.7	1.8	0.2	0.1
<sup>177</sup> Lu	3.4	0.8	1.3	1.4	0.4	0.01	1.5	2.4	2.6	0.3	0.01
<sup>90</sup> Y	5.2	0.8	2.3	4.2	1.2	0.1	1.4	4.3	7.8	0.9	0.1
<sup>211</sup> At	2.2	8.3	8.3	8.3	3.9	0.2	16.3	16.3	16.3	2.6	0.2
<sup>213</sup> Bi	3.4	1.3	1.3	1.3	0.8	0.2	2.4	2.4	2.4	0.5	0.2

\* Absorbed doses (Gy) were calculated from radionuclide data decays and S-factors from a voxel-based model of nude mice of 30 g based on biodistribution data of pretargeted <sup>125</sup>I-labeled IMP (TF2 0.4 nmol, IMP 0.04 nmol, interval 24 h)

$^{131}\text{I}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ , and from the literature for  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ , and  $^{211}\text{At}$  [15, 16]. Due to contaminants introduced during production and as decay products, the high theoretical maximal specific activities (SA) of molecules radiolabeled with short-lived radionuclides cannot be reached in practice. The actual specific activity values thus remain below the theoretical values [30], and for radionuclides with a short half-life they are several orders of magnitude lower.

Two main categories of emitters have been considered:  $\alpha$ - and  $\beta$ -particle emitters [31]. With a short range (50–100  $\mu\text{m}$ ), a high linear energy transfer (LET) and a high energy (8.3 MeV for  $^{213}\text{Bi}$  and 6.8 MeV for  $^{211}\text{At}$ ), monoenergetic alpha particles are known to induce cytotoxicity to single cells [32]. Due to their path length of several cell diameters, alpha emitters have been demonstrated, both *in vitro* and *in vivo*, to be more effective against single cells or micrometastases. In our study, short-lived  $^{211}\text{At}$  is predicted to deliver the highest absorbed dose to the subcutaneous tumors for all injected activities. The absorbed dose delivered to kidneys with  $^{211}\text{At}$  should be limited to avoid a risk of nephrotoxicity. With an astatinated F(ab')<sub>2</sub> monoclonal antibody, an absorbed dose of 16.4 Gy caused a 50% decrease of the glomerular filtration rate in mice and a dose limit of 10 Gy was considered as acceptable [23]. This absorbed dose was only reached with the highest injected activity of 15 MBq. The absorbed dose limit to the red marrow, calculated as a fraction of the activity in blood [33], has been shown previously to be 4.5 Gy in humans and 6–9 Gy in rodents [34, 35]. These levels are not attained even at the highest injected activity of  $^{211}\text{At}$  (4.0 Gy in blood for 15 MBq) or  $^{213}\text{Bi}$  (5.0 Gy in blood for 23 MBq), considering RBE. When acute radiation toxicity doses are excluded, bone marrow recovery was reported to occur faster in direct targeting with high-LET short-lived  $^{213}\text{Bi}$  than low-LET long-lived  $^{90}\text{Y}$ , based on the effective half-life of the conjugate in the blood or bone marrow [36, 37]. Here,  $^{213}\text{Bi}$  is predicted to be efficient with higher molar doses of peptide, while delivering tolerable irradiation to blood and kidneys.

Despite lower LET and lower energies (0.3–2.3 MeV),  $\beta$ -particle emitters have a longer range in biologic tissues (0.8 and 2.7 mm for  $^{131}\text{I}$  and  $^{90}\text{Y}$  respectively). This may overcome the heterogeneity of tumor uptake via a crossfire effect, fundamental to ensure a sufficient absorbed dose [38]. With all  $\beta$ -particle emitters, the 0.04 and 0.1 nmol amounts of hapten and the resulting activities calculated from practically achievable specific activities were too low for a possible antitumor effect. Higher TF2 doses (2 and 5 nmol) did not seem to saturate the tumor antigen sites, since hapten tumor uptake did not decrease. On the contrary, administration of higher TF2 doses appears to increase the residence time of the hapten in the tumor (Fig. 4). This is consistent with earlier reports showing that

higher amounts of antibodies are necessary to saturate the CEA target in tumors (1.6–3.6 mg) and to cause antibody-hapten complex formation in blood [39]. With this LS-174T cell line, saturation of CEA binding sites by an anti-CEA bispecific F(ab')<sub>2</sub> was shown previously to begin around 7 nmol [8]. Schoffelen and associates demonstrated that above a dose of 5 nmol of TF2, maximum tumor uptake decreased and the highest amount of radioactivity in the tumor was obtained with 0.28 nmol of IMP288 [15]. With these higher molar doses of peptide,  $^{90}\text{Y}$  is calculated to deliver tumor-killing absorbed doses for the largest considered tumors (6 mm) with limited effect on normal tissues. With  $^{131}\text{I}$  and  $^{177}\text{Lu}$ , the low doses to blood and kidneys should allow cumulative tumor-killing absorbed doses to be reached by repeated injections of both TF2 and hapten, as shown in the above-mentioned publication [15].

Tumor uptake is crucial for RIT and does not depend exclusively on the agents. In this study, tumor uptake was significantly higher for hepatic lesions as compared to subcutaneous ones. Numerous explanations have been given, based both on targets and access of the antibodies to these targets. Vogel et al. demonstrated a higher intratumoral concentration of CEA in hepatic lesions of LS-174T cells compared to subcutaneous locations (25.6 vs 9.2  $\mu\text{g/g}$ ). This higher concentration was associated with a higher tumor uptake of an anti-CEA monoclonal antibody (IgG1, MAb 35) 24 h after injection (41.0 vs 17.7%DI/g) [40]. Also, highly vascular conditions appear to be more favorable for antibody diffusion in the liver. Using a fluorescent antibody, Fidarova et al. reported a higher intratumoral distribution despite few intratumoral vessels, with diffusion arising from a highly vascularized tumor capsule [41]. From our biodistribution data, a twofold higher absorbed dose to the hepatic tumors compared to subcutaneous tumors is observed.

In summary, pretargeted radioimmunotherapy has advanced the prospects for improved RIT but must be finely tuned to match biodistribution data and the physical half-life of the radionuclide in order to optimize efficacy. Due to rapid clearance, short-lived radionuclides are predicted to have favorable pharmacokinetics and biodistribution properties, and a good toxicity profile for therapy. The alpha emitter,  $^{211}\text{At}$ , is predicted to provide the highest tumor absorbed doses, but it is associated with potential nephrotoxicity, compared to  $^{213}\text{Bi}$ . Beta emitters, such as  $^{90}\text{Y}$  could be effective against larger tumors, with a favorable blood and kidney dosimetry.  $^{177}\text{Lu}$  and  $^{131}\text{I}$  should be of interest if repeated injections are considered, due to low doses to blood and kidneys.

**Acknowledgments** We thank Robert M. Sharkey, Ph.D., for critical review of this manuscript. We are grateful to William McBride, Ph.D., for providing the peptides, and Chien-Hsing Chang, Ph.D., and Edmund A. Rossi, Ph.D., for the TF2 construct.

**Financial support** This work was carried out with the financial support of the European Commission FP7 Collaborative Project program, contract TARCC n HEALTH-F2-2007-201962.

**Conflicts of interest** D.M. Goldenberg is employed by or has financial interest in Immunomedics, Inc., and/or IBC Pharmaceuticals, Inc. The other authors declare that they have no conflicts of interest.

## References

1. Simmonds PC. Palliative chemotherapy for advanced colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Colorectal Cancer Collaborative Group*. *BMJ* 2000;321:531–5.
2. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335–42.
3. Zhu H, Baxter LL, Jain RK. Potential and limitations of radioimmunodetection and radioimmunotherapy with monoclonal antibodies. *J Nucl Med* 1997;38:731–41.
4. Tempers M, Lechner P, Baranowska-Kortylewicz J, Hamison K, Augustine S, Schlim J, et al. High-dose therapy with 90yttrium-labeled monoclonal antibody CC49: a phase I trial. *Clin Cancer Res* 2000;6(8):3095–102.
5. Goldenberg DM, Chatal JF, Barbet J, Boerman O, Sharkey RM. Cancer imaging and therapy with bispecific antibody pretargeting. *Update Cancer Ther* 2007;2(1):19–31.
6. Le Doussal JM, Martin M, Gautherot E, Delaage M, Barbet J. In vitro and in vivo targeting of radiolabeled monovalent and divalent haptens with dual specificity monoclonal antibody conjugates: enhanced divalent hapten affinity for cell-bound antibody conjugate. *J Nucl Med* 1989;30:1358–66.
7. Le Doussal JM, Graux-Guyon A, Martin M, Gautherot E, Delaage M, Barbet J. Targeting of indium-111-labeled bivalent hapten to human melanoma mediated by bispecific monoclonal antibody conjugates: imaging of tumors hosted in nude mice. *Cancer Res* 1990;50:3445–52.
8. Gautherot E, Le Doussal JM, Bouhou J, Manetti C, Martin M, Roxvick E, et al. Delivery of therapeutic doses of radioiodine using bispecific antibody-targeted bivalent haptens. *J Nucl Med* 1998;39(11):1937–43.
9. Sharkey RM, Karacay H, Vällabhajoula S, McBride WJ, Rossi EA, Chang CH, et al. Metastatic human colonic carcinoma: molecular imaging with pretargeted SPECT and PET in a mouse model. *Radiology* 2008;246:497–507.
10. Rossi EA, Goldenberg DM, Cardillo TM, McBride WJ, Sharkey RM, Chang CH. Stably tethered multifunctional structures of defined composition made by the dock and lock method for use in cancer targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(18):6841–6.
11. Goldenberg DM, Rossi EA, Sharkey RM, McBride WJ, Chang CH. Multifunctional antibodies by the dock-and-lock method for improved cancer imaging and therapy by pretargeting. *J Nucl Med* 2008;49:158–63.
12. Bitar A, Lisboa A, Thedrez P, Sai Maurel C, Le Forestier D, Barbet J, et al. A voxel-based mouse for internal dose calculations using Monte Carlo simulations (MNCP). *Phys Med Biol* 2007;52:1013–25.
13. McBride WJ, Zamosico P, Sharkey RM, Norén C, Karacay H, Rossi EA, et al. Bispecific antibody pretargeting PET (immunoPET) with an 124I-labeled hapten-peptide. *J Nucl Med* 2006;47:1678–88.
14. Frampas E, Sai-Maurel C, Thedrez P, Renaud-Le Saëc P, Favre-Chauvet A, Barbet J. The intraportal injection model for liver metastasis: advantages of associated bioluminescence to assess tumor growth and influences on tumor uptake of radiolabeled anti-carcinoembryonic antigen antibody. *Nucl Med Commun* 2011;32(2):147–53.
15. Schoffelen R, van der Graaf WJA, Franssen G, Sharkey RM, Goldenberg DM, McBride WJ, et al. Pretargeted 177Lu radioimmunotherapy of carcinoembryonic antigen-expressing human colonic tumors in mice. *J Nucl Med* 2010;51:1780–7.
16. Karacay H, Sharkey RM, Gold DV, Ragland DR, McBride WJ, Rossi EA, et al. Pretargeted radioimmunotherapy of pancreatic cancer xenografts: TF10-90Y-IMP-288 alone and combined with gemcitabine. *J Nucl Med* 2009;50:2008–16.
17. Bitar A, Lisboa A, Bardès M. S-factor calculations for mouse models using Monte-Carlo simulations. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2007;51:343–51.
18. Bardès M, Chatal JF. Absorbed doses for internal radiotherapy from 22 beta-emitting radionuclides: beta dosimetry of small spheres. *Phys Med Biol* 1994;39(6):961–81.
19. Stabin MG, Sparks RB, Crowe E. OLINDA/EXM: the second-generation personal computer software for internal dose assessment in nuclear medicine. *J Nucl Med* 2005;46(6):1023–7.
20. MIRDO radionuclide data and decay schemes, 2nd ed. Eckerman KE, Enlo A, editors. Reston: The Society of Nuclear Medicine; 2008.
21. Sigmund G, Roeske JC, McDevitt MR, Palm S, Allen BJ, Fisher DR, et al. MIRDO Pamphlet No. 22 (abridged): radiobiology and dosimetry of  $\alpha$ -particle emitters for targeted radionuclide therapy. *J Nucl Med* 2010;51:311–28.
22. Elgqvist J, Bernhardt P, Hultborn R, Jensen H, Karlsson B, Lindgren S, et al. Myelotoxicity and RBE of 211At-conjugated monoclonal antibodies compared with 99mTc-conjugated monoclonal antibodies and 60Co irradiation in nude mice. *J Nucl Med* 2005;46:464–71.
23. Bäck T, Haraldsson B, Hultborn R, Jensen H, Johansson ME, Lindgren S, et al. Glomerular filtration rate after alpha-radioimmunotherapy with 211At-MX35-F(ab')<sub>2</sub>: a long-term study of renal function in nude mice. *Cancer Biother Radiopharm* 2009;24(6):649–58.
24. Sharkey RM, McBride WJ, Karacay H, Chang K, Griffiths GL, Hansen HJ, et al. A universal pretargeting system for cancer detection and therapy using bispecific antibody. *Cancer Res* 2003;63:354–63.
25. Karacay H, Sharkey RM, McBride WJ, Griffiths GL, Qu Z, Chang K, et al. Pretargeting for cancer radioimmunotherapy with bispecific antibodies: role of the bispecific antibody's valency for the tumor target antigen. *Bioconjug Chem* 2002;13(5):1054–70.
26. Sharkey RM, Karacay H, Litwin S, Rossi EA, McBride WJ, Chang CH, et al. Improved therapeutic results by pretargeted radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a new recombinant, trivalent, anti-CD20, bispecific antibody. *Cancer Res* 2008;68(13):5282–90.
27. Sharkey RM, Rossi EA, McBride WJ, Chang CH, Goldenberg DM. Recombinant bispecific monoclonal antibodies prepared by the dock-and-lock strategy for pretargeted radioimmunotherapy. *Semin Nucl Med* 2010;40:190–203.
28. Cardillo TM, Karacay H, Goldenberg DM, Veldell D, Chang CH, Modrak DE, et al. Improved targeting of pancreatic cancer: experimental studies of a new bispecific antibody, pretargeting enhancement system for immunoscintigraphy. *Clin Cancer Res* 2004;10:3552–61.
29. Sharkey RM, Karacay H, Cardillo TM, Chang CH, McBride WJ, Rossi EA, et al. Improving the delivery of radionuclides for imaging and therapy of cancer using pretargeting methods. *Clin Cancer Res* 2005;11(19 Suppl):7109s–21s.
30. Breeman WAE de Jong M, Visser TJ, Erion JL, Krenning EP. Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with

### III. DISCUSSION

La PRIT est un traitement basé sur le préciblage de molécules radiomarquées à l'aide d'anticorps dirigés contre des cibles antigéniques tumorales. Afin d'optimiser la dose délivrée à la tumeur et réduire la toxicité, différents paramètres sont à prendre en compte, intéressant aussi bien les caractéristiques propres du système de préciblage (cinétique de fixation sur la cible, rapports tumeur sur organes sains), les radionucléides utilisés (nature et énergie des particules émises, temps de demi-vie) et la cible tumorale (niveau d'expression et homogénéité de distribution de l'antigène).

Le système de préciblage, basé sur l'utilisation d'un couple anticorps-haptène, nécessite d'étudier les paramètres pharmacocinétiques afin d'optimiser la fixation tumorale et les doses délivrées. Trois paramètres essentiels vont interférer dans ce système : les doses molaires injectées, le ratio anticorps/haptène, l'intervalle d'injection entre l'anticorps et le haptène.

Le TF2 présente une demi-vie d'élimination courte, variant en fonction des espèces animales, plus courte chez la souris que chez le lapin ou l'homme (14 vs. 36 h) (158). Cette élimination sanguine très rapide est favorable au préciblage, avec moins de 2,5% DI/g de sang à 1 h et 0,09% DI/g à 24 h après injection, permettant d'éviter la formation dans le sang d'un excès de couples anticorps circulant-haptène marqué. Une autre condition potentiellement défavorable est représentée par la formation sanguine de complexes entre antigène circulant et anticorps. Celle-ci peut être liée à une concentration élevée d'antigènes dans le sang. Il a été montré chez l'homme un raccourcissement de la demi-vie sanguine d'anticorps de type IgG1 anti-ACE quand la concentration sanguine d'ACE augmentait,

associé à une augmentation du taux de complexation, pouvant varier de 15% à 90% pour des concentrations respectives de 100 et plus de 1100 ng/ml (159).

Compte tenu du faible PM du TF2, la possibilité de réalisation d'injections par voie intrapéritonéale a été soulevée, notamment si des doses et des volumes injectés importants s'avéraient nécessaires chez le petit animal. Cependant, la comparaison de la décroissance de l'activité après administration intrapéritonéale du TF2 met en évidence une fixation inférieure à la tumeur ( $\alpha=0,05\%$ ) lors de l'exploration au temps 24 h par rapport à la voie intraveineuse. Ceci pourrait s'expliquer par un accès rapide du TF2 aux sites antigéniques dès les premiers passages lors de l'injection par voie sanguine, contrairement à une diffusion plus lente et progressive à partir du péritoine vers le compartiment sanguin, parallèlement à la clairance rénale rapide.

Il est possible d'augmenter la dose d'anticorps pour augmenter la fixation tumorale. Des travaux préalables sur modèles tumoraux ont permis d'établir que des doses largement plus importantes d'anticorps, de l'ordre du mg (1,6 à 3,6 mg) étaient nécessaires pour saturer l'ACE (160). Un excès d'anticorps circulant exposerait alors au risque de formation sanguine de couples anticorps-haptène indésirables. Sur lignée LS-174T, la quantité saturante à la tumeur d'un anticorps bivalent de type BsF(ab')<sub>2</sub> anti ACE a été estimée à 5 nmol (94). Avec le TF2, il a été montré que la quantité absolue d'anticorps fixé sur la tumeur n'augmentait pas pour des doses supérieures à 5 nmol. Le maximum de captation tumorale obtenue était alors de 3,21% ID/g sur des tumeurs sous-cutanées dont le poids était compris entre 0,1 et 0,3 g, décroissant ensuite à 1,16% ID/g pour 10 nmol de TF2 injecté (161).

L'utilisation de formes bivalentes d'anticorps ou de haptènes permet d'optimiser la fixation sur la cible cellulaire. L'accumulation tumorale rapportée de la forme bivalente des anticorps est supérieure à la forme monovalente, lors de la comparaison de différentes formes d'anticorps anti ACE (99). De même, s'il n'existe pas de différence aux temps précoces en termes de fixation tumorale, Gautherot et coll. ont démontré la supériorité du caractère bivalent du haptène principalement lié à un relargage plus lent à partir de la tumeur, expliquée par la formation d'un complexe plus stable (94).

L'intervalle représente également un point crucial. Un intervalle trop court expose aux risques de fixation insuffisante de l'anticorps sur la tumeur, de formation de complexes anticorps-haptène dans la circulation et de toxicité rénale. Dans notre étude, si la diminution de l'intervalle à 5 h permettait d'obtenir une différence significative ( $\alpha=0,05$ ) en terme de captation tumorale à 24 h du peptide, elle s'accompagnait en contrepartie d'une augmentation de la captation au niveau hépatique avec un risque potentiel de toxicité. Un allongement du délai permettrait en théorie de diminuer la concentration hématologique de l'anticorps, augmentant le rapport tumeur/sang. Cependant, un intervalle trop long expose au risque de perte de la fixation tumorale ou de dégradation de l'anticorps. Les intervalles de 15 à 24 h semblent donc les plus favorables dans la balance captation tumorale et rapport tumeur/organe sain.

Le ratio anticorps/haptène constitue également un facteur à prendre en compte. Les biodistributions réalisées 5 h et 10 h après injection du peptide sur des tumeurs sous-cutanées (dose fixe de TF2 0,4 nmol, intervalle 24 h) mettaient en évidence une captation significativement plus élevée en terme de % DI/g au niveau tumoral avec le rapport 10/1 comparativement au ratio 2/1. Plus important, l'analyse en terme d'activité montre, que malgré l'administration d'une dose 5 fois supérieure de peptide avec le rapport 2/1, l'activité

maximale mesurée à 3 h à la tumeur n'est multipliée que par un facteur de 2,3 (17,2 vs. 7,5 MBq/g respectivement). Surtout, on note une activité multipliée par 3 à 4 au niveau des reins avec un risque néphrotoxique potentiel. Il n'apparaît donc pas bénéfique de diminuer le rapport anticorps/peptide en terme de bénéfice sur risque toxique.

Au terme de ces différentes études de biodistributions, les conditions optimales retenues sont représentées par un intervalle compris entre 15 et 24 h et des ratio anticorps/peptide de 10/1 et 20/1 pour évaluation dosimétrique dans l'optique d'une thérapie ultérieure. Celles-ci permettent d'obtenir une fixation tumorale tout à fait satisfaisante et précoce (~9-11 % DI/g entre 1 et 2 h après injection du peptide avec 10/1 et 20/1). Si celle-ci reste inférieure à une IgG ( $20,5 \pm 4,1$  %DI/g d'une IgG anti ACE marquée à l'yttrium-90), l'avantage est représenté par une élimination rapide du peptide non fixé et donc de l'activité inutile avec des rapports tumeurs/organes sains élevés et ce, précocement. L'activité au niveau sanguin décroît rapidement avec un rapport tumeur/sang dépassant 20/1 dès 2 heures après injection du peptide contre un rapport proche de 1/1 au cours des premières 24 heures pour l'IgG (162).

L'utilisation d'un peptide de petit PM à élimination rapide a pour but de limiter les effets toxiques au niveau des organes sains. D'un PM de 1456 Da, les peptides tels que l'IMP 288 sont rapidement éliminés de la circulation par filtration glomérulaire, suivie d'une réabsorption au niveau du tubule proximal principalement par phénomène d'endocytose (163). Le risque néphrotoxique peut alors constituer le principal facteur limitant. La possibilité d'un marquage stable du peptide IMP 288 permet alors d'envisager différents radioéléments dans l'optique d'une thérapie.

Bien que les émissions bêta se caractérisent par un TEL plus faible et une cytotoxicité moindre, leur intérêt réside dans un parcours tissulaire plus important permettant, par un phénomène de feu croisé, de pallier l'hétérogénéité des cibles antigéniques. Ceci est notamment vrai dans le cadre de la lignée LS-174T d'adénocarcinome colique moyennement différencié, exprimant l'ACE, dont l'architecture vasculaire tumorale se caractérise par une néovascularisation hétérogène, chaotique à prédominance périphérique avec quelques vaisseaux centro-lésionnels. L'exploration en microdistribution d'un anticorps anti ACE de type IgG a mis en évidence un marquage de distribution hétérogène à prédominance péri-vasculaire en patch avec présence de plages non ciblées, en comparaison d'une lignée bien différenciée SW1222 où la distribution apparaît plus homogène (164).

La présence de DOTA sur le peptide IMP 288 permet son marquage par l'yttrium-90 ou le lutétium-177. Des activités spécifiques élevées sont cependant souhaitables si l'on envisage la thérapie. En pratique, les activités spécifiques (AS) obtenues sont inférieures aux AS théoriques (0,4 vs. 1,8 et 0,1 vs. 0,7 MBq/nmol respectivement pour l'yttrium-90 et le lutétium-177 si l'on considère qu'une nanomole de DOTA peut incorporer une nanomole de radionucléide (165). Ceci est lié à la fois aux conditions de marquage (pH, durée et température) mais également à la présence de contaminants dans les préparations de radionucléides. Dans ce système de préciblage, les trois émetteurs bêta étudiés (iode-131, Lutétium-177 et yttrium-90) sont les nucléides délivrant les doses les plus faibles en Gy, quelle que soit la quantité molaire de peptide injectée. Cependant, il est utile de tenir compte du type de radionucléide utilisé en fonction de la taille tumorale à traiter. Sur un modèle de tumeurs pancréatiques chez le rat, De Jong et coll. ont obtenu une réponse complète chez 100% des rats présentant un volume tumoral intermédiaire ( $8 \text{ cm}^2$ ), contre

50% en cas de tumeurs de petite taille inférieure à 1 cm<sup>2</sup> et 0% pour les tumeurs de plus grand volume > 14 cm<sup>2</sup> après injection de 370 MBq de [<sup>90</sup>Y-DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>] octréotide. En comparaison, le traitement par 2 doses de 277,5 MBq de [<sup>177</sup>Lu-DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>] octréotate permettait d'obtenir des réponses complètes dans 100% et 50 % des animaux présentant des tumeurs de taille respectivement inférieure ou supérieure à 1 cm<sup>2</sup> (166,167).

L'yttrium-90 représenterait donc l'émetteur bêta le plus intéressant pour les tumeurs de taille intermédiaire susceptibles d'absorber au mieux l'énergie émise. L'effet de pénétration tissulaire permettrait de délivrer, comme nous l'avons retrouvé dans notre travail, une dose importante à la tumeur (47,4 Gy) pour les lésions d'un diamètre de 6 mm tout en s'accompagnant par contre de doses faibles aux organes sains (7,1 et 0,3 Gy respectivement pour le rein et le sang). La dose absorbée prévisible au rein resterait largement inférieure à la valeur seuil de néphropathie chronique rapportée de 80-100 Gy avec un fragment Fab marqué (168).

L'iode-131 et le lutétium-177, compte tenu de doses plus faibles à la tumeur, pourraient bénéficier de la répétition des injections afin d'obtenir une activité tumoricide d'autant que l'irradiation aux organes sains apparaît faible. Le lutétium-177 serait également plus approprié pour les tumeurs de petite taille. Bien que l'utilisation de radio-métaux expose au risque accru de toxicité rénale par rétention, au moins pour des vecteurs de petite taille comme les peptides, nous n'avons pas mis en évidence de rétention accrue du lutétium-177 au niveau rénal.

L'émission alpha présente, elle, des caractéristiques de cytotoxicité marquée (5-100 fois/bêta) avec un TEL de l'ordre de 100 keV/μm (60-230) et une valeur d'EBR à considérer de 5 (169). En association avec le faible parcours des particules alpha dans la matière, les

indications thérapeutiques concerneraient de manière préférentielle les tumeurs de faible volume ou sous forme de cellules isolées. L'astate-211 apparaîtrait comme l'élément permettant de délivrer la dose à la tumeur la plus importante des émetteurs alpha, atteignant 8,3 Gy (41,5 Gy si l'on tient compte d'une EBR de 5) pour une quantité faible de peptide (0,04 nmol). Lors de l'augmentation de la dose molaire de peptide marqué, la dose absorbée au rein va rapidement augmenter (5,7 Gy avec 0,1 nmol de peptide). La toxicité rénale dose dépendante de l'astate-211 va alors représenter le facteur limitant puisqu'il a été montré qu'une dose au rein entre 7,5 et 11 Gy est responsable d'une altération de 50% de la fonction rénale (124). Une dose de 10 Gy serait atteinte avec 0,16 nmol de peptide marqué et correspondrait en contrepartie à une dose à la tumeur de 52 Gy. La demi-vie courte de l'astate-211 ne semble pas être un problème compte- tenu de la captation tumorale précoce et de la clairance rapide des organes sains dans le modèle de préciblage. Les autres facteurs limitants restent la disponibilité de l'astate-211 mais également la nécessité de synthétiser des dérivés stannilés pour permettre sa fixation. La mise en route du cyclotron ARRONAX devrait permettre de disposer plus facilement d'astate-211.

Pour le bismuth-213, la dose absorbée à la tumeur est inférieure en comparaison de l'astate-211. Il est cependant possible d'obtenir une dose suffisante lors de l'injection d'une quantité importante de peptide (11 Gy soit 55 Gy si l'on tient compte d'une EBR de 5 avec 0,27 nmol) en restant dans une dose acceptable au rein et au sang (3,1 et 1 Gy respectivement). Un seuil de toxicité responsable d'une néphropathie chronique a été estimé à 11,5 Gy lors de l'utilisation d'un inhibiteur d'activation du plasminogène marqué au bismuth-213 chez la souris (118).

L'étude dosimétrique réalisée a permis de conforter l'hypothèse que les nucléides de demi-vie courte semblent appropriés du fait d'une élimination rapide par voie rénale du peptide marqué et d'une fixation tumorale prédominant dans les premières heures dans ce système de préciblage. La néphrotoxicité représente la principale limite lors de l'augmentation des doses, notamment avec l'astate-211. Si les émetteurs bêta délivrent des doses plus faibles aux tumeurs, les doses également faibles aux organes permettent d'envisager soit l'augmentation de la dose molaire injectée de peptide soit des séquences thérapeutiques par injection répétées.

Ces valeurs reposent cependant actuellement sur des extrapolations à partir d'une modélisation sur les données de l'IMP325 marqué à l'iode-125 et restent théoriques, devant être vérifiées expérimentalement.

La distribution et la concentration de la cible antigénique et donc la fixation de l'anticorps marqué vont également varier en fonction de la taille tumorale et de sa localisation.

Les lésions de petite taille semblent présenter les caractères les plus favorables pour la radioimmunothérapie. Une captation plus importante d'anticorps a été rapportée pour des tumeurs de taille inférieure à 125  $\mu\text{m}$  aux temps précoces (10 min et 1 h), cette différence n'étant plus significative après 24 h. Elle pouvait atteindre 84% DI/g sur mesure autoradiographique pour des tumeurs inférieures à 0,9 mm, avec une IgG anti ACE (A5B7) (170). De même, la distribution du dépôt semble plus favorable pour les petites lésions (171). Un dépôt diffus, homogène ou non, d'une IgG1 anti ACE (F33-104) à faible dose a été démontré dans 85% des cas en cas de lésions hépatiques de moins de 0,5 mm contre seulement 12% dans les tumeurs de plus de 1mm, l'augmentation de dose ( $\times 10$ ) permettant

cependant d'atteindre des taux respectifs de 96 et 63% (172). Cette variation d'homogénéité en fonction de la taille tumorale est retrouvée dans notre étude sur les autoradiographies à l'aide de F6 marqué à l'iode-125 avec une fixation plus marginale pour les tumeurs supérieures à 3-4 mm. Par contre, cette captation restait homogène avec le TF2 sur les lésions de plus grand diamètre, ce qui présenterait une condition plus propice à l'effet thérapeutique ultérieur du peptide préciblé.

Une dose absorbée à la tumeur plus importante, d'un facteur deux, est attendue dans les lésions intrahépatiques sur nos données dosimétriques. Lors de la comparaison entre les localisations sous-cutanée et intrahépatique de la même lignée cellulaire LS-174T, nous avons mis en évidence une captation significativement plus élevée aussi bien du fragment  $F(ab')_2$  en ciblage direct que de l'IMP préciblé au niveau des tumeurs intrahépatiques. Le modèle hépatique est donc particulièrement adapté pour étudier la captation tumorale et valider des études dosimétriques ultérieures, dans des conditions physiopathologiques tumorales plus proches de la réalité. Différentes raisons ont déjà été rapportées, concernant à la fois la cible et l'accès de l'anticorps à celle-ci. Vogel et coll. ont mis en évidence une concentration en ACE intra tumorale supérieure dans les tumeurs hépatiques de lignée LS-174T comparées aux localisations sous-cutanées (25,6  $\mu\text{g/g}$  vs. 9,2  $\mu\text{g/g}$ ). Cette concentration accrue s'associait à une captation plus importante d'un anticorps monoclonal anti-ACE de classe  $\text{IgG}_1$  (Mab 35) 24 heures après injection (41,0 vs. 17,7 % DI/g) (173). Les conditions vasculaires semblent également plus favorables pour permettre l'accès de l'anticorps au site tumoral dans le modèle de métastases intrahépatiques. A l'aide d'un anticorps marqué par fluorescence, Fidarova et coll. ont mis en évidence une distribution intralésionnelle supérieure malgré peu de vaisseaux intra tumoraux, la diffusion se faisant à partir d'une pseudocapsule richement vascularisée (174). Cette diffusion capsulaire apparaît

alors comme l'élément prédominant, la densité vasculaire intratumorale n'influençant pas la captation.

Les métastases de petite taille de localisation hépatique apparaissent donc comme un modèle particulièrement adapté chez l'animal à l'évaluation dosimétrique et thérapeutique de la PRIT (175), puisque, comme on l'a vu, cette approche thérapeutique doit être destinée avant tout aux tumeurs de petite taille voire aux traitements adjuvants, au moins en ce qui concerne les tumeurs solides.

**CHAPITRE V : THERAPIES**

## I. RESUME

Deux essais de radioimmunothérapie sur tumeurs hépatiques ont été initiés à l'aide d'un émetteur bêta (lutétium-177) et alpha (bismuth-213) afin de vérifier les activités injectables, la faisabilité et la tolérance chez la souris. L'évolution tumorale a été appréciée par bioluminescence afin de s'affranchir des points standards de décès ou de perte de poids.

### I.1. Matériels et méthodes :

#### - Modèle animal :

Les tumeurs hépatiques étaient obtenues par injection de  $10^6$  cellules de lignée LS-174T Luc+ par voie intraportale. Afin d'obtenir des lésions de petite taille, une exploration par bioluminescence était réalisée entre 7 et 10 jours après implantation afin de vérifier la prise tumorale et d'homogénéiser les groupes d'animaux avant traitement.

#### - Marquage du peptide:

Après marquage de l'IMP 288, les activités spécifiques obtenues étaient de 55,5 MBq/nmol pour le lutétium-177 et de 74 MBq/nmol pour le bismuth-213.

#### - Protocoles de radioimmunothérapie :

Sept jours après implantation intra-portale, six groupes de 4 animaux ont été sélectionnés afin d'évaluer les effets de la radioimmunothérapie préciblée au bismuth-213. Quatre groupes témoins ont été sélectionnés (absence de traitement, injection de 2 nmol de TF2 seul, injections de 0,2 et 0,1 nmol de peptide marqué) et deux groupes traités selon la

méthode de précipilage (intervalle de 18h, 2 nmol de TF2, 0,2 ou 0,1 nmol de peptide marqué (14,8 et 7,4 MBq).

Pour la thérapie au lutétium-177, 2 nmol de TF2 étaient injectées par voie intraveineuse suivie de 1 nmol d'IMP 288 marqué au lutétium-177 (55,5 MBq). Trois intervalles d'injection ont été évalués : 24 h, 19 h et 10 h pour des groupes de 6 à 7 animaux.

- Suivi :

La toxicité hématologique était suivie par prélèvements sanguins hebdomadaires pour la thérapie au bismuth-213.

L'évolution tumorale était appréciée par exploration régulière en bioluminescence (4 à 6 jours). Pour la représentation de la courbe de signal de BLI pour la thérapie au bismuth-213, deux valeurs de points ont été extrapolées à J23 correspondant à deux souris mortes pour pondérer la valeur moyenne obtenue.

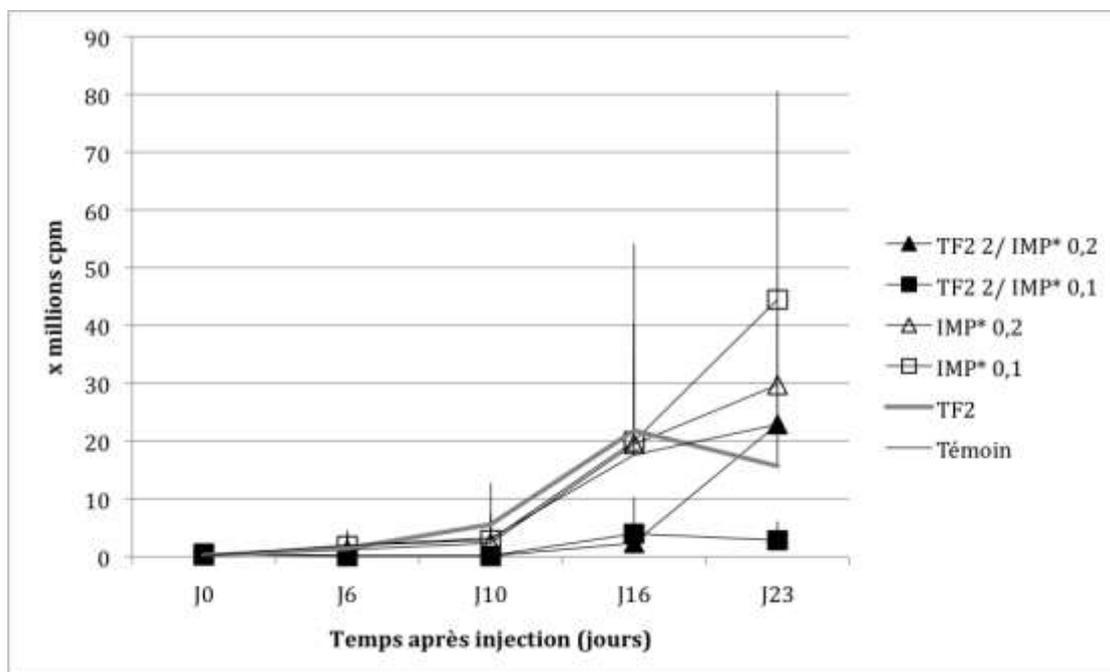
Un délai de 10 jours était adopté pour la première mesure des animaux traités par lutétium-177 compte tenu de l'irradiation et de la demi-vie du nucléide.

Les animaux étaient sacrifiés à titre compassionnel en cas de perte de poids supérieure à 20%, de cachexie.

En bioluminescence, un critère seuil de 20 millions de cpm était retenu comme point final de l'étude au bismuth-213, correspondant à un envahissement diffus du foie. Il était fixé à 10 millions de cpm pour le lutétium-177 compte tenu du nombre de décès rapide au-delà.

## I.2. Résultats :

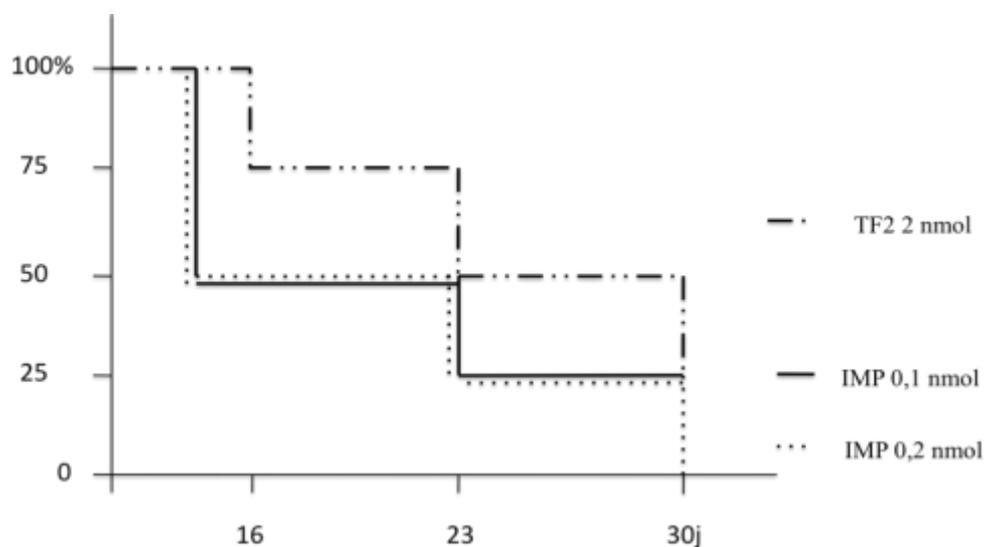
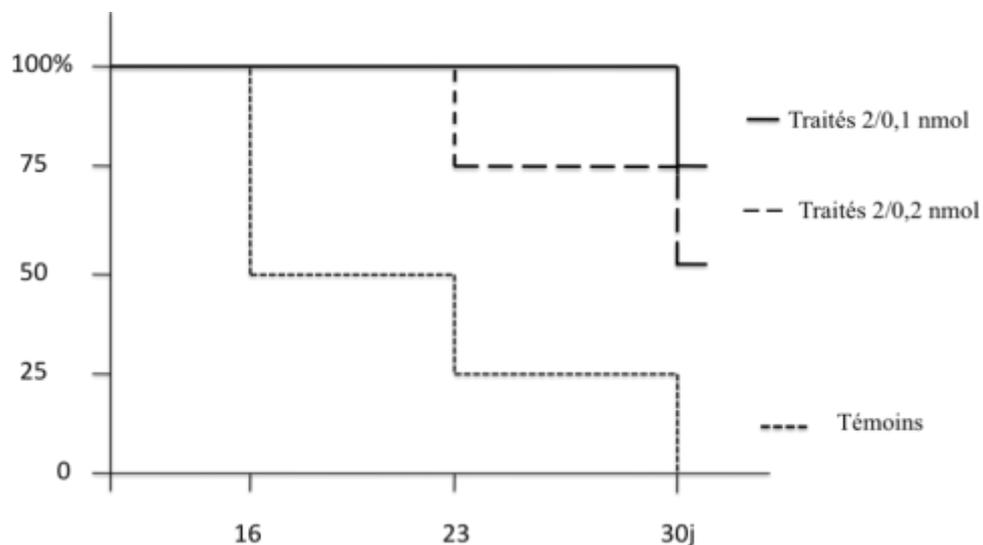
Lors du traitement au bismuth-213, l'évolution temporelle du signal de BLI apparaissait retardée dans les groupes des souris traitées par TF2-IMP avec une croissance débutant à partir du 10<sup>ème</sup> jour après injection contre une progression continue dans les groupes ayant bénéficié de TF2, d'IMP marqué seul ou dans le groupe témoin. Le signal moyen à J23 le plus faible correspondait ainsi au groupe traité par TF2-IMP 288 à la dose 2/0,1 nmol (**Figure 24**).



**Figure 24.** Evolution temporelle du signal de bioluminescence sur tumeurs intrahépatiques LS-174T Luc+ lors du traitement par bismuth-213.

Ceci est illustré par la courbe de Kaplan-Meier mettant en évidence une différence entre les différents groupes avec une « survie à 20 millions de cpm » de 0% pour le groupe témoin comparé à 75% dans le groupe 2/0,1 au 23<sup>ème</sup> jour. Une significativité statistique est cependant difficile à retenir compte tenu des faibles effectifs (4 souris par groupe). Le

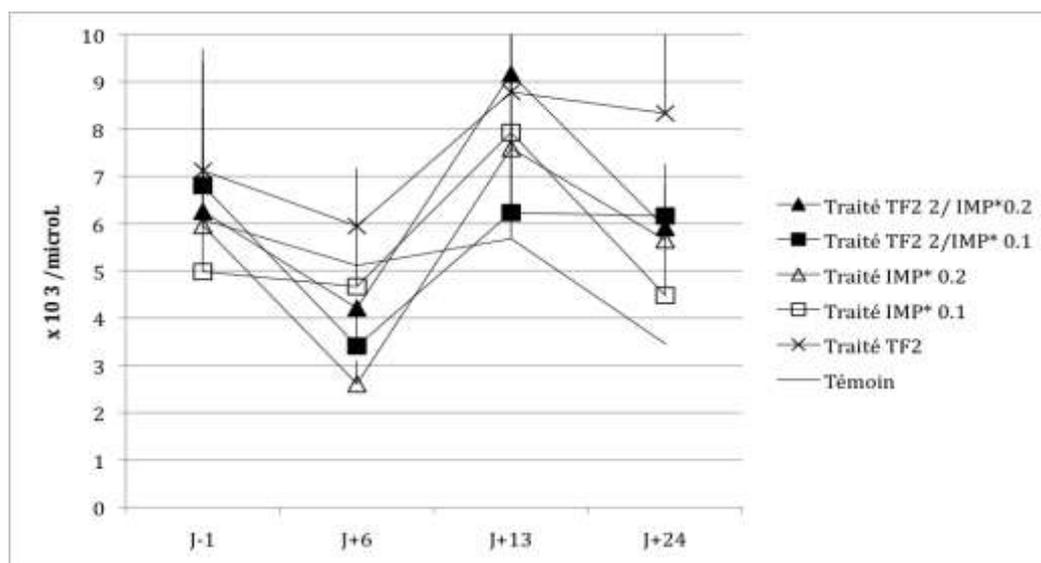
rapport 2/0,1 semblait plus favorable que le rapport 2/0,2. Les courbes sont sensiblement superposables pour l'administration d'IMP ou de TF2 seuls (**Figures 25 et 26**).



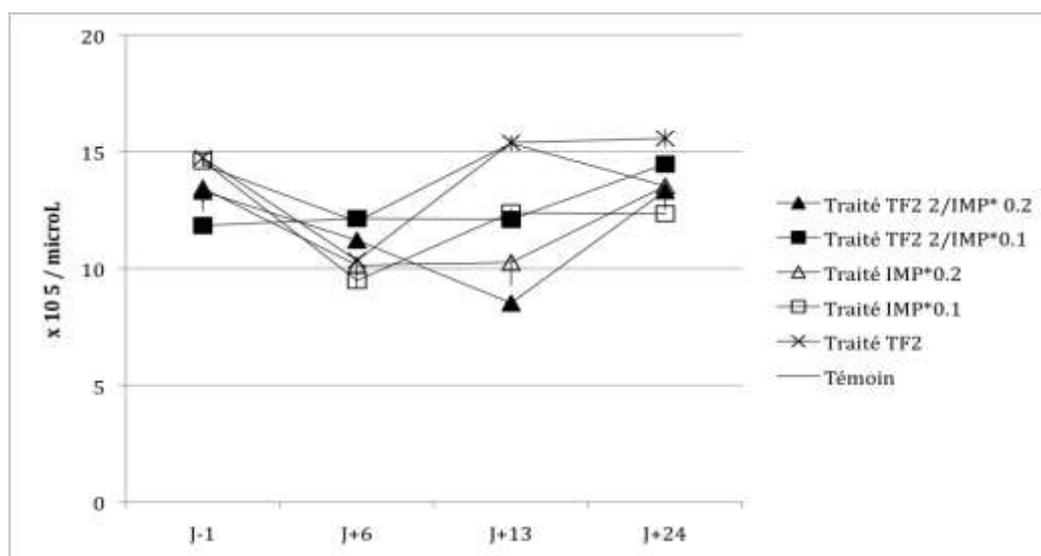
**Figures 25 et 26.** Courbes de pseudo-survie des animaux traités par bismuth-213.

Le point final est représenté un seuil maximal de 20 millions de cpm correspondant à un envahissement massif du foie selon les données de bioluminescence.

Les numérations formules sanguines mettaient en évidence une baisse transitoire des globules blancs à J6 après injection dans les groupes traités, revenant dans des valeurs normales dès J13 (Figures 27 et 28).

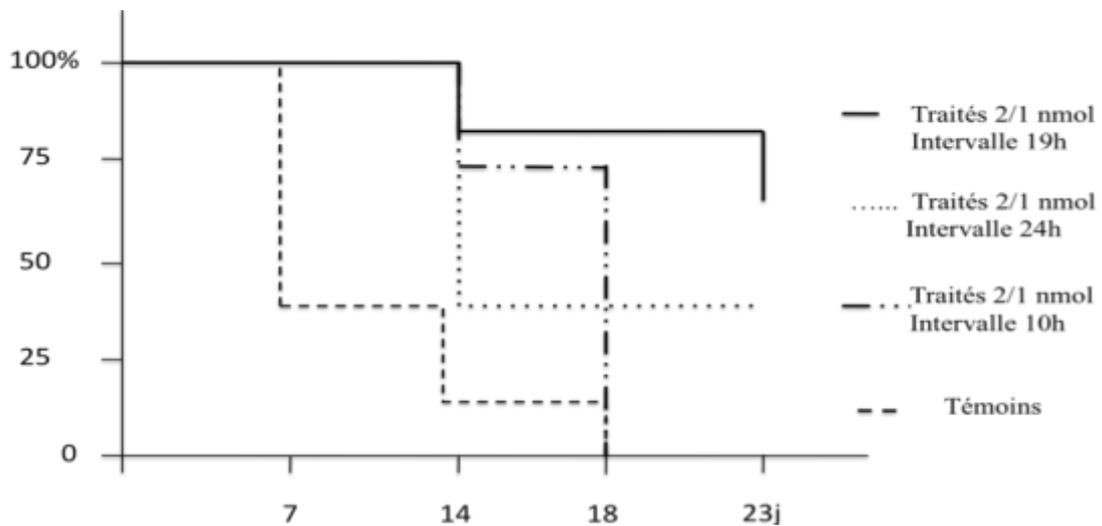


**Figure 27.** Evolution temporelle du nombre de globules blancs lors de la thérapie au bismuth-213.



**Figure 28.** Evolution temporelle des plaquettes lors de la thérapie au bismuth-213.

Après injection de 1,5 mCi de lutétium-177, il n'était pas noté de différence significative dans l'évolution du signal de BLI ni en terme de survie entre les groupes témoins et traités quelque soit l'intervalle (**Figure 29**). On note un décès rapide entre 18 et 23 jours après traitement.



**Figure 29.** Courbe de pseudo-survie des animaux traités par lutétium-177. Le point final est représenté un seuil maximal de 10 millions de cpm selon les données de bioluminescence.

## II. DISCUSSION

La radioimmunothérapie a pour but de délivrer de façon sélective et locale une irradiation à but tumoricide. La sélectivité est obtenue par le ciblage d'antigènes tumoraux. Elle se heurte cependant à la nécessité d'épargner les organes sains afin de limiter les effets toxiques. Comparativement au ciblage direct, le système de préciblage utilisant un anticorps monoclonal bispécifique et un peptide radiomarqué d'élimination rapide, offre l'avantage d'obtenir des rapports de fixation tumeurs/organes sains élevés, même si cela se fait au détriment d'une diminution de la captation tumorale. Cependant, les caractéristiques d'un tel système sont-elles suffisantes pour obtenir un effet thérapeutique et quelles sont les possibilités d'amélioration ?

L'augmentation du rapport de fixation tumeur/organe, par l'élimination rapide au niveau des tissus sains apparaît dans un premier temps propice à l'imagerie. Sur un modèle de tumeurs sous-cutanées d'origine colique, Sharkey et coll. ont comparé la fixation d'un peptide IMP 245 marqué au technétium-99m, préciblé par le TF2, et du FDG marqué au fluor-18. Il existait une différence significative de façon précoce après l'injection (1,5 h) avec une fixation de  $8.62 \pm 3,53$  vs.  $4.87 \pm 0.98$  % DI/g (105). Sur un autre modèle de micro-tumeurs de localisation pulmonaire, le rapport poumons tumoraux/organes sains du couple TF2/IMP 288 en préciblage variait de 5:1 à 40:1 après des délais respectifs de 1,5 et 24 heures après injection en préciblage. A 24 heures, l'étude en SPECT permettait de détecter une fixation persistante au niveau des lésions pulmonaires, et de façon minime au niveau des reins. La fixation pulmonaire était plus marquée avec le FDG mais s'accompagnait d'une fixation également accrue des organes sains, identique entre les animaux implantés ou sains.

Le faible contraste tumeur/organe résultant ne permettait pas alors de détecter les lésions pulmonaires à 1,5 et à 7 heures après injection. La détection tumorale apparaissait donc supérieure avec le système de préciblage.

Le marquage du peptide peut être réalisé à l'aide de différents radionucléides et notamment du gallium-68 et du fluor-18 pour la TEP. Le préciblage permet alors d'augmenter la spécificité de l'exploration en TEP, comme le démontre l'absence de fixation de tissu inflammatoire comparé aux localisations tumorales chez la souris (161).

Cependant, la fixation à la tumeur est moindre avec des valeurs maximales variant entre 8 et 10% DI/g pour les anticorps élaborés par la technique de Dock and Lock et entre 15 et 18% pour le peptide préciblé en fonction du modèle utilisé. Ceci reste largement inférieur aux valeurs obtenues à l'aide d'un ciblage direct (30 à 40% DI/g pour certains anticorps monoclonaux sous forme IgG) (72). Notre étude dosimétrique met en évidence que si les radionucléides à demi-vie courte semblent les plus favorables dans ce système, la dose molaire utilisée en imagerie de 0,04 nmol de peptide marqué, aux activités spécifiques obtenues en pratique, resterait insuffisante pour obtenir une dose tumoricide hormis pour l'astate-211. Ceci est particulièrement vrai dans le modèle de tumeurs sous-cutanées.

Trois possibilités sont alors envisageables :

- l'augmentation de l'activité injectée est un premier moyen. Cette augmentation n'est possible qu'avec une augmentation de la dose molaire injectée de peptide car l'activité spécifique que l'on sait obtenir est souvent limitante. Selon les études précédentes sur tumeur LS-174T, la dose molaire saturante de TF2 a été estimée à 5 nmol et la dose de

peptide à 0,27 nmol. Ceci permet alors d'augmenter la dose absorbée par la tumeur. Cependant, si la dose absorbée par la tumeur augmente, la dose au rein et au sang augmente parallèlement malgré l'élimination rapide du peptide, notamment pour les émetteurs alpha à demi-vie courte. A la dose de 0,16 nmol, correspondant à une activité de 5,6 MBq, l'astate-211 devient potentiellement néphrotoxique. Avec le bismuth-213, une dose de 0,27 nmol de peptide peut encore être considérée pour une dose absorbée estimée à la tumeur de 11 Gy et des doses au rein et au sang restant inférieures au seuil toxique. Nos essais de PRIT au bismuth-213, réalisés avec des doses de 2/0,1 et 2/0,2 nmol de TF2/IMP, ont mis en évidence un ralentissement initial de la croissance tumorale. Une dose plus importante de 0,27 nmol d'IMP est donc à privilégier, associée à un traitement plus précoce après implantation tumorale, afin de bénéficier de tous les critères propices à l'emploi des émetteurs alpha. Malgré une dose plus faible à la tumeur, la faible captation au niveau des organes sains avec les émetteurs bêta permet d'envisager une augmentation de dose et devient alors intéressante pour l'yttrium-90 dans le cadre des tumeurs de plus grand diamètre.

- la répétition des cycles est possible. Li et coll. ont obtenu une inhibition de la croissance tumorale dans 56 et 84% des cas lors de la répétition d'une dose de 13,9 et 41,6 MBq de F(ab')<sub>2</sub> marqué à l'iode-131 contre 35 et 41% pour une dose unique (176). Dans le cas du système de préciblage, lors de la réalisation de cycles répétés à 3 jours d'intervalle, la fixation tumorale du peptide apparaît identique lors des deux premiers cycles ( $14.7 \pm 1.1$  % et  $14.3 \pm 1.5$  % DI/g) avec une baisse lors de la troisième cure ( $10.9 \pm 2.8$  % DI/g), tout en maintenant des rapports tumeur sur organes sains élevés (157). Ce protocole apparaît plus favorable que l'injection itérative du peptide marqué après injection unique de l'anticorps

du fait d'une baisse progressive de la fixation tumorale du peptide dans ce dernier cas. Un allongement de la survie a ainsi été obtenu chez la souris dans un modèle de tumeurs sous-cutanées traitées au lutétium-177 au prix d'une toxicité minime. Compte tenu de doses plus faibles tant au niveau de la tumeur qu'aux organes sains, un tel protocole serait à envisager avec le lutétium-177 et l'iode-131 afin d'atteindre des doses tumoricides dans le système de préciblage.

- l'association à d'autres thérapies. L'utilisation combinée d'une chimiothérapie de type 5-FU à la RIT majore l'effet thérapeutique, principalement de manière additionnelle. La combinaison de 5-FU et d'une IgG1 marquée à l'iode-131 (9,25 MBq) a permis d'obtenir une régression tumorale chez 7/10 souris contre 3/10 en cas de RIT seule au prix d'une discrète majoration réversible de la toxicité sanguine et sans majoration de la toxicité digestive du 5-FU (177). Dans un modèle de cancer pancréatique chez la souris, l'association chimiothérapie par Gemcitabine et PRIT apparaît supérieure en termes de survie à la chimiothérapie ou RIT seules, sans toxicité rénale accrue. Une dose équivalente à 50% de la dose maximale tolérée dans le système de préciblage (18,5 MBq) est aussi efficace que la dose maximale d'un ciblage direct par IgG (5,55 MBq) (178).

L'association avec des thérapies ciblées a également été envisagée. Une amélioration de la survie a été rapportée dans un modèle de métastases hépatiques chez la souris lors de l'utilisation conjointe d'une RIT à l'iode-131 (IgG<sub>1</sub>, 7 MBq) et d'un traitement anti-angiogénique (179). L'intérêt de ce type de traitement combiné est l'absence de toxicité hématologique ou digestive surajoutée par le traitement anti-angiogénique.

A partir de nos données pharmacocinétiques et estimations dosimétriques théoriques comparatives, il semble possible d'atteindre des doses absorbées aux tumeurs situées dans des marges tumoricides en adaptant les doses injectées en fonction des radionucléides. Différents schémas thérapeutiques peuvent également être envisagés soit sous la forme de traitements séquentiels soit de traitements combinés.

***CHAPITRE VI : CONCLUSION ET PERSPECTIVES***

Au terme de ce travail, différents points ont pu être dégagés :

- Si le modèle d'implantation tumorale sous-cutanée est le plus souvent réalisé de par sa simplicité de mise en place et de suivi, celui-ci ne présente pas les caractéristiques physiopathologiques propres aux métastases d'origine colorectale de localisation intrahépatique. Ceci est notamment illustré par les différences en termes de fixation des anticorps anti-ACE, fixation qui apparaît plus élevée dans le modèle intrahépatique et donc plus favorable au ciblage de la radioimmunothérapie. L'implantation par voie intraportale de cellules en agrégats permet d'obtenir des tumeurs hépatiques de façon reproductible. Un suivi individuel de la croissance tumorale peut être associé par la technique de bioluminescence. Celle-ci fournit des données quantitatives de croissance ou de réponse plus sensibles que les critères classiques extrêmes de poids ou de survie de l'animal. Ce modèle constitue donc le modèle le plus approprié pour les essais de radioimmunothérapie.
- Les paramètres optimaux du système de préciblage par TF2/IMP ont pu être définis. Si la fixation tumorale est inférieure au ciblage direct, l'élimination rapide du peptide marqué permet d'obtenir des rapports tumeurs sur organes sains élevés, notamment pour le sang. Ceci est favorable à la fois à une approche d'imagerie et de thérapie en fonction des isotopes employés. A partir des données pharmacocinétiques et des prévisions dosimétriques, les radionucléides à demi-vie courte apparaîtraient les plus favorables. L'astate-211 présenterait les caractéristiques les plus propices à une activité tumoricide sous réserve d'une toxicité rénale potentielle. Les micrométastases de siège hépatique apparaîtraient comme une cible privilégiée pour

les émetteurs alpha, à la fois compte-tenu des données dosimétriques liées au système de préciblage mais également du fait d'une fixation accrue des anticorps anti ACE comparativement à la localisation sous-cutanée. D'autres isotopes tels que l'yttrium-90 pour les tumeurs de taille moyenne et le bismuth-213 pourraient être envisagés soit en augmentant les doses de peptides soit sous la forme de répétition de cycles.

- L'obtention d'astate-211 à partir du cyclotron ARRONAX permet d'envisager à moyen terme la réalisation d'essais thérapeutiques chez l'animal à l'aide de ce système de préciblage.

***CHAPITRE VII : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

1. Benson III AB. *Epidemiology, disease, progression and economic burden of colorectal cancer.* J Manag Care Pharm 2007; 13(6): S5-S18.
2. Simmonds PC. *Palliative chemotherapy for advanced colorectal cancer: systematic review and meta-analysis.* *Colorectal Cancer Collaborative Group.* BMJ 2000; 321: 531-5.
3. Lencioni R, Crocetti L, Ciono D et al. *Percutaneous radiofrequency ablation of hepatic colorectal metastases: Technique, indications, results, and new promises.* Invest Radiol 2004; 39: 689-97.
4. Tomlinson JS, Jarnagin WR, DeMatteo RP et al. *Actual 10-year survival after resection of colorectal liver metastases defines cure.* J Clin Oncol 2007; 25: 4575-80.
5. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. *Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutives cases.* Ann Surg 1999; 230: 309-18.
6. De Jong MC, Pulitano C, Ribero D, Strub J, Mentha G, Schulick RD, Choti MA, Aldrighetti L, Capussotti L, Pawlick TM. *Rates and patterns of recurrence following curative intent surgery for colorectal liver metastasis: an international analysis of 169 patients.* Ann Surg 2009; 250(3): 440-8.
7. Simmonds PC, Primrose JN, Colquitt JL, Garden OJ, Poston GJ, Rees M. *Surgical resection of hepatic metastases from colorectal cancer: a systematic review of published studies.* Br J Cancer 2006; 94: 982-99.
8. Cummings LC, Payes JD, Cooper GS. *Survival after hepatic resection in metastatic colorectal cancer. A population-based study.* Cancer 2007; 109(4): 718-26.
9. De Haas RJ, Wicherts DA, Flores E, Azoulay D, Castaing D, Adam R. *R1 resection by necessity for colorectal liver metastases: is it still a contraindication to surgery?* Ann Surg 2008; 248: 626-37.

10. Nikfarjam M, Shereef S, Kimchi ET, Gusani NJ, Jiang Y, Avella DM, Mahraj RP, Staveley-O'Carroll KF. *Survival outcomes of patients with colorectal liver metastases following hepatic resection or ablation in the era of effective chemotherapy.* Ann Surg Oncol 2009; 16: 1860-7.
11. Nordlinger B, Van Cutsem E, Gruenberger T, Glimelius B, Poston G, Rougier P, Sobrero A, Ychou M, on behalf of the European colorectal metastases treatment group. *Combination of surgery and chemotherapy and the role of targeted agents in the treatment of patients with colorectal liver metastases: recommendation from an expert panel.* Ann Oncol 2009; 20: 985-92.
12. Laurent C, Sa Cunha A, Couderc P, Rullier E, Saric J. *Influence of postoperative morbidity on long-term survival following liver resection for colorectal metastases.* BJS 2003; 90: 1131-6.
13. Kemeny N. *Management of liver metastases from colorectal cancer.* Oncology (Williston Park) 2006; 20: 1161-76.
14. Alberts SR, Wagman LD. *Chemotherapy for Colorectal cancer liver metastases.* The Oncologist 2008; 13: 1063-73.
15. Golfinopoulos V, Salanti G, Pavlidis N, Aloannidis JP. *Survival and disease-progression benefits with treatment regimens for advanced colorectal cancer: a meta-analysis.* Lancet Oncol 2007; 8: 898-911.
16. Adam R, Delvart V, Pascal G et al. *Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy. : A model to predict long-term survival.* Ann Surg 2004; 240: 644-57.
17. Vogl TJ, Zangos S, Eichler K, Yakoub D, Nabil M. *Colorectal liver metastases: regional chemotherapy via transarterial chemoembolization (TACE) and hepatic chemoperfusion: an update.* Eur Radiol 2007; 17: 1025-34.

18. Mocellin S, Pilati P, Lise M, Nitti D. *Meta-analysis of hepatic arterial infusion for unresectable liver metastases from colorectal cancer: the end of an era?* J Clin Oncol 2007; 25(35): 5649-54.
19. Kemeny NE, Gonen M. *Hepatic arterial infusion after liver resection.* N Engl J Med 2005; 352: 734-5.
20. Wolpin BM, Mayer RJ. *Systemic treatment of colorectal cancer. Reviews in basic and clinical gastroenterology.* Gastroenterology 2008; 134: 1296-1310.
21. Wong SL, Mangu PB, Choti MA et al. *American Society of Clinical Oncology 2009 Clinical Evidence Review on Radiofrequency Ablation of hepatic metastases from colorectal cancer.* J Clin Oncol 2010; 28: 493-508.
22. Abdalla EK, Vauthey JN, Ellis LM, et al. *Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases.* Ann Surg 2004; 239: 818-27.
23. Mulier S, Ruers T, Jamart J, Michel L, Marchal G, Ni Y. *Radiofrequency ablation versus resection for resectable colorectal liver metastases: time for a randomized trial? an update.* Dig Surg 2008; 25(6): 445-60.
24. Reuter NP, Woodall CE, Scoggins CR, McMasters KM, Martin RCG. *Radiofrequency ablation vs. Resection for hepatic colorectal metastasis: therapeutically equivalent?* J Gastrointest Surg 2009; 13: 486-91.
25. Van Duijnhoven FH, Jansen MC, Junggeburst JMC, Van Hillegesberg R et al. *Factors influencing the local failure rate of radiofrequency ablation of colorectal liver metastases.* Ann Surg Oncol 2006; 13(5): 651-8.

- 26.** Hur H, Ko YT, Kim KS, Choi JS, Sohn SK, Cho CH, Ko HK, Lee JT, Kim NK. *Comparative study of resection and radiofrequency ablation in the treatment of solitary colorectal liver metastases.* Am J Surg 2009; 197(6): 728-36.
- 27.** Cascinu S, Berardi R, Salvagni S, Beretta GD et al. *A combination of gefitinib and FOLFOX-4 as first line treatment in advanced colorectal cancer patients. A GISCAD multicentre phase II study including a biological analysis of EGFR overexpression, amplification and NF- $\kappa$ B activation.* Br J Cancer 2008; 98: 71-6.
- 28.** Machi J, Oishi AJ, Sumida K, Sakamoto K, Furumoto NL, Oishi RH, Kylstra JW. *Long-term outcome of radiofrequency ablation for unresectable liver metastases from colorectal cancer: evaluation of prognostic factors and effectiveness in first- and second-line management.* Cancer J. 2006; 12(4): 318-26.
- 29.** Gilliams AR, Lees WR. *Five-year survival in 309 patients with colorectal liver metastases treated with radiofrequency ablation.* Eur Radiol 2009; 19: 1206-13.
- 30.** Reuter NP, Woodall CE, Scoggins CR, McMasters KM, Martin RCG. *Radiofrequency ablation vs. resection for hepatic colorectal metastasis: therapeutically equivalent?* J Gastrointest Surg 2009; 13: 486-91.
- 31.** Xu KC, Niu LZ, He WB, Hu YZ, Zuo JS. *Percutaneous cryosurgery for the treatment of hepatic colorectal metastases.* World J Gastroenterol 2008; 14(9): 1430-6.
- 32.** Bageacu S, Kaczmarek D, Lacroix M, Dubois J, Forest J, Porcheron J. *Cryosurgery for resectable and unresectable hepatic metastases from colorectal cancer.* Eur J Surg Oncol 2007; 33(5): 590-6.
- 33.** Padma S, Martinie JB, Iannitti DA. *Liver tumor ablation: percutaneous and open approaches.* J Surg Oncol 2009; 100: 619-34.

34. Elias D, Sideris L, Pocard M, de Baere T, Dromain C, Lassau N, Lasser P. *Incidence of unsuspected and treatable metastatic disease associated with operable colorectal liver metastases discovered only at laparotomy (and not treated when performing percutaneous radiofrequency ablation)*. Ann Surg Oncol 2005; 12(4): 298-302.
35. Timmerman RD, Costas S, Bizakis S, Pass H I, Fong Y, Dupuy DE, Dawson LA, Lu D. *Local surgical, ablative, and radiation treatment of metastases*. CA Cancer J Clin 2009; 59: 145-70.
36. Dawood O, Mahadevan A, Goodman KA. *Stereotactic body radiation therapy for liver metastases*. Eur J Cancer 2009; 45(17): 2947-59.
37. Rusthoven KE, Kavanagh BD, Cardenes H, Stieber VW, Burri SH, Feigenberg SJ, Chidel MA, Pugh TJ, Franklin W, Kane M, Gaspar LE, Scheffer TE. *Multi-institutional phase I/II of stereotactic body radiation therapy for liver metastases*. J Clin Oncol 2009; 27(10): 1572-8.
38. Lee MT, Kim JJ, Dinniwell R, Brierley J, Lockwood G, Wong R, Cummings B, Ringash J, Tse RV, Knox JJ, Dawson LA. *Phase I study of individualized stereotactic body radiotherapy of liver metastases*. J Clin Oncol 2009; 27(10): 1585-91.
39. Van de Wiele C, Defreyne L, Peeters M, Lambert B. *Yttrium-90 labelled resin microspheres for treatment of primary and secondary malignant liver tumors*. Q J Nucl Med Mol Imaging 2009; 53: 317-24.
40. Kennedy AS, Nutting C, Coldwell D, Gaiser J, Drachenberg C. *Pathologic response and microdosimetry of <sup>90</sup>Y microspheres in man: review of four explanted whole livers*. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004; 60(5): 1552-63.
41. Stubbs RS, O'Brien I, Correia MM. *Selective internal radiation therapy with <sup>90</sup>Y microspheres for colorectal liver metastases: single-centre experience with 100 patients*. ANZ J Surg 2006; 76: 696-703.

42. Sangro B, Gil-Alzugaray B, Rodriguez J, Sola L, Martinez-Cuesta A, Viudez A, Chopitea A, Inarrairaegu M, Arbizu J, Bilbao JI. *Liver disease induced by radioembolization of liver tumors. Description and possible risk factors.* Cancer 2008; 112: 1538-46.
43. Kennedy AS, McNeillie P, Dezarn WA et al. *Treatment parameters and outcome in 680 treatments of internal radiation with resin <sup>90</sup>Y-microspheres for unresectable hepatic tumors.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 2009; 74(5): 1494-500.
44. Townsend A, Price T, Karapetis C. *Selective internal radiation therapy for liver metastases from colorectal cancer (review).* The Cochrane Collaboration 2009; 4: 1-14.
45. Mulcahy MF, Lewandowski RJ, Ibrahim SM, Sato KT, Ryu RK, Atassi B, Newman S, Talamonti M, Omary RA, Benson III A, Salem R. *Radioembolization of colorectal hepatic metastases using yttrium-90 microspheres.* Cancer 2009; May 1: 1849-58.
46. Van Hazel G, Blackwell A, Anderson J, Price D, Moroz P, Bower G et al. *Randomised phase 2 trial of SIR-Spheres plus fluorouracil/leucovorin chemotherapy versus fluorouracil/leucovorin chemotherapy alone in advanced colorectal cancer.* J Surg Oncol 2004; 88:78-85.
47. Gray B, Van Hazel G, Hope M, Burton M, Moroz P, Anderson J et al. *Randomised trial of SIR-spheres plus chemotherapy vs. chemotherapy alone for treating patients with liver metastases from primary large bowel cancer.* Ann Oncol 2001; 12: 1711-20.
48. Hoffman RT et al. *Radiofrequency ablation after selective internal radiation therapy with <sup>90</sup>Yttrium microspheres in metastatic liver disease. Is it feasible?* Eur J Radiol 2010; 74(1): 199-205.
49. Lambert B, Bacher K, Defreyne L. *Rhenium-188 based radiopharmaceuticals for treatment of liver tumours.* Q J Nucl Med Mol Imaging 2009; 53: 305-10.

50. Liepe K, Brogsitter C, Leonhard J, Wunderlich G, Hliscs R, Pinkert J et al. *Feasibility of high activity Rhenium-188 microspheres in hepatic embolization*. Japanese J Clin Oncol 2007; 37: 942-50.
51. Gold P, Freedman SO. *Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system*. J Exp Med 1965; 122: 467-81.
52. Paxton RJ, Mooser G, Pande H, Lee TD, Shively JE. *Sequence analysis of carcinoembryonic antigen: identification of glycosylation sites and homology with the immunoglobulin supergene family*. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 920-4.
53. Hammarström S. *The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues*. Cancer Biology 1999; 9: 67-81.
54. Jean F, Malapert P, Rougon G, Barbet J. *Cell membrane, but not circulating carcinoembryonic antigen is linked to a phosphatidyl inositol-containing hydrophobic domain*. Biochem Biophys Res Commun 1988; 155: 794-800.
55. Sanders DS, Kerr MA. *Lewis blood group and CEA related antigens: coexpressed cell-cell adhesion molecules with roles in the biological progression and dissemination of tumors*. Mol Pathol 1999; 52: 174-8.
56. Nazato DM, de Matos LL, Waisberg DR, de Souza JRM, Martins LC, Waisberg J. *Prognostic value of carcinoembryonic antigen distribution in tumor tissue of colorectal carcinoma*. Arg Gastroenterol 2009; 46(1): 26-31.
57. Li M, Li JY, Zhao AL, He JS, Zhou LX, Li YA, Gu J. *Comparison of carcinoembryonic antigen prognostic value in serum and tumour tissue of patients with colorectal cancer*. Colorectal Dis 2009; 11: 276-81.

58. Leconte A, Garambois V, Ychou M, Robert B, Pourquier D, Terskikh A, Mach JP, Pèlegriin A. *Involvement of circulating CEA in liver metastases from colorectal cancers re-examined in a new experimental model.* Br J Cancer 1999; 80(9): 1373-9.
59. Zeh III HJ, Stavelly-O'Carroll K, Choti MA. *Vaccines for colorectal cancer.* Trends Mol Med 2001; 7(7): 307-13.
60. Zbar AP, Lemoine NR, Wadhwa M, Thomas H, Snary D, Kmiot WA. *Biological therapy: approaches in colorectal cancer. Strategies to enhance carcinoembryonic antigen (CEA) as an immunogenic target.* Br J Cancer 1998; 77(5): 683-93.
61. Midgley R, Kerr D. *Immunotherapy for colorectal cancer: a challenge to clinical trial design.* The Lancet Oncology 2000; 1: 159-68.
62. Koda J, Glass MC, Chang HR. *Generation of human monoclonal antibodies against colon cancer.* Arch Surg 1990; 125: 1591-7.
63. Durrant LG, Denton GWL, Jacobs E, and all. *An idiotypic replica of carcinoembryonic antigen inducing cellular and humoral responses directed against human colorectal tumours.* Int J Cancer 1992; 50: 811-6.
64. Foon KA, Chakraborty M, John W, Sherratt A, Kohler H, Bhattacharya-Chatterjee M. *Immune response to the carcinoembryonic antigen in patients treated with an anti-idiotypic antibody vaccine.* J Clin Investig 1995; 96: 334-42.
65. Kass E, Schlom J, Thompson J, Guadagni F, Graziano P, Greiner JW. *Induction of protective host immunity to Carcinoembryonic Antigen (CEA), a self antigen in CEA transgenic mice, by immunizing with a recombinant vaccinia-CEA virus.* Cancer Res 1999; 59: 676-83.
66. Mocellin S, Rossi CR, Lise M, Nitti D. *Colorectal cancer vaccines: principles, results, and perspectives.* Gastroenterology 2004; 127: 1821-37.

67. Goldenberg DM, Sharkey RM. *Advances in cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies*. Q J Nucl Med Mol Imaging 2006; 50: 248-64.
68. Goldenberg DM. *Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies*. J Nucl Med 2002; 43(5): 693-713.
69. Siegel JA, Pawlyk DA, Lee RE, et al. *Tumor, red marrow, and organ dosimetry for <sup>131</sup>I-labeled anticarcinoembryonic antigen monoclonal antibody*. Cancer Res 1990; 50: 1039s-42s.
70. Behr TM, Sharkey RM, Juweid ME, et al. *Phase I/II clinical radioimmunotherapy with an iodine-131-labeled anti-carcinoembryonic antigen murine monoclonal antibody IgG*. J Nucl Med 1997; 38: 858-70.
71. Thames HD, Hendry JH. *Radiation induced injury to tissues*. In: Thames HD, ed. Fractionation in radiotherapy, London: Taylor and Francis 1987: 1-21.
72. Sharkey RM, Gold DV, Aninipot R, Vagg R, Ballance C, Newman ES, Ostella F, Hansen HJ, Goldenberg DM. *Comparison of tumor targeting in nude mice by murine monoclonal antibodies directed against different colorectal cancer antigens*. Cancer Res 1990; 50: 828s-34s.
73. Buchegger F, Pelegrin A, Delaloye B, Bischof-Delaloye A, Mach JP. *Iodine-131-labeled Mab F(ab')<sub>2</sub> fragments are more efficient and less toxic than intact anti-CEA antibodies in radioimmunotherapy of large human colon carcinoma grafted in nude mice*. J Nucl Med 1990; 31: 1035-44.
74. Behr TM, Sharkey RM, Juweid ME, Blumenthal RD, Dunn RM, Griffiths GL, et al. *Reduction of the renal uptake of radiolabeled monoclonal antibody fragments by cationic amino acids and their derivatives*. Cancer Res 1995; 55: 3825-34.

75. Van Eerd JE, Vegt E, Wetzels JF, Russel FG, Masereeuw R, Corstens FH et al. *Gelatin-based plasma expander effectively reduces renal uptake of <sup>111</sup>In-octreotide in mice and rats.* J Nucl Med 2006; 47: 528-33.
76. Jaggi JS, Seshan SV, McDevitt MR, Sgouros G, Hyjek E, Sceinberg DA. *Mitigation of radiation nephropathy after internal alpha-particle irradiation of kidneys.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 2006; 64: 1503-12.
77. Koppe MJ, Bleichrodt RP, Oyen WJG, Boerman OC. *Radioimmunotherapy and colorectal cancer.* Br J Surg 2005; 92: 264-76.
78. Ychou M, Pelegrin A, Faurous P, Robert B, Saccavini JC, Guerreau D, Rossi JF, Fabbro M, Buchegger F, Mach JP, Artus JC. *Phase I/II radio-immunotherapy study with iodine-131-labeled anti-CEA monoclonal antibody F6 F(ab')<sub>2</sub> in patients with non-resectable liver metastases from colorectal cancer.* Int J Cancer 1998; 75: 615-9.
79. Sharkey RM, Blumenthal RD, Behr TM et al. *Selection of radioimmunoconjugates for the therapy of well-established or micrometastatic colon carcinoma.* Int J Cancer 1997; 72: 477-85.
80. Behr TM, Salib AL, Liersch T et al. *Radioimmunotherapy of small volume disease of colorectal cancer metastatic to the liver: preclinical evaluation in comparison to standard chemotherapy and initial results of a phase I clinical study.* Clin Cancer Res 1999; 5: 3232s-42s.
81. Saga T, Sakahara H, Nakamoto Y, Sato N, Zhao S, Iida Y, Kuroki M, Endo K, Konishi J. *Radioimmunotherapy for liver micrometastases in mice: Pharmacokinetics, dose estimation, and long term effect.* Jpn J Cancer Res 1999; 90: 342-8.

- 82.** de Jong GM, Hendriks T, Eek A, Oyen WJG, Heskamp S, Bleichrodt RP, Boerman OC. *Radioimmunotherapy improves survival of rats with microscopic liver metastases of colorectal origin.* Ann Surg Oncol 2009; 16(7): 2065-73.
- 83.** Liersch T, Meller J, Kulle B, Behr TM, Markus P, Langer C, Ghadimi BM, Wegener WA, Kovacs J, Horak ID, Becker H, Goldenberg DM. *Phase II Trial of Carcinoembryonic Antigen radioimmunotherapy with <sup>131</sup>I-Labetuzumab after salvage resection of colorectal metastases in the liver: five year safety and efficacy results.* J Clin Oncol 2005; 23: 6763-70.
- 84.** Liersch T, Meller J, Bittrich M, Kulle B, Becker H, Goldenberg DM. *Update of Carcinoembryonic Antigen radioimmunotherapy with <sup>131</sup>I-Labetuzumab after salvage resection of colorectal liver metastases: comparison of outcome to a contemporaneous control group.* Ann Surg Oncol 2007; 14(9): 2577-90.
- 85.** Goldenberg DM, Sharkey RM, Karacay H, McBride W, Hansen HJ, Chang CH, Rossi EA, Chatal JF, Barbet J. *Letter.* Eur J Nucl Med Mol Imaging 2003; 30: 776-80.
- 86.** Martensson L, Nilsson R, Ohlsson T, Sjögren HO, Strand SE, Tennvall J. *Improved tumor targeting and decreased normal tissue accumulation through extracorporeal affinity adsorption in a two-step pretargeting strategy.* Clin Cancer res 2007; 13(18 suppl): 5572s-6s.
- 87.** Mirallié E, Saï-Maurel C, Faivre-Chauvet A, Regenet N, Chang CH, Goldenberg DM, Chatal JF, Barbet J, Thedrez P. *Improved pretargeted delivery of radiolabelled hapten to human tumour xenograft in mice by avidin chase of circulating bispecific antibody.* Eur J Nucl Med Mol Imaging 2005; 32: 901-9.
- 88.** Li GP, Zhang H, Zhu CM, Zhang J, Jiang XF. *Avidin-biotin system pretargeting radioimmunoimaging and radioimmunotherapy and its application in mouse model of human colon carcinoma.* World J Gastroenterol 2005; 11(40): 6288-94.

- 89.** Axworthy DB, Reno JM, Hyalrides MD, et al. *Cure of human carcinoma xenografts by a single dose of pretargeted yttrium-90 with negligible toxicity.* Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 1802-07.
- 90.** Knox SJ, Goris ML, Tempero M, Weiden PL, Gentner L, Breitz H et al. *Phase II trial of yttrium-90 DOTA-biotin pretargeted by NR-LU-10 antibody/streptavidin in patients with metastatic colon cancer.* Clin Cancer Res 2000; 6: 406-14.
- 91.** Chang CH, Sharkey RM, Rossi EA, Karacay H, McBride W, Hansen HJ, Chatal JF, Barbet J, Goldenberg DM. *Molecular advances in pretargeting radioimmunotherapy with bispecific antibodies.* Mol Cancer Ther 2002; 1: 553-63.
- 92.** Le Doussal JM, Martin M, Gautherot E, Delaage M, Barbet J. *In vitro and in vivo targeting of radiolabeled monovalent and divalent haptens with dual specificity monoclonal antibody conjugates: enhanced divalent hapten affinity for cell-bound antibody conjugates.* J Nucl Med 1989; 30: 1358-66.
- 93.** Le Doussal JM, Gruaz-Guyon A, Martin M, Gautherot E, Delaage M, Barbet J. *Targeting of indium 111-labeled bivalent hapten to human melanoma mediated by bispecific monoclonal antibody conjugates: imaging of tumors hosted in nude mice.* Cancer Res 1990 Jun 1; 50(11): 3445-52.
- 94.** Gautherot E, Le Doussal JM, Bouhou J, Manetti C, Martin M, Rouvier E, Barbet J. *Delivery of therapeutic doses of radioiodine bispecific antibody-targeted bivalent haptens.* J Nucl Med 1998; 39(11): 1937-43.
- 95.** Gautherot E, Rouvier E, Daniel L, Loucif E, Bouhou J, Manetti C, Martin M, Le Doussal JM, Barbet J. *Pretargeted radioimmunotherapy of human colorectal xenografts with bispecific antibody and <sup>131</sup>I-labeled bivalent haptens.* J Nucl Med 2000; 41: 480-7.

96. Buchsbaum DJ, Langmuir VK, Wessels BW. *Experimental radioimmunotherapy*. Med Phys. 1993; 20: 551-67.
97. Goodwin DA. *Tumor pretargeting: almost the bottom line*. J Nucl Med 1995; 36: 876-9.
98. Goldenberg DM, Chatal JF, Barbet J, Boerman O, Sharkey RM. *Cancer imaging and therapy with bispecific antibody pretargeting*. Update Cancer Ther 2007; 2(1): 19-31.
99. Karacay H, Sharkey RM, McBride WJ, Griffiths GL, Qu Z, Chang K, Hansen HJ, Goldenberg DM. *Pretargeting for cancer radioimmunotherapy with bispecific antibodies: role of the bispecific antibody's valency for the tumor target antigen*. Bioconjug Chem 2002; 13: 1054-70.
100. Rossi EA, Goldenberg DM, Cardillo TM, Mc Bride WJ, Sharkey RM, Chang CH. *Stably tethered multifunctional structures of defined composition made by the dock and lock method for use in cancer targeting*. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(18): 6841-46.
101. Sharkey RM, Rossi EA, Mc Bride WJ, Chang CH, Goldenberg DM. *Recombinant bispecific monoclonal antibodies prepared by the Dock-and-Lock strategy for pretargeted radioimmunotherapy*. Semin Nucl Med 2010; 40: 190-203.
102. Chang CH, Rossi EA, Goldenberg DM. *The Dock and Lock method: A novel platform technology for building multivalent, multifunctional structures of defined composition with retained bioactivity*. Clin Cancer Res 2007; 13(18 Suppl): 5586s-91s.
103. Janevik-Ivanovska E, Gautherot E, Hillairet de Boisferon M et al. *Bivalent hapten-bearing peptides designed for iodine-131 pretargeted radioimmunotherapy*. Bioconjug Chem 1997; 8: 526-33.
104. Sharkey RM, McBride WJ, Karacay H et al. *A universal pretargeting system for cancer detection and therapy using bispecific antibody*. Cancer Res 2003; 63: 354-63.

- 105.** Sharkey RM, Karacay H, Vallabhajosula S, Mc Bride WJ, Rossi EA, Chang CH, Goldsmith SJ, Goldenberg DM. *Metastatic human colonic carcinoma: molecular imaging with pretargeted SPECT and PET in a mouse model.* Radiology 2008; 246: 497-507.
- 106.** Griffiths GL, Chang CH, McBride WJ, Rossi EA, Sheerin A, Tejada GR, Karacay H, Sharkey RM, Horak ID, Hansen HJ, Goldenberg DM. *Reagents and methods for PET using bispecific antibody pretargeting and <sup>68</sup>Ga-radiolabeled bivalent hapten-peptide-chelate conjugates.* J Nucl Med 2004 Jan; 45(1): 30-9.
- 107.** Karagiannis TC. *Comparison of different classes of radionuclides for potential use in radioimmunotherapy.* Hell J Nucl Med 2007; 10(2): 82-8.
- 108.** Schlumberger M, Challeton C, De Vathaire F, Travagli JP, Gardet P, Lumbroso JD, Francese C, Fontaine F, Ricard M, Parmentier C. *Radioactive iodine treatment and external radiotherapy for lung and bone metastases from thyroid carcinoma.* J Nucl Med 1996; 37: 598-605.
- 109.** De Jong M, Valkema R, Jamar F, Kvols LK, Kwekkeboom DJ, Breeman WAP, Bakker WH, Smith C, Pauwels S, Krenning EP. *Somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy of tumors : preclinical and clinical findings.* Semin Nucl Med 2002; 2: 133-40.
- 110.** Sharkey RM, Motta-Hennessy C, Pawlyk D, Siegel JA, Goldenberg DM. *Biodistribution and radiation dose estimates for yttrium-and iodine-labeled monoclonal antibody IgG and fragments in nude mice bearing human colonic tumor xenografts.* Cancer Res 1990; 50: 2330-6.
- 111.** Vegt E, de Jong M, Wetzels JFM, Masereeuw R, Melis M, Oyen WJG, Gotthardt M, Boerman OC. *Renal toxicity of radiolabeled peptides and antibody fragments: Mechanisms, impact on radionuclide therapy, and strategy for prevention.* J Nucl Med 2010; 51(7): 1049-58.

- 112.** Mc Devitt MR, Sgouros G, Finn RD, Humm JL, Jurcic JG, Larson SM, Scheinberg DA. *Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides.* Eur J Nucl Med 1998; 25: 1341-51.
- 113.** Couturier O, Supiot S, Degraef-Mougin M, Faivre-Chauvet A, Carlier T, Chatal JF, Davodeau F, Chérel M. *Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides.* Eur J Nucl Med Mol Imaging 2005; 32: 601-14.
- 114.** Chérel M, Davodeau F, Kraeber-Bodéré F, Chatal JF. *Current status and perspectives in alpha radioimmunotherapy.* Q J Nucl Med Mol Imaging 2006; 50: 322-9.
- 115.** Brechbiel MW. *Targeted  $\alpha$ -therapy. Past, present, future?* Dalton Trans. 2007; 21(43): 4918-28.
- 116.** Emami B, Lyman J, Brown A, Coia L, Goitein M, Munzenrider JE, Shank B, Solin LJ, Wesson M. *Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 1991; 21: 109-22.
- 117.** McDevitt MR, Finn RD, Ma D, Larson SM, Scheinberg DA. *Preparation of  $\alpha$ -Emitting  $^{213}\text{Bi}$ -Labeled Antibody constructs for clinical use.* J Nucl Med 1999; 40: 1722-7.
- 118.** Song EY, Abbas Rizvi SM, Qu CF, Raja C, Brechbiel MW, Morgenstern A, Apostolidis C, Allen BJ. *Pharmacokinetics and toxicity of  $^{213}\text{Bi}$ -labeled PAI2 in preclinical targeted alpha therapy for cancer.* Cancer Biol Ther 2007; 6(6): 898-904.
- 119.** Adams GP, Shaller CC, Chappell LL, Wu C, Horak EM, Simmons HH, Litwin S, Marks JD, Weiner LM, Brechbiel MW. *Delivery of the  $\alpha$ -emitting radiosotope bismuth-213 to solid tumors via single-chain Fv and diabody molecules.* Nucl Med Biol 2000; 27: 339-46.
- 120.** Walte A, Sriyapureddy SSR, Korkmaz Z, Krull D, Bolte O, Hofmann M, Meyer G-J, Knapp WH. *Preparation and evaluation of  $^{211}\text{At}$  labelled antineoplastic antibodies.* J Pharm Sci 2007; 10(2): 277s-85s.

- 121.** Pozzi OR, Zalutsky MR. *Radiopharmaceutical chemistry of targeted radiotherapeutics, Part 3:  $\alpha$ -particle-induced radiolytic effects on the chemical behavior of  $^{211}\text{At}$ .* J Nucl Med 2007; 48: 1190-6.
- 122.** Zalutsky MR, Stabin M, Larsen RH, Bigner DD. *Tissue distribution and radiation dosimetry of astatine-211-labeled chimeric 81C6, an  $\alpha$ -particle emitting immunoconjugate.* Nucl Med Biol 1997; 24: 255-62.
- 123.** McLendon RE, Archer GE, Larsen RH, Akabani G, Bigner DD, Zalutsky MR. *Radiotoxicity of systemically administered  $^{211}\text{At}$ -labeled human/mouse chimeric monoclonal antibody: a long-term survival study with histologic analysis.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 1999; 45(2): 491-9.
- 124.** Bäck T, Haraldsson B, Hultborn R, Jensen H, Johansson ME, Lindegren S, Jacobsson L. *Glomerular filtration rate after alpha-radioimmunotherapy with  $^{211}\text{At}$ -MX35-F(ab')<sub>2</sub>: a long-term study of renal function in nude mice.* Cancer Biother Radiopharm 2009; 24: 649-58.
- 125.** Boll RA, Malkemus D, Mirzadeh S. *Production of actinium-225 for alpha particle mediated radioimmunotherapy.* Applied Radiat Isot 2005; 62: 667-79.
- 126.** Apostolidis C, Molinet R, McGinley J, Abbas K, Möllenbeck J, Morgenstern A. *Cyclotron production of Ac-225 for targeted alpha therapy.* Applied Radiat Isot 2005; 62: 383-7.
- 127.** Davis IA, Glowienka KA, Boll RA, Deal KA, Brechbiel MW, Stabin M, Bochsler PN, Mirzadeh S, Kennel SJ. *Comparison of  $^{225}\text{Ac}$  actinium chelates: Tissue distribution and radiotoxicity.* Nucl Med Biol 1999; 26(5): 581-9.
- 128.** Jaggi JS, Seshan SV, McDevitt MR, LaPerle K, Sgouros G, Scheinberg DA. *Renal tubulointerstitial changes after internal irradiation with  $\alpha$ -particle-emitting Actinium daughters.* J Am Soc Nephrol 2005; 16: 2677-89.

- 129.** Yang J, Shikata N, Mizuoka H, Tsubura A. *Colon carcinogenesis in shrews by intrarectal infusion of N-methyl-N-nitrosourea.* Cancer Lett 1996; 110: 105-12.
- 130.** Giavazzi R, Campbell DE, Jessup JM, Cleary K, Fidler IJ. *Metastatic behavior of tumor cells isolated from primary and metastatic human colorectal carcinomas implanted into different sites in nude mice.* Cancer Res 1986; 46: 1928-33.
- 131.** Céspedes MV, Espina C, Garcia-Cabezas MA, Trias M, Boluda A, Gomez del Pulgar MT, Sancho FJ, Nistal M, Lacal JC, Manges R. *Orthotopic micro-injection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites.* Am J Pathol 2007; 170: 1077-85.
- 132.** Thalheimer A, Illert B, Bueter M, Gattenlohner S, Stehle D, Gasser M, Thiede A, Waaga-Gasser AM, Meyer D. *Feasibility and limits of an orthotopic human colon cancer model in nude mice.* Comp Med 2006; 56(2): 105-9.
- 133.** Tibbetts LM, Doremus CM, Tzanakakis GN, Vezeridis MP. *Liver metastases with 10 human colon carcinoma cell lines in nude mice and association with carcinoembryonic antigen production.* Cancer 1993; 71: 315-21.
- 134.** Morikawa K, Walker SM, Nakajima M, Pathak S, Jessup JM, Fidler IJ. *Influence of organ environment on the growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice.* Cancer Res 1988; 48: 6863-71.
- 135.** Brand MI, Casillas S, Dietz DW, Milsom JW, Vladislavjevic A. *Development of a reliable colorectal cancer liver metastasis model.* J Surg Res 1996; 63: 425-32.
- 136.** Thalheimer A, Otto C, Bueter M, Illert B, Gattenlohner S, Gasser M, Fein M, Germer CT, Waaga-Gasser AM. *Tumor cell dissemination in a human colon cancer animal model: orthotopic implantation or intraportal injection?* Eur Surg Res 2009; 42(3): 195-200.

- 137.** Thalheimer A, Otto C, Bueter M, Illert B, Gattenlohner S, Gasser M, Meyer D, Fein M, Germer CT, Waaga-Gasser AM. *The intraportal injection model: A practical animal model for hepatic metastases and tumor cell dissemination in human colon cancer.* BMC Cancer 2009; 9: 29 doi: 10.1186/1471-2407-9-29.
- 138.** Topal B, Roskams T, Fevery J, Penninckx F. *Aggregated colon cancer cells have a higher metastatic efficiency in the liver compared with nonaggregated cells: an experimental study.* J Surg Res 2003; 112: 31-7.
- 139.** Keyarts M, Verschueren J, Bos TJ, Tchouate-Gainkam LO, Peleman C, Breckpot K, Vanhove C, Caveliers V, Bossuyt A, Lahoutte T. *Dynamic bioluminescence imaging for quantitative tumour burden assessment using IV or IP administration of D-luciferin: effect on intensity, time kinetics and repeatability of photon emission.* Eur J Nucl Med Mol Imaging 2008; 35(5): 999-1007.
- 140.** Zinn KR, Chaudhuri TR, Szafran AA, O'Quinn D, Weaver C, Dugger K, Lamar D, Kesterson RA, Wang X, Frank SJ. *Noninvasive bioluminescence imaging in small animals.* ILAR J. 2008; 49(1): 103-15.
- 141.** Brutkiewicz S, Mendonca M, Stantz K, Comerford K, Bigsby R, Hutchins G, Goebel M, Harrington M. *The expression level of luciferase within tumour cells can alter tumour growth upon in vivo bioluminescence imaging.* Luminescence 2007; 22: 221-8.
- 142.** Sadikot RT, Blackwell TS. *Bioluminescence imaging.* Proc am Thorac Soc 2005; 2: 537-40.
- 143.** Cui K, Xu X, Zhao H, Wong STC. *A quantitative study of factors affecting in vivo bioluminescence imaging.* Luminescence 2008; 23: 292-5.
- 144.** Jenkins DE, Oei Y, Hornig YS, Yu SF, Dusich J, Purchio T, Contag PR. *Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis.* Clin Exp Metastasis 2003; 20: 733-44.

- 145.** Klerk CPW, Overmeer RM, Niers TMH, Versteeg HH, Richel DJ, Buckle T, Van Noorden CJF, Van Tellingen O. *Validity of bioluminescence measurements for noninvasive in vivo imaging of tumor load in small animals.* BioTechniques 2007; 43(1):7-13.
- 146.** Smakman N, Martens A, Kranenburg O, Borel Rinkes IHM. *Validation of bioluminescence imaging of colorectal liver metastases in the mouse.* J Surg Res 2004; 122: 225-30.
- 147.** Sarraf-Yazdi S, Mi J, Dewhirst MW, Clary BM. *Use of in vivo bioluminescence imaging to predict hepatic tumor burden in mice.* J Surg Res 2004; 120: 249-55.
- 148.** Edinger M, Cao Y, Hornig Y, Jenkins D, Verneris M, Bachmann M, Negrin R, Contag C. *Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging.* Eur J Cancer 2001; 38: 2128.
- 149.** Nogawa M, Yusa T, Kimura S, Kuroda J, Sato K, Segawa H, Yokota A, Maekawa T. *Monitoring luciferase-labeled cancer growth and metastasis in different in vivo models.* Cancer Lett 2005; 217: 243-53.
- 150.** Mc Bride WJ, Zanzonico P, Sharkey RM, Noren C, Karacay H, Rossi EA, Losman MJ, Brard PY, Chang CH, Larson SM, Goldenberg DM. *Bispecific antibody pretargeting PET (ImmunoPET) with an <sup>124</sup>I-labeled hapten-peptide.* J Nucl Med 2006; 47: 1678-88.
- 151.** Bitar A, Lisbona A, Thedrez P, Sai Maurel C, Le Forestier D, Barbet J, Bardies M. *A voxel-based mouse for internal dose calculations using Monte-Carlo simulations (MNCP).* Phys Med Biol 2007; 52: 1013-25.
- 152.** Bitar A, Lisbona A, Bardies M. *S-factor calculation for mouse model using Monte-Carlo simulation.* Q J Nucl Med Mol Imaging 2007; 51: 343-51.
- 153.** Bardiès M, Chatal JF. *Absorbed doses for internal radiotherapy from 22 beta-emitting radionuclides: beta dosimetry of small spheres.* Phys Med Biol 1994; 39(6): 961-81.

- 154.** Stabin MG, Sparks RB, Crowe E. *OLINDA/EXM: the second generation personal computer software for internal dose assessment in nuclear medicine.* J Nucl Med 2005; 46(6): 1023-7.
- 155.** MIRD radionuclide data and decay schemes, 2<sup>nd</sup> edition, KF Eckerman & A Endo Eds, the Society of Nuclear Medicine, Reston, VA, SNM, 2008.
- 156.** Karacay H, Sharkey RM, Gold DV, Ragland DR, McBride WJ, Rossi EA, Chang CH, Goldenberg DM. *Pretargeted radioimmunotherapy of pancreatic cancer xenografts: TF10-90Y-IMP-288 alone and combined with Gemcitabine.* J Nucl Med 2009; 50: 2008-16.
- 157.** Schoffelen R, van der Graaf WTA, Franssen G, Sharkey RM, Goldenberg DM, McBride WJ, Rossi EA, Chang CH, Eek A, Oyen WJG, Boerman OC. *Pretargeted <sup>177</sup>Lu radioimmunotherapy of CEA-expressing human colonic tumors in mice.* J Nucl Med 2010; 51: 1780-87.
- 158.** Sharkey RM, Karacay H, Richel H, McBride WJ, Rossi EA, Chang K, Yeldell D, Griffiths GL, Hansen HJ, Goldenberg DM. *Optimizing bispecific antibody pretargeting for use in radioimmunotherapy.* Clin Cancer Res 2003 (suppl.); 9: 3897s-913s.
- 159.** Behr TM, Sharkey RM, Juweid ME, Dunn RM, Ying Z, Zhang CH, Siegel JA, Gold DV, Goldenberg DM. *Factors influencing the pharmacokinetics, dosimetry, and diagnostic accuracy of radioimmunodetection and radioimmunotherapy of carcinoembryonic antigen-expressing tumors.* Cancer Res 1996; 56: 1805-16.
- 160.** Sharkey RM, Primus FJ, Goldenberg DM. *Antibody protein dose and radioimmunodetection of GW-39 human colon tumor xenografts.* Int J Cancer 1987; 39: 611-7.
- 161.** Schoffelen R, Sharkey RM, Goldenberg DM, Franssen G, McBride WJ, Rossi EA, Chang CH, Laverman P, Disselhorst JA, Eek A, van der Graaf WTA, Oyen WJG, Boerman PC.

*Pretargeted immuno-positron emission tomography imaging of carcinoembryonic antigen-expressing tumors with a bispecific antibody and a  $^{68}\text{Ga}$ - and  $^{18}\text{F}$ -labeled hapten peptide in mice with human tumor xenografts.* Mol Cancer Ther 2010; 9(4): 1019-27.

**162.** Sharkey RM, Karacay H, Cardillo TM, Chang CH, McBride WJ, Rossi EA, Horak ID, Goldenberg DM. *Improving the delivery of radionuclides for imaging and therapy of cancer using pretargeting methods.* Clin Cancer Res 2005; 11 (19 Suppl.): 7109s-21s.

**163.** Akizawa H, Uehara T, Arano Y. *Renal uptake and metabolism of radiopharmaceuticals derived from peptides and proteins.* Adv Drug Deliv Rev 2008; 60: 1319-1328.

**164.** El Emir E, Qureshi U, Dearling JLS, Boxer GM, Clatworthy I, Folarin AA, Robson MP, Nagl S, Konerding MA, Pedley RB. *Predicting response to radioimmunotherapy from the tumor microenvironment of colorectal carcinomas.* Cancer Res 2007; 67(24): 11896-905.

**165.** Breeman WAP, de Jong M, Visser TJ, Erion JL, Krenning EP. *Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$  and  $^{177}\text{Lu}$  at high specific activities.* Eur J Nucl Med Mol Imaging 2003; 30: 917-20.

**166.** De Jong M, Breeman WAP, Bernard BF, Bakker WH, Visser TJ, Kooij PPM, van Gameren A, Krenning EP. *Tumor response after [ $^{90}\text{Y}$ -DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>] octreotide radionuclide therapy in a transplantable rat tumor model is dependent on tumor size.* J Nucl Med 2001; 42: 1841-46.

**167.** De Jong M, Breeman WAP, Bernard BF, Bakker WH, Schaar M, van Gameren A, Bugaj JE, Erion J, Schmidt M, Srinivasan A, Krenning EP. *[ $^{177}\text{Lu}$ -DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>] octreotate for somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy.* Int J Cancer 2001; 92: 628-33.

**168.** Behr TM, Sharkey RM, Sgouros G, Blumenthal RD, Dunn RM, Kolbert K, Griffiths GL, Siegel JA, Becker WS, Goldenberg DM. *Overcoming the nephrotoxicity of radiometal-labeled immunoconjugates: improved cancer therapy administered to a nude mouse model in relation to the internal radiation dosimetry.* Cancer 1997; 80(12 suppl): 2591-610.

- 169.** Sgouros G, Roeske JC, McDevitt MR, Palm S, Allen BJ, Fisher DR, Bertrand Brill A, Song H, Howell RW, Akabani G. *MIRD Pamphlet N°. 22 (Abridged): Radiobiology and dosimetry of  $\alpha$ -particle emitters for targeted radionuclide therapy.* J Nucl Med 2010; 51: 311-28.
- 170.** Dearling JLJ, Flynn AA, Qureshi U, Whiting S, Boxer GM, Green A, Begent RHJ, Pedley RB. *Localization of radiolabeled anti-CEA antibody in subcutaneous and intrahepatic colorectal xenografts: influence of tumor size and location within host organ on antibody uptake.* Nucl Med Biol 2009; 36: 883-94.
- 171.** Saga T, Sakahara H, Nakamoto Y, Sato N, Zhao S, Iida Y, Kuroki M, Endo K, Konishi J. *Radioimmunotherapy for liver micrometastases in mice: pharmacokinetics, dose estimation, and long-term effect.* Jpn J Cancer Res. 1999; 90: 342-38.
- 172.** Sato N, Saga T, Sakahara H, Zhengsheng Y, Nakamoto Y, Zhang M, Kuroki M, Matsuoka Y, Iida Y, Konishi J. *Intratumoral distribution of radiolabeled antibody and radioimmunotherapy in experimental liver metastases model of nude mouse.* J Nucl Med 1999; 40: 685-92.
- 173.** Vogel CA, Galmiche MC, Westermann P, Sun LQ, Pelegrin A, Folli S, Bischof Delaloye A, Slosman DO, Mach JP, Buchegger F. *Carcinoembryonic antigen expression, antibody localisation and immunodetection of human colon cancer liver metastases in nude mice: a model for radioimmunotherapy.* Int J Cancer 1996; 67: 294-302.
- 174.** Fidarova EF, El-Emir E, Boxer GM, Qureshi U, Dearling JLJ, Robson MP, Begent RHJ, Trott KR, Pedley RB. *Microdistribution of targeted, fluorescently labeled anti-Carcinoembryonic Antigen antibody in metastatic colorectal cancer: implications for radioimmunotherapy.* Clin Cancer Res 2008; 14(9): 2639-46.

- 175.** Behr TM, Sharkey RM, Juweid ME, Dunn RM, Ying Z, Zhang CH, Siegel JA, Goldenberg DM. *Variables influencing tumor dosimetry in radioimmunotherapy of CEA-expressing cancers with anti-CEA and antimucin monoclonal antibodies.* J Nucl Med 1997; 38: 409-18.
- 176.** Li L, Xu HY, Mi L, Bian HJ, Qin J, Xiang H, Feng Q, Wen N, Tian R, Xu LQ, Shen XM, Tang H, Chen ZN. *Radioimmunotherapy of human colon cancer xenografts by using <sup>131</sup>I labeled-Cab1 F(ab')<sub>2</sub>.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 2006; 66(4): 1238-44.
- 177.** Kinuya S, Yokoyama K, Tega H, Hiramatsu T, Konishi S, Watanabe N, Shuke N, Aburano T, Takayama T, Michigishi T, Tonami N. *Efficacy, toxicity and mode of interaction of combination radioimmunotherapy with 5-fluorouracil in colon cancer xenografts.* J Cancer Res Clin Oncol 1999; 125: 630-6.
- 178.** Karacay H, Sharkey RM, Gold DV, Ragland DR, McBride WJ, Rossi EA, Chang CH, Goldenberg DM. *Pretargeted radioimmunotherapy of pancreatic cancer xenografts: TF10-<sup>90</sup>Y-IMP-288 alone and combined with Gemcitabine.* J Nucl Med 2009; 50: 2008-16.
- 179.** Kinuya S, Yokoyama K, Koshida K, Mori H, Shiba K, Watanabe N, Shuke N, Bai J, Michigishi T, Tonami N. *Improved survival of mice bearing liver metastases of colon cancer cells treated with a combination of radioimmunotherapy and antiangiogenic therapy.* Eur J Nucl Med Mol Imaging 2004; 31: 981-5.

## RESUME DE LA THÈSE

### **Radioimmunothérapie préciblée sur modèle animal de métastases de cancer colorectal d'origine humaine.**

Ce travail a évalué un système de radioimmunothérapie préciblée (PRIT) avec l'anticorps bivalent bispécifique anti-ACE x anti-HSG (TF2) et les peptides bivalents di-HSG IMP325 et IMP288 chez des souris greffées avec des cellules de cancer colique. La greffe tumorale hépatique par voie intraportale apparaît fiable et reproductible. La captation tumorale des anticorps est alors supérieure en comparaison des tumeurs sous-cutanées. La bioluminescence permet un suivi individuel des tumeurs intrahépatiques et fournit des données objectives quantitatives pour les essais thérapeutiques. L'optimisation des paramètres du système de préciblage permet d'obtenir une captation tumorale précoce du peptide marqué atteignant ~9% DI/g. Les isotopes à demi-vie courte apparaissent les plus adaptés à ce système. L'astate-211 permettrait de délivrer la dose la plus importante à la tumeur (41,5 Gy en considérant un effet biologique relatif de 5) pour une faible quantité de peptide (0,04 nmol), le rein étant l'organe limitant. L'yttrium-90 et le bismuth-213 permettraient de délivrer des doses élevées à la tumeur (18,6 et 5,3 Gy respectivement) pour des doses plus élevées de peptide (0,1 nmol) tout en restant acceptables pour les reins. Il ne serait pas attendu de toxicité médullaire.

### **Pretargeted radioimmunotherapy for human colonic cancer metastases in mice.**

This study investigated pretargeted radioimmunotherapy (PRIT) with a divalent antiCEA x anti HSG antibody (TF2) and radiolabeled peptides IMP325 and 288 for human colonic cancer cells grafted in mice. The intraportal route of graft is reliable and reproducible and tumor uptake is higher compared to subcutaneous tumors. Bioluminescence allows follow-up with quantitative data for therapeutic trials. Optimisation of pretargeting allows early tumor uptake of the radiolabeled peptide of ~9% ID/g. Short half-lives nuclides appear more favorable. For a low dose of peptide (0.04 nmol), <sup>211</sup>At is predicted to deliver a high absorbed dose to tumors (41.5 Gy considering a relative biologic effect of 5), kidneys being the dose limiting. Yttrium-90 and bismuth-213 would deliver high absorbed doses to tumor (18.6 and 5.3 Gy, respectively for 0.1 nmol) and acceptable absorbed doses to kidneys. Bone marrow absorbed dose is expected to be without significant toxic effects.

**MOTS-CLES:** RADIOIMMUNOTHÉRAPIE, PRÉCIBLAGE, BIOLUMINESCENCE, CANCER COLORECTAL, ANTIGÈNE CARCINOEMBRYONNAIRE, ANTICORPS BISPÉCIFIQUE.