

Immunociblage des tumeurs : situation et perspectives en 2000

Bulletin du Cancer. Volume 87, Numéro 11, 777-91, Novembre 2000, Dossier thématique

■ [Résumé](#)  [Summary](#)

Auteur(s) : André Pèlerin, Françoise Xavier, Jacques Barbet, Jacques Bartholeyns, Daniel Baty, Franz Buchegger, Jean-François Chatal, Fabrice Dubief, Dominique Guerreau, Anne Gruaz-Guyon, Damien Lamotte, Lee Leserman, Jean-Pierre Mach, Bruno Robert, Jean-Claude Saccavini, Jean-Luc Teillaud, Isabelle Teulon, JE2176 Université Montpellier I, coordinateur du groupe de travail, Immunociblage des tumeurs et ingénierie des anticorps, centre de recherche en cancérologie, CRLC Val-d'Aurelle-Paul-Lamarque, 34298 Montpellier Cedex 5..

Résumé : Après plus de 15 années de travaux expérimentaux, l'immunociblage des tumeurs par des anticorps monoclonaux dirigés contre des marqueurs tumoraux connaît actuellement un développement clinique important. Cette progression est due pour beaucoup aux résultats thérapeutiques encourageants obtenus par l'injection d'anticorps recombinants en grande partie humanisés, tels que le rituximab, anti-CD20, dans les lymphomes B folliculaires et l'herceptine, anti-ErbB2, dans les carcinomes du sein. Grâce à l'ingénierie génétique, il est en effet possible de greffer les régions variables ou hypervariables des anticorps murins sur des molécules d'IgG humaines, ou même d'obtenir des anticorps entièrement humains, soit chez des souris transgéniques pour une grande partie du répertoire des IgG humaines, soit par sélection de domaines variables humains exprimés sur des phages. Le marquage des anticorps antitumeurs par des radio-isotopes a joué un rôle important dans la démonstration de la spécificité de l'immunociblage tumoral et reste intéressant pour le diagnostic par immunoscintigraphie, ainsi que pour la radio-immunothérapie de certains cancers. Dans cette revue, nous décrivons les progrès réalisés et les perspectives d'utilisations diagnostiques et thérapeutiques des anticorps antitumeurs et de leurs fragments. Au niveau diagnostique, l'immunoscintigraphie par les fragments Fab marqués à l'iode 123 ou au technétium 99m a fourni des images tumorales très élégantes depuis plusieurs années, mais l'influence de cette technique sur la conduite du traitement reste limitée. L'immuno-TEP (tomographie par émission de positons) pourrait améliorer la sensibilité et la précision de cette méthode. La chirurgie radio-immunoguidée et l'immunophotodétection restent des méthodes prometteuses encore à l'étude. Au niveau thérapeutique, les anticorps anti-CD20 marqués à l'iode 131 ont donné des résultats spectaculaires dans les lymphomes B non hodgkiniens de différents degrés de malignité. Pour les tumeurs solides, moins radiosensibles, les chances d'efficacité de la radio-immunothérapie passent par l'attaque plus précoce de tumeurs de très petite taille, par l'utilisation de stratégies de ciblage en plusieurs étapes et par l'utilisation de radio-isotopes émetteurs de particules alpha. D'autres utilisations d'anticorps sont décrites comme celles des anticorps bispécifiques antitumeurs et anticellules effectrices du système immunitaire, ou la synthèse de fragments d'anticorps exprimés sur les récepteurs de lymphocytes T appelés T bodies, ou encore l'étude biologique des intrabodies. Les résultats publiés et les nombreuses études en cours montrent que l'immunociblage des tumeurs prendra une place toujours plus importante dans le traitement des maladies cancéreuses.

Mots-clés : anticorps monoclonal, immunociblage.

Illustrations

ARTICLE

L'immunociblage concerne la conception, le développement et l'utilisation *in vivo* d'anticorps et de molécules dérivées pour le diagnostic et la thérapie de différentes pathologies. Il s'agit d'exploiter la spécificité de reconnaissance des anticorps pour atteindre une cible déterminée. Dans le cas de l'oncologie, la cible peut être un antigène associé aux tumeurs, un récepteur de facteur de croissance, un produit d'oncogène ou de gène « suppresseur de tumeur » muté, voire une molécule liée à l'angiogenèse. Cependant, d'autres domaines sont concernés par l'immunociblage, notamment la cardiologie (Réopro[®], antiplaquettes ; MyoScint, antimyosine), l'infectiologie (LeukoScan), le rejet de greffe (anti-CD3 et anti-CD25), le psoriasis (anti-IL8) et la polyarthrite rhumatoïde (anti-TNFalpha).

L'enthousiasme initial suscité par l'avènement des anticorps monoclonaux dans les années 1980 a été suivi par une vague de scepticisme car les premiers résultats cliniques n'ont pas été à la hauteur des espérances. Néanmoins, la recherche dans le domaine de l'immunociblage est demeurée très active au niveau international, tant académique qu'industriel. Récemment, les résultats de différentes études cliniques démontrent les possibilités thérapeutiques de certains anticorps et conduisent à leur approbation par la Food and Drug Administration et à l'obtention d'une autorisation de mise sur le

marché (AMM) européenne¹. Ces résultats cliniques, la disponibilité de molécules issues de l'ingénierie des anticorps et une meilleure appréhension des indications concourent à créer actuellement une situation nouvelle dans ce domaine [1-4].

Trois générations d'anticorps du murin vers l'humain

Les premiers anticorps monoclonaux développés étaient entièrement murins. Cela limite leur utilisation pour l'immunociblage chez l'homme. L'anticorps injecté peut entraîner une réponse du patient contre cette protéine étrangère. Cette réponse, connue sous le nom de Hama (*human anti-mouse antibodies*), limite le nombre d'injections que l'on peut réaliser chez un même patient. Le développement de Hama peut être variable d'un anticorps à l'autre, mais, dès que les Hama apparaissent, l'administration d'anticorps murin perd toute efficacité. De plus, ces Hama perturbent certains dosages immunologiques de marqueurs sériques utilisant des anticorps de souris [5].

Les limites des anticorps murins ont motivé des recherches pour les rendre plus utilisables chez l'homme. Cela a été possible dès 1987 grâce à la connaissance de la structure des anticorps et aux techniques d'ingénierie des protéines [6]. En effet, la structure en domaines des anticorps a permis de créer dans un premier temps des anticorps dits chimériques dans lesquels seuls les domaines variables sont murins (*figure 1*). Tous les domaines constants sont humains. Les anticorps chimériques comportent donc une partie non négligeable de protéine murine (33 %) et ils conservent la même affinité pour l'antigène que l'anticorps murin parental [7].

L'ingénierie des anticorps se développant, les laboratoires ont ensuite été capables de fabriquer des anticorps humanisés ne conservant que les régions hypervariables de l'anticorps murin qui correspondent aux zones d'interaction avec l'antigène (CDR pour *complementarity-determining regions*). Dans ce cas, la fraction de protéine murine est réduite au minimum (10 %), mais l'affinité de l'anticorps humanisé n'est pas toujours aussi élevée que celle de l'anticorps murin parental. Ce phénomène est dû à la contribution des zones dites de charpente de l'anticorps. Ces zones n'interviennent pas directement dans l'interaction avec l'antigène, mais elles permettent le positionnement des zones hypervariables de manière optimale vis-à-vis de l'antigène. Il existe des techniques pour modifier leur positionnement afin de restaurer l'affinité de départ, mais ces manipulations sont longues et le résultat n'est pas toujours satisfaisant [8].

La solution aux problèmes d'humanisation des anticorps pourrait venir de l'utilisation de souris transgéniques produisant directement des anticorps humains [9, 10]. Avec cette technologie, l'ingénierie moléculaire se situe très en amont de la production des anticorps. Chez ces animaux, il a fallu inactiver les gènes responsables de la production des anticorps de souris et introduire des gènes permettant la production d'anticorps humains. La principale difficulté du développement de ces souris transgéniques concernait la quantité d'ADN pouvant être introduite lors de la transgénèse afin d'assurer la production d'un large répertoire d'anticorps au moment de la réponse immunitaire des animaux. Après quelques essais préliminaires, environ 80 % des loci des IgG humaines ont été transférés dans le génome de ces souris. Après immunisation, les animaux ont produit des anticorps d'affinité élevée (de l'ordre de 10^{10} M^{-1}). Les processus d'immunisation et de fusion sont tout à fait comparables à ceux utilisés avec des souris classiques. Un des avantages majeurs de cette approche est que ces souris sont capables de produire des anticorps humains contre des antigènes humains tels que le récepteur de l'EGF [11]. Différentes lignées de souris produisant chacune un isotype différent ont été développées et permettent d'obtenir de manière sûre un anticorps de l'isotype désiré en fonction de l'application envisagée (IgG1, IgG2, IgG4). Un premier anticorps humain anti-EGF-récepteur d'isotype IgG2 produit à l'aide de ces souris a montré une activité antitumorale sur un modèle de carcinome épidermoïde A431 chez la souris nue [11] et des études cliniques sont en cours avec un anticorps anti-IL8 pour traiter le psoriasis [12].

L'exploitation de ces souris a maintenant été reprise par deux sociétés : Abgenix pour les XenoMouse[®] et Medarex pour les Hu-MAb Mouse[®]. Ces sociétés développent actuellement des anticorps soit en interne, soit dans le cadre de collaborations industrielles ou académiques¹.

Les autres possibilités de l'ingénierie des anticorps

Anticorps intacts et fragments d'anticorps

En plus de l'humanisation, la structure en domaines des anticorps a favorisé le développement et l'utilisation de fragments d'anticorps. L'idée était d'obtenir la plus petite molécule capable de se lier à l'antigène. Les premiers fragments d'anticorps, obtenus par digestion enzymatique, sont les fragments $F(ab')_2$ et Fab (*figure 1*). L'ingénierie génétique a permis de se limiter aux seuls domaines variables (VH et VL) pour produire des fragments variables, Fv [13], dont la forme à chaîne unique obtenue grâce à un peptide de jonction entre VH et VL, le scFv, est la plus répandue actuellement.

L'utilisation des scFv est cependant limitée *in vivo* en raison de la monovalence mais surtout de la taille (25-27 kd). Ces molécules sont éliminées par les reins dans un délai peu compatible avec une captation tumorale correcte [14, 15]. Ces scFv sont en revanche très attractifs en tant que module de base pour la construction de molécules multivalentes. Le meilleur compromis semble être une construction du type de celle décrite par Hu *et al.* [16]. Deux scFv fusionnés avec un domaine CH3 comprenant la région charnière vont former une molécule divalente de 80 kd stabilisée par les ponts disulfures naturels (*figure 1*). Si les deux scFv ont des spécificités différentes, on obtient une molécule bispécifique.

Technologie du phage display

Une autre possibilité pour produire des fragments d'anticorps humains (Fab ou scFv) est la technique du *phage display*. Proposée dès 1990 [17], cette technique a permis d'isoler des fragments d'anticorps humains [18, 19]. Elle consiste à produire des bactériophages exprimant à leur surface des fragments d'anticorps de type scFv ou Fab, fusionnés à une protéine d'enveloppe (en général la protéine p3, présente en quelques exemplaires sur l'enveloppe du phage). Il est ainsi possible de générer des banques contenant des dizaines de millions de phages exprimant chacun une combinaison VH/VL donnée ; ces banques représentent donc un répertoire d'anticorps correspondant à un nombre de combinaisons aléatoires considérable et peuvent être rapidement criblés pour isoler des fragments d'anticorps de spécificité adéquate. La rapidité de sélection de fragments par cette technique a été initialement une des raisons de son développement. Comme dans le cas des souris transgéniques XenoMouse[®] et Hu-MAb Mouse[®], il est de plus possible de produire des fragments d'anticorps humains dirigés contre des antigènes constituant des cibles thérapeutiques chez l'homme. Malheureusement, les fragments d'anticorps isolés à partir de banques construites en utilisant de l'ADNc provenant de donneurs (banques « naïves ») se sont avérés posséder une affinité peu élevée. Cette limite semble cependant avoir été dépassée avec l'augmentation de la taille des banques et l'utilisation de différentes techniques de mutagenèse [20, 21]. De plus, une fois le fragment d'anticorps recombinant sélectionné, il est possible de le modifier par ingénierie moléculaire pour construire un anticorps monoclonal complet, totalement « humain » [22]. Les premiers fragments d'anticorps obtenus par cette approche sont actuellement étudiés dans des essais cliniques chez l'homme. Un scFv dérivé d'une banque de phages, MFE23, dirigé contre l'antigène carcino-embryonnaire (ACE), est notamment étudié au Royaume-Uni *in vivo* chez l'homme à des fins d'imagerie et de radio-immunothérapie [23, 24].

Criblage à haut débit de fragments d'anticorps

La découverte de nouveaux anticorps d'intérêt thérapeutique est étroitement associée à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Les progrès de la génomique et de la protéomique (thèmes actuellement soutenus par des actions du ministère de la Recherche) vont accélérer considérablement l'identification de nouvelles cibles. À partir de banques d'ADNc humains, en utilisant des puces à ADN, il est possible de définir des profils d'expression ou des expressions différentielles de gènes surexprimés ou éteints dans les cellules tumorales prises à différents stades de la maladie et d'un traitement [25]. Les produits de ces gènes constituent des cibles potentielles pour le développement de nouvelles thérapeutiques. Ces produits de gènes peuvent être criblés avec des banques de fragments d'anticorps humains par la technique du *phage display*. Certains des anticorps sélectionnés pourraient être d'un intérêt thérapeutique en cancérologie.

Approches diagnostiques

Immunoscintigraphie

L'utilisation d'anticorps et de fragments d'anticorps marqués à l'aide d'isotopes émetteurs gamma pour l'imagerie médicale est une idée déjà ancienne [26-29]. Le principe est simple : marquer un anticorps, l'administrer à petite dose (quelques mCi d'un isotope émetteur gamma de courte durée de vie et de forte activité spécifique, tel l'indium 111 ou le technétium 99m), lui laisser le temps d'atteindre les cellules tumorales et révéler les zones de fixation à l'aide d'une gamma-caméra. Cette approche a connu de nombreux développements dès le début des années 1980 [30-36] avec l'apparition d'anticorps monoclonaux spécifiques d'antigènes tumoraux [37, 38] et la disponibilité des appareillages d'imagerie gamma dans les services de médecine nucléaire. Elle semblait promise à un bel avenir. L'investissement nécessaire avait été sous-estimé compte tenu des difficultés techniques et des limitations réelles de la méthode en termes de sensibilité et de spécificité. De nombreux travaux ont porté sur l'utilisation de fragments d'anticorps et sur les techniques de marquage (iode puis indium et technétium) sans apporter de progrès assez décisif. L'immunoscintigraphie reste aujourd'hui un examen complémentaire coûteux et donc réservé à des applications ponctuelles.

Des AMM ont été délivrées par l'Agence européenne du médicament pour plusieurs préparations injectables à base d'anticorps monoclonaux murins radiomarqués pour le diagnostic par immunoscintigraphie de certains cancers. Les performances cliniques de cette première génération de produits n'ont pas été à la hauteur des espérances et seules quelques préparations continuent à être exploitées avec des fortunes diverses. Parmi quelques préparations qui ont été ou sont encore sur le marché en Europe et aux États-Unis, nous pouvons citer l'Oncoscint pour le diagnostic des récidives des cancers colorectaux et ovariens (préparation injectable à base d'anticorps murin B72.3 radiomarqué à l'indium 111) [39], le CEA-Scan pour le diagnostic des récidives des cancers colorectaux (fragment Fab' murin anti-ACE radiomarqué au technétium 99m) [40] et le Prostascint, produit autorisé aux États-Unis seulement pour le diagnostic des récidives des cancers prostatiques (préparation injectable à base d'anticorps anti-PSMA radiomarqués à l'indium 111) [41]. La raison majeure du manque de performance de ces produits de première génération est le faible contraste existant entre la tumeur et les tissus sains. Cela ne permet de détecter que les tumeurs ou les récidives ayant une taille supérieure au centimètre. En pratique, l'immunoscintigraphie n'est jamais prescrite en première intention mais seulement dans les situations de forte suspicion de récurrence lorsque les examens classiques (scanner et/ou échographie) sont douteux ou négatifs. Cette utilisation, en dernier recours et dans les cas les plus difficiles, ne facilite certainement pas le développement de cette technique. Cependant, même si le créneau est étroit, la contribution de ces produits au diagnostic de récurrence pourrait être importante [39, 42].

L'analyse des marchés a fait apparaître que les besoins sont assez limités principalement parce qu'il ne semble pas possible de remplacer les explorations par imagerie conventionnelles (rayons X et IRM). Or la conjoncture est très défavorable à l'introduction de nouvelles techniques diagnostiques, lorsqu'elles ne se substituent pas aux anciennes. La faiblesse du marché et la concurrence de la tomographie par émission de positons (TEP) ne rendent pas vraisemblables

un développement important de l'immunoscintigraphie ni l'utilisation commerciale pour le diagnostic de nouvelles approches comme celle du ciblage multi-étapes. L'immunoscintigraphie en émission de positons sera peut-être une solution bien supérieure par la sensibilité des détecteurs, la qualité des images et les possibilités d'analyses quantitatives (voir *infra*). Dans la perspective d'une utilisation clinique importante des anticorps radiomarqués en thérapie, l'immunoscintigraphie demeurera un outil essentiel pour la présélection des patients candidats à cette thérapie (évaluation dosimétrique préthérapeutique, voir *infra*).

Chirurgie radio-immunoguidée

Parallèlement à l'immunoscintigraphie, l'immunociblage d'isotopes radioactifs offre l'opportunité de détecter les tumeurs et les métastases durant une intervention chirurgicale en explorant le champ opératoire à l'aide d'un détecteur gamma portable. Plusieurs isotopes ont été testés : l'iode 131, l'indium 111, le technétium 99m et l'iode 125 qui est le plus couramment employé. La chirurgie radio-immunoguidée a été appliquée à la détection de nombreuses tumeurs telles que les cancers du sein, du pancréas, du poumon, de l'ovaire, le cancer médullaire de la thyroïde, et principalement à celle des cancers colorectaux [43-46]. Ces études ont montré que la chirurgie radioguidée détecte des localisations tumorales qui n'auraient pas pu être vues ou palpées par le chirurgien ni même identifiées par un examen histologique [47]. Elle permet également de définir les limites du tissu tumoral, d'évaluer l'étendue de l'envahissement locorégional, de lever le doute sur des foyers suspects détectés dans le bilan préopératoire et de guider l'exérèse de métastases hépatiques. La détection de micrométastases ainsi que les informations fournies au chirurgien durant l'intervention ont un impact immédiat sur l'attitude chirurgicale [48].

Immuno-TEP (tomographie par émission de positons)

La tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie qui présente plusieurs avantages pour localiser les tumeurs en raison notamment de sa haute résolution et de sa sensibilité. Elle apporte des informations fonctionnelles (quantification du processus tumoral en rapport avec la prolifération cellulaire maligne, différenciation entre tissu métaboliquement actif et tissu cicatriciel) qui complètent les informations anatomiques obtenues en tomodensitométrie et en IRM. C'est pourquoi la TEP trouve actuellement de nombreuses indications en oncologie. Le ^{18}F -fluorodéoxyglucose (FDG) représente à lui seul environ 90 % de l'utilisation TEP, loin devant les autres radio-isotopes émetteurs de positons ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{76}Br , ^{82}Rb , ^{89}Zr , ^{124}I .

L'utilisation d'anticorps monoclonaux radiomarqués offre la possibilité de radio-immunoscintigraphie en mode TEP en utilisant ses avantages de grande sensibilité, de haute résolution et de possibilité de mesures quantitatives. Avec la multiplication à court et à moyen terme des systèmes de TEP en cancérologie clinique, on peut envisager le développement de fragments d'anticorps humanisés et marqués avec des radionucléides émetteurs de positons pour l'immunoscintigraphie des petites tumeurs dans les situations cliniques où le FDG est négatif (par exemple, le cancer de la prostate). Par ailleurs, ces mêmes radio-immunoconjugés seront très utiles en dosimétrie préthérapeutique.

Les radionucléides ayant une demi-vie de l'ordre de un à quelques jours sont préférables car, dans le cas des tumeurs solides, le rapport optimal tumeur sur sang avec les anticorps radiomarqués n'est souvent obtenu qu'après quelques jours. Ainsi les émetteurs de positons, avec une demi-vie longue, semblent plus adaptés pour prévoir le devenir des anticorps radiomarqués *in vivo*. Pour cette raison, un des premiers émetteurs de positons à avoir été utilisé pour le marquage d'anticorps a été ^{124}I ($t_{1/2} = 101 \text{ h}$ ou 4,2 j) [49]. Il a en outre l'avantage de se comporter chimiquement comme les autres isotopes de l'iode et les techniques de marquage des anticorps monoclonaux avec l'iode sont bien établies. Cependant, la plupart des isotopes utilisés en radio-immunothérapie sont des métaux et quelques différences d'accumulation dans les tissus ont été observées entre les anticorps marqués à l'iode et ceux radiomarqués avec des radiométaux comme ^{111}In . Cela est dû à la dégradation et à la déhalogénéation rapide des anticorps marqués à l'iode après internalisation. De ce fait, les anticorps marqués à ^{124}I peuvent ne pas toujours convenir pour une mesure exacte de la biodistribution. Comme alternative, l'yttrium 86 ($t_{1/2} = 14,7 \text{ h}$) est un émetteur de positons bien adapté à une étude dosimétrique avant une radio-immunothérapie réalisée avec un anticorps marqué à l'yttrium 90.

Immunophotodétection

L'immunophotodétection constitue une des perspectives attractives des techniques d'imagerie à base d'anticorps. Cette méthode est née de la rencontre du domaine de l'immunociblage des tumeurs et de celui de la photodétection des tumeurs. En effet, certains colorants peuvent être utilisés pour le diagnostic et la thérapie des cancers. Après injection au malade, les colorants concentrés avec un certain degré de spécificité dans la tumeur réagissent à une irradiation par des photons de longueurs d'onde appropriées. Les colorants ainsi excités émettent une fluorescence permettant de détecter de petites tumeurs [50]. De plus, selon la longueur d'onde excitatrice, ils peuvent produire la destruction des cellules tumorales. Cette technologie est toutefois limitée par une sélectivité trop faible des colorants utilisés (hématoporphyrine ou phthalocyanine) pour les cellules tumorales. Pour cette raison, une nouvelle stratégie consistant à coupler les colorants utilisables en photodiagnostic ou en photothérapie à des anticorps monoclonaux dirigés contre des cellules tumorales a été développée. Cette approche permet de sélectionner le colorant uniquement pour ses propriétés photochimiques optimales en laissant à l'anticorps le rôle de vecteur capable de véhiculer le colorant dans la tumeur.

Cette nouvelle technique a été développée dans le cadre d'une collaboration entre l'université de Lausanne (groupe de J.-

P. Mach : S. Folli, A. Pèlerin, P. Westermann) et l'École polytechnique de Lausanne (groupe de H. van den Bergh : G. Wagnières, D. Braichotte). Deux types de colorants fluorescents ont été couplés à des anticorps anti-ACE : la fluorescéine et l'indocyanine. Ces conjugués ont été évalués lors d'études expérimentales chez la souris [51], puis dans des études de faisabilité en clinique [52]. Les développements les plus récents concernent l'application de cette technique en situation peropératoire [53] et pour la visualisation de la néovascularisation [54, 55].

L'immunophotodétection permet d'obtenir une image très nette des zones tumorales et même de visualiser l'hétérogénéité de la localisation d'un anticorps dans le cas de gros nodules tumoraux subissant une nécrose [52]. Les masses tumorales détectées peuvent être inférieures au millimètre [53]. En revanche, en raison des parcours limités de la lumière excitatrice et de la fluorescence (quelques millimètres), cette technique ne peut s'appliquer qu'aux zones cutanées, aux zones accessibles par endoscopie ou à des situations peropératoires.

Enseignements pour le concept de ciblage

Même si les applications actuelles de l'immunoscintigraphie sont limitées, les travaux qui sont à la base de cette technique ont permis de mieux appréhender les possibilités et les limites du concept d'immunociblage dans son ensemble. Les anticorps ne sont pas des vecteurs « magiques ». Ils atteignent leur cible après un long parcours dans la circulation sanguine et une lente extravasation dans le liquide interstitiel des tumeurs. Cette extravasation est certes facilitée par la perméabilité des capillaires sanguins tumoraux, mais le flux sanguin vers les tumeurs est souvent réduit et anarchique et, en l'absence de drainage lymphatique, il n'y a évidemment pas de flux de convection de la circulation vers le tissu tumoral. Or ce n'est qu'une fois les anticorps parvenus au contact des cellules malignes que leur capacité de liaison aux antigènes spécifiques peut s'exprimer. On observe alors une rétention spécifique qui permet éventuellement la détection des tumeurs ou l'expression d'une activité pharmacologique liée aux anticorps. On comprend ainsi que souvent moins de 0,01 % de la dose d'anticorps injectée soit retrouvée dans 1 g de tumeur chez l'homme. Cela correspond tout de même à un effet de concentration important (plus de 5 fois par rapport à une distribution homogène dans tout l'organisme) mais laisse entrevoir les problèmes liés aux effets non spécifiques de la quasi-totalité du matériel administré avant son élimination. Des organes sensibles, comme la moelle osseuse, plus vascularisés, seront en contact avec des quantités certes diluées de ces réactifs mais tout de même potentiellement toxiques.

Les images scintigraphiques décrivent aussi très clairement le comportement pharmacocinétique et la distribution des anticorps et de leurs dérivés dans l'organisme. Les fragments d'anticorps sont éliminés plus rapidement que les immunoglobulines intactes et la voie d'élimination change progressivement d'une élimination majoritairement hépatique vers une élimination rénale prépondérante pour les fragments les plus petits (Fab, scFv). Cette élimination plus rapide des petits fragments diminue leur capacité à atteindre leur cible. L'avantage théorique que l'on pourrait attribuer à une petite molécule pour atteindre une cible extravasculaire est en fait complètement aboli.

D'autres difficultés ont également été rencontrées à l'occasion de ces travaux sur l'immunodétection des tumeurs *in vivo*, par exemple, l'effet inhibiteur de l'antigène circulant (antigène carcinoembryonnaire) ou la présence de l'antigène cible sur des cellules normales très accessibles à la circulation sanguine (CD20). Le métabolisme spécifique de la cellule cible ou bien encore l'apparition d'anticorps dirigés contre les protéines xénogéniques ont rendu nécessaires des développements supplémentaires.

Des parades ont été trouvées à chacun de ces problèmes : de la sélection de couples antigènes-anticorps mieux adaptés à la préparation d'anticorps humains ou humanisés en passant par de nouvelles techniques de marquage qui permettent le dépôt du radio-isotope au site de liaison après internalisation et métabolisme de la protéine par la cellule cible. Tout cet enseignement ne doit pas être oublié dans la conception de nouveaux agents thérapeutiques.

Approches thérapeutiques

Anticorps nus

Dans le domaine du cancer, nous pouvons citer trois exemples majeurs : les anticorps anti-CD20 pour le traitement de lymphomes B non hodgkiniens (Mabthera[®]), un anticorps anti-ErbB-2 préconisé actuellement dans le cancer du sein métastatique (Herceptin[®]) et l'anticorps 17-1A évalué en situation adjuvante des cancers colorectaux de stade C (Panorex[®]).

* *Rituximab (Mabthera[®])*

Depuis l'obtention de l'AMM en juin 1998, le rituximab est le premier anticorps monoclonal à visée thérapeutique en hématologie. Il est indiqué pour le traitement de patients atteints de lymphome folliculaire de stade III-IV, en cas de chimiorésistance ou à partir de la deuxième rechute après chimiothérapie.

C'est un anticorps chimérique murin/humain obtenu par génie génétique. Les domaines variables murins se fixent à l'antigène transmembranaire CD20. Le CD20 est exprimé sur plus de 90 % des lymphomes B, sur les cellules B normales (depuis les cellules pré-B jusqu'aux cellules B activées), mais pas sur les cellules souches ni sur les autres lignées hématopoïétiques [56]. La région constante Fc qui lui est associée provient d'une IgG1 humaine. Cela permet de prolonger la demi-vie plasmatique par rapport à un anticorps d'origine murine, de déclencher les mécanismes effecteurs de la

réponse immunitaire et de limiter l'apparition d'anticorps humains anti-Ig de souris (Hama). Le mécanisme d'action du rituximab n'est pas totalement élucidé. En plus de la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) et de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), l'induction de l'apoptose par action directe est évoquée.

Le rituximab est administré à 375 mg/m² en monothérapie, à raison d'une perfusion hebdomadaire pendant quatre semaines. Les résultats d'une étude multicentrique portant sur 166 patients atteints de lymphome de bas grade ou folliculaire ont montré 48 % de réponses (6 % de réponses complètes, ou RC, et 42 % de réponses partielles, ou RP) [57]. Les effets indésirables liés à la perfusion incluant le syndrome de libération de cytokines apparaissent chez plus de 50 % des patients, particulièrement chez ceux présentant une masse tumorale importante. Ce syndrome apparaît principalement lors de la première perfusion, habituellement au cours des deux premières heures. L'incidence de ces manifestations liées à la perfusion décroît considérablement au fur et à mesure des perfusions [57]. Les autres effets indésirables sont principalement hématologiques. Une neutropénie et une thrombocytopénie sévères sont apparues chez une minorité de patients (1,3 % et 1,9 % respectivement).

Plus récemment, le rituximab a été évalué en association avec la chimiothérapie (Chop) chez des patients non chimiorésistants [58]. Des réponses ont été observées chez 95 % des 40 patients de l'étude (55 % RC et 40 % RP).

* *Trastuzumab (Herceptin®)*

Le trastuzumab est la forme humanisée de l'anticorps 4D5 dirigé contre le domaine extracellulaire de ErbB2 (HER2/neu). Ce marqueur de la famille des récepteurs du facteur de croissance épidermique humain (EGF-R = ErbB1) est surexprimé dans 25 à 30 % des cancers du sein et il est associé à un mauvais pronostic [59]. Des études *in vitro* et chez l'animal avaient montré qu'un anticorps anti-ErbB2 pouvait inhiber la croissance des cellules surexprimant ce marqueur mais n'avait que peu d'action cytotoxique directe. Une première étude clinique de phase II en monothérapie avait montré 1 RC et 4 RP chez 43 patientes atteintes de carcinome mammaire métastatique surexprimant ErbB2 [60]. Dans une étude sur 37 patientes en progression sous chimiothérapie, l'association du trastuzumab et d'une chimiothérapie à base de cisplatine a permis d'obtenir 9 RP et 9 réponses mixtes (RM) [61]. Cette association donne des résultats supérieurs à ceux obtenus avec la chimiothérapie et le trastuzumab seul. Des études expérimentales ont montré que d'autres associations pourraient être envisagées [62].

De nombreuses études cliniques sont actuellement en cours afin de déterminer la meilleure utilisation de trastuzumab dans les cancers du sein ainsi que l'extension de son AMM actuelle à d'autres cancers.

* *Panorex®*

En 1994, Riethmüller *et al.* [63] ont publié un essai de phase III utilisant l'anticorps monoclonal 17-1A en traitement adjuvant des cancers colorectaux. Il s'agit d'une IgG_{2a} d'origine murine dirigée contre une glycoprotéine membranaire présente à la surface des cellules malignes et appelée EP-CAM. Il se fixe sur les cellules malignes et provoque leur destruction probablement par ADCC. Dans cette étude, 189 patients opérés d'un cancer colorectal de stade C étaient randomisés en deux bras : 90 recevaient une injection IV de 500 mg d'anticorps en postopératoire immédiat suivie d'une injection de 100 mg/mois pendant 5 mois et 76 bénéficiaient d'une surveillance simple. Après un suivi de 5 ans, il ressort que le traitement par anticorps réduit le taux de mortalité de 30 % (p = 0,04) et diminue le risque de récurrence de 27 % (p = 0,03). Il semble que cette immunothérapie prévienne mieux la dissémination métastatique que la récurrence locale. La tolérance est bonne avec seulement 4 réactions anaphylactiques bénignes, 2 problèmes allergiques, 14 troubles gastro-intestinaux, 8 cutanés, 5 cardiovasculaires, 4 neurologiques et 8 divers ayant tous récupéré totalement et rapidement, sur un total de 371 perfusions.

Ces données ont été confirmées avec un recul de 7 ans [64] et paraissent comparables aux résultats obtenus avec les associations 5FU-acide folinique et 5FU-lévamisole. Une étude internationale est actuellement en cours pour comparer l'efficacité de l'AC 17-1A à l'association 5FU-AF et à l'association des deux traitements.

Anticorps radioactifs

Si des anticorps nus se sont montrés efficaces dans certaines situations, l'hétérogénéité de l'expression de certains antigènes cibles et la difficulté de pénétration des anticorps expliquent les limites des résultats obtenus dans les tumeurs solides. Il est alors nécessaire d'armer les anticorps afin de les rendre plus efficaces.

* *État actuel de la radio-immunothérapie*

La radio-immunothérapie (RIT) consiste à irradier les tumeurs malignes de manière ciblée grâce à l'injection systémique ou locale d'un immunoconjugué radiomarqué. L'élément radioactif porté par l'anticorps peut irradier plusieurs couches de cellules au sein de la tumeur. Les isotopes utilisés pour cette radio-immunothérapie sont en général des émetteurs beta⁻ avec un rayon d'action de l'ordre de 1 mm (¹³¹I, émetteur beta⁻, gamma) à 7 mm (⁹⁰Y, émetteur beta⁻ pur). Ce phénomène, appelé « feu-croisé », permet d'irradier des cellules que les anticorps n'ont pas pu atteindre, voire des cellules qui n'exprimeraient pas l'antigène cible.

L'efficacité de la RIT a été démontrée dans la situation de lymphomes non hodgkiniens, de bas grade et de grade intermédiaire, récidivant et résistant à la chimiothérapie en utilisant notamment un anticorps monoclonal murin anti-CD20

marqué à l'iode 131 [65]. Dans cette situation favorable de tumeurs radiosensibles, cette radio-immunothérapie permet d'améliorer les résultats thérapeutiques obtenus avec les anticorps anti-CD20 nus dans les lymphomes B non hodgkiniens. L'effet de l'irradiation s'ajoute à l'action propre de l'anticorps anti-CD20. Deux stratégies ont été étudiées en fonction de la dose de radioactivité injectée au patient. Dans une approche non myélosuppressive, l'équipe de Kaminski [66] a obtenu 14 RC et 8 RP en traitant 28 malades avec des doses de 700 mg d'anticorps porteur de 34 à 161 mCi d'iode 131. Dans l'autre approche, l'équipe de Press a injecté jusqu'à 785 mCi sur 1 168 mg d'anticorps suivi d'une transplantation de cellules souches hématopoïétiques autologue. Ils ont obtenu ainsi jusqu'à 32 RC et 2 RP sur 40 patients atteints de lymphome B de différents grades préalablement traités par chimiothérapie [67]. Un recul suffisant permet d'évaluer des taux de survie globale et sans progression de respectivement 68 % et 42 % à 4 ans [68]. Ces résultats très encourageants permettent d'envisager un caractère curateur du traitement et sont comparables à ceux obtenus avec une chimiothérapie intensive et/ou une irradiation corporelle totale, avec une toxicité précoce et tardive nettement diminuée.

Des résultats également encourageants ont été obtenus dans le traitement de plusieurs formes de leucémies, en particulier les leucémies myéloïdes, où la RIT, fondée sur l'utilisation des anticorps (murins ou humanisés) marqués à l'iode 131, a été associée à une chimiothérapie et/ou une irradiation corporelle totale dans le cadre d'un traitement combiné intensif préparatoire à une greffe de moelle [69]. D'autres radio-isotopes, notamment des émetteurs alpha, sont actuellement évalués pour la RIT des leucémies (voir *infra*). Dans cette indication, il semble que la RIT pourrait avoir une place prépondérante de cytoréduction avant une greffe de moelle et permette l'élimination de la maladie résiduelle microscopique.

La radio-immunothérapie est également évaluée en clinique pour le traitement des tumeurs solides. Cependant, l'essentiel des études publiées se limite à des essais de phase I avec des patients dont les volumes tumoraux élevés semblent incompatibles avec cette approche thérapeutique [70, 71]. Plusieurs études confirment que la captation d'un anticorps est inversement proportionnelle au volume d'une tumeur, essentiellement pour des raisons de vascularisation et de mobilité des anticorps dans le liquide interstitiel [72, 73]. Chacun s'accorde donc pour considérer que, dans le cas des carcinomes, la cible clinique privilégiée de la RIT est constituée par des tumeurs de taille inférieure à quelques millimètres de diamètre. Les équipes qui travaillent dans ce domaine s'orientent donc vers le traitement de cibles microscopiques, voire une radio-immunothérapie adjuvante [74]. C'est le cas du programme de radio-immunothérapie des cancers colorectaux mené au centre régional de lutte contre le cancer de Montpellier en collaboration avec l'université Montpellier I (JE2176).

La disponibilité d'anticorps monoclonaux humains devrait améliorer les résultats obtenus dans ces tumeurs solides pour lesquelles la répétition des injections est inévitable. Parmi les développements possibles de la radio-immunothérapie, nous mentionnerons particulièrement les approches en deux et trois étapes, et l'utilisation de particules alpha (alpha-immunothérapie).

* *Approches en deux et trois étapes*

Dans le cas des tumeurs solides, l'immunociblage direct d'un radio-isotope se heurte à la difficulté de concilier une captation tumorale élevée et stable avec une élimination rapide de la radioactivité présente dans les tissus sains. En effet, la clairance plasmatique lente de l'anticorps porteur de l'isotope et l'accumulation de cet isotope dans les organes responsables du catabolisme des anticorps concourent à une augmentation du bruit de fond. De plus, la vascularisation hétérogène des tumeurs, l'hétérogénéité d'expression des antigènes tumoraux et la diffusion lente des anticorps dans le tissu tumoral contribuent également à la diminution de la captation de l'anticorps dans la tumeur [74-76].

L'utilisation de fragments d'anticorps F(ab')₂ et Fab, d'un poids moléculaire respectif de 100 et 50 kd, directement radiomarqués, a permis d'accélérer la clairance plasmatique par rapport à un anticorps intact [77-80]. Cependant, ce phénomène s'accompagne généralement d'une diminution du temps de rétention tumorale de la radioactivité [78].

Afin de modifier radicalement les propriétés pharmacocinétiques de l'agent radioactif, des procédés en deux temps ont été imaginés, dans lesquels la reconnaissance de l'antigène ciblé par l'anticorps est dissociée du ciblage de l'isotope. Ce concept repose sur l'administration de deux réactifs : dans un premier temps, un anticorps dirigé contre l'antigène tumoral cible est injecté suivi, dans un second temps, de l'injection d'une molécule portant la radioactivité. Cette dernière molécule doit être de petite taille afin de se distribuer rapidement et de se lier à l'anticorps préciblé (modifié pour cette liaison). La petite taille de la molécule marquée lui permet également d'être éliminée rapidement de la circulation.

Différentes approches ont été développées dans cette perspective :

- l'utilisation d'un anticorps biotinylé non radiomarqué associé à de l'avidine ou à de la streptavidine radioactive ;
- l'utilisation d'un anticorps couplé à de la streptavidine associé à de la biotine radiomarqué ;
- l'utilisation d'un anticorps bispécifique avec un bras dirigé contre un antigène tumoral et un bras dirigé contre un haptène que l'on peut radiomarquer.

Cependant, ces stratégies de ciblage ne sont pas totalement satisfaisantes. Si le délai entre les deux injections est trop important ou si l'affinité de l'anticorps pour la petite molécule est trop faible, la plus grande partie de celle-ci est éliminée trop rapidement et l'efficacité du ciblage est faible. Au contraire, si cette affinité est trop élevée ou si l'on réduit le délai entre les deux injections, la petite molécule sera piégée par l'anticorps circulant en excès et suivra alors la clairance

plasmatique lente de celui-ci sans amélioration du contraste [81].

Pour surmonter ces difficultés, plusieurs stratégies ont été envisagées. L'une d'elles comporte une troisième étape visant à éliminer l'excès d'anticorps circulant [82]. Elle repose sur l'injection, dans un premier temps, d'un anticorps biotinylé, suivie, dans un deuxième temps, de l'injection d'avidine permettant de « chasser » l'excès d'anticorps dans la circulation sanguine, suivie, dans un troisième temps, de l'injection de biotine radioactive.

Alternativement, un groupe américain a proposé d'injecter l'anticorps antitumeur couplé chimiquement à la streptavidine suivi, 24 à 48 h plus tard, d'une chasse (*clearing*) du conjugué par un agent biotinylé ayant la propriété d'être rapidement capté par les cellules hépatiques et, en troisième étape, d'une injection de biotine radiomarquée qui se lie rapidement aux molécules de streptavidine localisées dans la tumeur. Cette méthode a donné des résultats spectaculaires en thérapie de xénogreffes de carcinomes humains en souris nue [83] et a pu être adaptée à l'utilisation clinique [84] avec quelques résultats préliminaires encourageants dans des cas de lymphomes non hodgkiniens [85].

La technique AES (*affinity enhancement system*) est une alternative à ces approches en trois temps. Elle a été mise au point dans le cadre d'une collaboration entre le groupe d'imagerie de la société Immunotech (M. Delaage, J. Barbet) et les équipes Inserm U. 339 (A. Gruaz-Guyon) et U. 463 (J.-F. Chatal). Elle permet de conférer à la molécule radioactive une sélectivité pour l'anticorps bispécifique préciblé dans la tumeur par rapport à l'anticorps circulant en excès [86-88]. Cette stratégie, qui repose sur le concept d'augmentation d'affinité par liaisons multiples, utilise une molécule radiomarquée de clairance rapide portant deux haptènes. La nature bivalente de cette molécule lui permet de se lier simultanément à deux anticorps bispécifiques fixés à la surface de la cellule cible et de former ainsi des complexes cycliques stables. Cela entraîne une augmentation de la liaison du traceur par effet coopératif. La démonstration *in vivo* de l'efficacité de la technique AES dans un modèle de souris nues greffées avec des cellules de mélanomes humains [86] ou de tumeurs coliques humaines a permis son extension à la clinique dans le domaine de l'immunoscintigraphie [89-91] et son utilisation en radio-immunothérapie [92, 93] (*figure 2*). Les résultats des premières études cliniques de radio-immunothérapie du cancer médullaire de la thyroïde [94] et du cancer du poumon à petites cellules [95] sont prometteurs.

* *Alpha-immunothérapie*

Si les radio-isotopes émetteurs β^- utilisés actuellement en radio-immunothérapie sont bien adaptés à des tumeurs de quelques millimètres de diamètre, cela n'est pas nécessairement le cas pour les nodules tumoraux ne contenant que quelques cellules. En effet, le rayonnement β^- de type particulaire a un parcours limité de l'ordre du millimètre pour l'iode 131 (moyenne énergie) et du centimètre pour l'yttrium 90 (forte énergie). Avec ce type de rayonnement et pour une cible tumorale de 1 mm de diamètre fixant de façon homogène le radio-immunoconjugué, on a démontré que seulement 20 % de l'énergie émise sont répartis à l'intérieur de la cible et 70 % sont disséminés à l'extérieur [96]. Pour la même tumeur, qui contient environ 6×10^5 cellules, on démontre également que pour détruire 63 % des cellules tumorales il faut délivrer une dose moyenne de 260 cGy correspondant à un nombre de particules β^- de 3 500 par cellule (pour une cible de 0,1 mm de diamètre, il faudrait, dans les mêmes conditions, 35 000 particules par cellule).

Les particules alpha ont la caractéristique d'avoir un TEL (transfert linéique d'énergie) plus de 100 fois plus élevé que celui du rayonnement particulaire β^- . Elles ont en conséquence une cytotoxicité beaucoup plus élevée que celle des particules β^- . Pour reprendre la situation d'une cible tumorale de 1 mm de diamètre, il suffit d'une seule particule alpha (au lieu de 3 500 particules β^-) pour délivrer une dose qui détruit 63 % des cellules tumorales. L'irradiation de cibles tumorales microscopiques par des particules alpha est donc beaucoup plus efficace en termes de cytotoxicité que l'irradiation par des particules β^- . Pourtant, les applications médicales sont limitées par les caractéristiques radiophysiques des radionucléides émetteurs alpha disponibles. L'astate 211 et le bismuth 213 ont une période physique courte (respectivement 7 h et 40 min) qui impose un marquage rapide de l'immunoconjugué et une distribution également rapide du radio-immunoconjugué après son injection intraveineuse vers les cibles tumorales, qui doivent être rapidement accessibles.

L'alpha-immunothérapie est actuellement limitée aux cancers hématologiques de petite taille, comme les leucémies dont les cibles tumorales sont circulantes ou dans la moelle osseuse, et donc rapidement accessibles aux anticorps marqués au bismuth 213. D'ailleurs, la première étude clinique d'alpha-immunothérapie de phase I est actuellement en cours, au Memorial Sloan Kettering Cancer Centre de New York, avec un anticorps humanisé anti-CD33 (Hu 195), marqué au bismuth 213, chez des malades atteints de leucémie myéloïde aiguë [97].

Le myélome multiple est également une cible clinique bien adaptée à l'alpha-immunothérapie. C'est un cancer généralisé dès le diagnostic initial et qui reste encore incurable à notre époque. Deux mille nouveaux cas sont diagnostiqués en France chaque année. Le myélome multiple représente 1 à 2 % de la mortalité par cancer. Un programme d'alpha-immunothérapie du myélome est en cours de développement dans l'unité Inserm 463 et au centre régional de lutte contre le cancer de Nantes.

Anticorps bispécifiques pour stimuler le système immunitaire

Nous avons vu que des anticorps bispécifiques peuvent être utilisés en radio-immunothérapie dans des approches en deux temps. Certains peuvent également être utilisés pour stimuler le système immunitaire. Ils associent deux spécificités :

l'une dirigée contre la cible tumorale, l'autre dirigée contre un récepteur membranaire d'une cellule effectrice (lymphocyte, macrophage, cellule dendritique, cellule *natural killer*, granulocyte). Ils permettent à la fois l'immunociblage vers la tumeur et la stimulation des cellules effectrices de l'immunité naturelle. Cette conjonction aboutit à une forte toxicité anticorps-dépendante vers les cellules cibles (ADCC). Par exemple, un anticorps bispécifique composé d'un fragment Fab antirécepteur Fc pour les IgG (RFcγ/CD64) et d'un fragment Fab anti-ErbB2 (MDX210) présente une forte affinité et entraîne la lyse de cellules cancéreuses exprimant ErbB2 [98]. L'injection en recherche clinique de cet anticorps a permis également d'induire des réponses immunitaires humorales antitumorales chez des patientes porteuses de cancer du sein ou de l'ovaire.

Dans une approche d'immunothérapie adoptive, les anticorps bispécifiques peuvent être fixés *ex vivo* aux cellules effectrices. Cette technologie, développée par Medarex aux États-Unis et IDM¹ en Europe pour les macrophages dérivés des monocytes sanguins activés par l'interféron gamma (IFNγ) et exprimant alors fortement les RFcγ, fait l'objet d'essais cliniques de phases II et III. L'injection intrapéritonéale de macrophages porteurs de l'anticorps MDX210, capables d'exercer une ADCC, induit des réponses cliniques très prometteuses chez des patientes atteintes de carcinome ovarien. Une stratégie équivalente a également été explorée pour le recrutement et l'activation de neutrophiles exprimant fortement le RFcγ/CD64 en présence de G-CSF, par un autre anticorps bispécifique, le MDX-260, dirigé contre le CD64 et le GD2, un ganglioside surexprimé dans le neuroblastome, une tumeur pédiatrique [99].

Anticorps cellulaires : *intrabodies* et *T-bodies*

Les avancées du génie génétique et de nos connaissances en biologie cellulaire font par ailleurs entrevoir de nouvelles possibilités d'utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux : il ne s'agit plus d'injecter chez des patients des anticorps dirigés contre des molécules circulantes ou présentes à la surface de cellules cancéreuses mais de transférer les gènes codant pour l'anticorps ou son fragment afin de faire exprimer :

- par les cellules cibles elles-mêmes des fragments d'anticorps dirigés contre des molécules intracellulaires d'origine virale ou impliquées dans la transformation maligne [p21^{ras}, protéine E7 du virus du papillome (HPV type 16), p53]. Ces anticorps peuvent neutraliser ou modifier le fonctionnement de ces molécules, induisant la mort ou le retour à un fonctionnement normal des cellules ainsi ciblées. L'expression intracellulaire de fragments d'anticorps recombinants, Fab ou scFv, ouvre la voie à un nouveau type d'intervention thérapeutique, l'immunisation intracellulaire [100-102]. Il est de plus aisé d'ajouter par ingénierie moléculaire une séquence d'adressage à ce type de molécule permettant de la faire localiser dans le compartiment subcellulaire où se trouve l'antigène cible. Les anticorps recombinants obtenus sont ensuite validés *in vitro* quant à leurs capacités à interférer avec la/les fonction(s) de la protéine cible. Les travaux qui ont été développés ces dernières années visent *in fine* à utiliser ces fragments d'anticorps recombinants à des fins thérapeutiques [100]. L'étape ultérieure consiste donc à insérer l'ADNc codant le fragment d'anticorps recombinant dans un vecteur utilisable à des fins de thérapie génique (adénovirus, *adeno-associated virus* - ou AAV -, rétrovirus, etc.) et à évaluer les effets recherchés dans des modèles animaux. Les premiers essais cliniques de thérapie génique par immunisation intracellulaire sont en cours aux États-Unis ;

- par des cellules effectrices (lymphocytes T cytotoxiques) des fragments d'anticorps. Ces anticorps, exprimés à la surface des cellules T (*T-bodies*), confèrent à ces cellules une nouvelle spécificité [103, 104]. Le fragment d'anticorps est fusionné à un domaine transmembranaire et à une région intracellulaire permettant de donner à la cellule un signal d'activation quand l'anticorps lie l'antigène exprimé à la surface de la cellule cible [103]. Les chaînes utilisées sont en général les chaînes gamma du récepteur de haute affinité pour les IgE (RFcε) ou la chaîne δ présente dans le complexe multimoléculaire constituant le récepteur de l'antigène des cellules T et dans le complexe RFcγIII-A (CD16) des cellules NK. Cette cytotoxicité « redirigée » permet théoriquement de cibler les cellules T grâce à cette spécificité anticorps qu'elles ont ainsi acquise. Le signal d'activation permet à la cellule T d'exercer son effet cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales.

Immunoliposomes

Les liposomes représentent une alternative attractive pour véhiculer des quantités relativement importantes de molécules d'intérêt (radio-isotopes, drogues ou agents de contraste). Des formulations récentes de liposomes permettent de les protéger de l'opsonisation par les protéines du sérum et donc d'une élimination rapide, leur conférant ainsi un temps de circulation beaucoup plus long dans le sang (de l'ordre de quelques jours). Cela est obtenu par l'addition d'un phospholipide couplé à du polyéthylène glycol (PEG) qui, grâce à son hydrophylité, prévient la fixation des protéines sur la surface du liposome [105, 106]. Cependant, les liposomes restent en général confinés au système vasculaire, sauf lorsque celui-ci est altéré comme dans certains cas de tumeurs, d'infections ou d'inflammations. Dans ces situations, on peut obtenir un ciblage passif d'un agent de contraste, par exemple, encapsulé dans les liposomes pour l'évaluation d'une infection ou de la taille d'une tumeur, ou bien encore à des fins curatives pour délivrer des antibiotiques dans des modèles infectieux [107-109]. Cette faculté de passer localement dans les tissus est aussi exploitée en clinique dans les traitements de sarcome de Kaposi avec des liposomes contenant de la doxorubicine [110, 111]. Néanmoins, ce ciblage passif n'est que transitoire car les liposomes ne sont pas retenus sur le site et rediffusent vraisemblablement dans la circulation.

Des anticorps entiers ou leurs fragments peuvent être couplés au PEG ou à d'autres phospholipides modifiés sur les liposomes [112]. De cette façon, la spécificité de l'anticorps est transférée sur les liposomes. Les fragments d'anticorps, qui, natifs, sont éliminés plus rapidement que les liposomes, circulent alors plus longtemps dans le système vasculaire

lorsqu'ils sont couplés aux liposomes. De plus, le potentiel de chaque liposome à retenir encapsulées des molécules d'intérêt (radio-isotopes ou drogues) est énorme par rapport à un couplage direct de ces molécules sur un anticorps et l'encapsulation ne dénature pas ces molécules. Ces immunoliposomes peuvent diffuser comme les liposomes natifs, mais ils seront retenus dans la tumeur plus longtemps grâce aux anticorps. Des études précliniques ont montré que les liposomes couplés à des anticorps étaient capables de délivrer des quantités plus importantes de drogues encapsulées dans des sites tumoraux par rapport à des liposomes sous forme native [113, 114].

Un domaine privilégié pour l'interaction entre recherche académique et industrie

La nécessité d'une recherche biotechnologique forte et d'une évaluation préclinique indépendante

La conjonction des résultats cliniques récents, des études expérimentales et cliniques en cours et du développement des outils de l'ingénierie des anticorps disponibles montre que le domaine de l'immunociblage doit continuer à se développer tant en recherche expérimentale que dans ses applications cliniques. Il s'agit par nature d'un domaine de recherche pluridisciplinaire et transversal. Le développement de molécules dérivées d'anticorps nécessite la mise en œuvre des techniques les plus récentes de biotechnologie. Ces molécules doivent ensuite être évaluées dans des modèles animaux pertinents avant d'initier les études cliniques. À ce titre, la contribution des équipes de recherche académiques (Université, Inserm, CNRS, CEA) est primordiale. Leur indépendance vis-à-vis du développement ultérieur de nouvelles molécules est la garantie d'une analyse critique des possibilités et des limites de ces produits. Cette recherche à visée médicale doit pouvoir se développer au sein même des équipes académiques. La prise en compte récente du développement des biotechnologies par l'Université et les organismes de recherche devrait permettre d'améliorer la situation actuelle.

D'autre part, l'importance de cette évaluation préclinique est liée au caractère original de chaque anticorps. Tous les anticorps anti-CD20, anti-ErbB2 ou anti-ACE ne donnent pas les mêmes effets biologiques sur les mêmes cibles tumorales. Cela contribue d'ailleurs à la difficulté d'interprétation des résultats de la littérature car les auteurs ne comparent pas en général leurs anticorps avec ceux des équipes de la concurrence. Il faut donc éviter l'amalgame entre l'évaluation d'une stratégie diagnostique ou thérapeutique et l'évaluation d'un anticorps.

De l'hybridome à l'anticorps médicament

Entre le choix d'un anticorps fondé sur la base de son activité dans l'évaluation préclinique et les premières études cliniques se déroule une étape importante de qualification et production pharmaceutique de cet anticorps pour une utilisation clinique.

Les anticorps monoclonaux sont des produits d'origine biologique élaborés à partir de matériel génétique animal et/ou humain. Ils sont donc susceptibles d'être contaminés par des molécules d'origine virale. Consciente de ce problème, la Commission européenne du médicament a édité une série de notes explicatives¹ concernant la production et le contrôle qualité des anticorps monoclonaux pour utilisation chez l'homme. Les principales dispositions décrites dans ces notes ont pour objectif d'assurer la pérennité de production de l'anticorps dans le respect des bonnes pratiques de fabrication pharmaceutique et de garantir la sécurité virale des produits ainsi fabriqués.

Cela implique la réalisation de contrôles virologiques à différents stades du procédé de production. Ces contrôles virologiques, effectués seulement par quelques sociétés spécialisées, sont très onéreux. Ces coûts, additionnés à l'investissement nécessaire pour se doter d'une unité de production pharmaceutique pour la préparation de produits injectables, constituent un obstacle important au développement de ces produits par des instituts ou des sociétés de petite ou moyenne importance. Cela est certainement la raison pour laquelle les anticorps actuellement disponibles sur le marché sont proposés par de grandes sociétés pharmaceutiques.

Les exemples de collaborations

Au-delà des difficultés mentionnées *supra*, il faut noter l'existence de collaborations entre laboratoires académiques et industries à la base de l'étude et du développement de certaines approches d'immunociblage. Concernant la France, nous citerons trois exemples.

La double compétence de CIS bio international² dans le domaine des anticorps monoclonaux et celui de la radioactivité a conduit cette société au centre de plusieurs collaborations depuis de nombreuses années. CIS bio a été un des pionniers dans l'utilisation des anticorps radiomarqués pour le diagnostic et a obtenu, en 1987, la première autorisation mondiale de mise sur le marché dans le domaine pour sa spécialité Imacis-1 (cocktail d'anticorps monoclonaux 19-9 et anti-ACE radiomarqués à l'iode 131 pour le diagnostic des cancers colorectaux). Ce résultat a été acquis par la mise en place de collaborations étroites nationales et internationales (la société Centocor pour la fourniture d'anticorps monoclonaux et l'Inserm U. 463 de Nantes pour tout le développement préclinique). Par la suite, les collaborations pour le développement préclinique et clinique du diagnostic et de la thérapie à base d'anticorps radiomarqués ont été étendues à plusieurs laboratoires et centres cliniques français (Institut Gustave-Roussy, centre René-Gauducheau, centre René-Huguenin, centre Val-d'Aurelle-Paul-Lamarque). Une collaboration entre CIS bio et la Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer³ a permis de réaliser un protocole de phase II d'évaluation d'anticorps OC125 F(ab')₂ marqué à l'iode 131 pour le traitement des cancers ovariens. Malheureusement, les résultats obtenus n'ont pas incité à poursuivre dans cette

application. Plus récemment, un programme de radio-immunothérapie des cancers digestifs s'est mis en place à Montpellier en partenariat avec CIS bio international. Après une première étude sur les métastases hépatiques non résecables de cancers colorectaux [70], cette collaboration se poursuit actuellement avec une étude de radio-immunothérapie en situation adjuvante.

Un autre exemple de collaboration étroite entre l'industrie et les laboratoires publics est celui du développement de la technologie AES par la société Immunotech⁴ (M. Delaage, J. Barbet) et plusieurs laboratoires Inserm (U. 463, J.-F. Chatal, et U. 339, A. Gruaz-Guyon), CNRS (laboratoire d'ingénierie des systèmes macromoléculaires, CNRS-IBSM-UPR9027, D. Baty) et CEA (laboratoire de cristallographie et de cristallogenèse des protéines, Institut de biologie structurale J.-P. Ebel, J. C. Fontecilla-Camps) avec l'aide de CIS bio international. Ce travail a montré que l'immunoscintigraphie en deux étapes était possible et efficace et sans doute supérieure aux approches directes. Le contexte économique rend toutefois une exploitation industrielle de ces résultats en matière de diagnostic assez incertaine. Cette collaboration a également débouché sur une preuve de faisabilité clinique de la radio-immunothérapie en deux étapes des tumeurs solides. Elle se poursuit après la concession d'une licence à la société IBC Pharmaceuticals, Llc, filiale commune à Immunomedics Inc. et Beckman-Coulter Inc., installée dans le New Jersey, qui est chargée de poursuivre le développement des produits thérapeutiques exploitant la technologie AES. Ces travaux extrêmement coûteux ont été rendus possibles par des aides gouvernementales substantielles dans le cadre des procédures de saut technologique et de Projets hospitaliers de recherche clinique (PHRC).

Diaclone¹ possède depuis près de dix ans des rapports privilégiés avec la recherche clinique française. Une collaboration étroite entre Diaclone et différentes équipes de CHU en France a permis d'entreprendre plusieurs protocoles d'essais cliniques pour le traitement de diverses pathologies à l'aide d'anticorps monoclonaux. Concernant l'oncologie, l'utilisation d'un anticorps anti-IL6 semble très prometteuse. Elle a été mise en œuvre dans le traitement de myélomes multiples [115, 116] (B. Klein, Unité de thérapie cellulaire, CHU Montpellier et R. Bataille, Laboratoire d'hématologie, CHU Nantes), de lymphomes induits par le virus d'Epstein-Barr (A. Fischer, Hôpital Necker, Paris), de pathologies VIH et lymphomes (D. Émilie, Inserm U. 131, Hôpital Bécclère, Clamart). Deux autres études sont en cours dans le cadre du traitement de myélomes multiples, l'une au CHU de Montpellier (B. Klein, Unité de thérapie cellulaire et J.-F. Rossi, Service des maladies du sang B), l'autre au CHU de Nantes (J.-L. Harousseau et R. Bataille, Service d'hématologie clinique).

Notes

¹ La liste mise à jour de ces anticorps est disponible sur le site internet de l'Agence européenne (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, <http://www.eudra.org>) ou sur celui de la Food and Drug Administration (<http://www.fda.gov>).

¹ <http://www.abgenix.com> et <http://www.medarex.com>

¹ <http://www.idm-biotech.com>

¹ Eudralex volume 3A, *Guidelines Medicinal Products for Human Use : Quality and Biotechnology*, European Commission.

² <http://www.cisbiointernational.fr>

³ <http://www.fnlcc.fr>

⁴ <http://www.immunotech.fr>

¹ <http://www.diaclone.com>

CONCLUSION

Les différentes techniques à notre disposition actuellement permettent de produire des anticorps et des molécules dérivées d'anticorps de plus en plus adaptés aux besoins des cliniciens. Il n'est pas possible de dire actuellement si une de ces technologies se développera plus que les autres. Chacune ayant sa spécificité, il est probable qu'elles coexisteront et que les outils diagnostiques et thérapeutiques de demain seront issus de différentes approches technologiques mentionnées dans cette revue.

Plusieurs anticorps sont déjà disponibles en clinique quotidienne. Il faudra encore de nombreuses études cliniques pour déterminer la place exacte de l'immunociblage dans l'arsenal diagnostique et thérapeutique des cancers, mais il est d'ores et déjà évident que cette place sera importante et que cette approche s'installera durablement dans la pratique clinique.

REFERENCES

1. Chatal JF, Hoefnagel CA. Radionuclide therapy. *Lancet* 1999 ; 354 : 931-5.
2. DeNardo SJ, Kroger LA, DeNardo GL. A new era for radiolabeled antibodies in cancer ? *Curr Opin Immunol* 1999 ; 11 : 563-9.

3. Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Semin Oncol* 1999 ; 26 : 43-51.
4. Breedveld FC. Therapeutic monoclonal antibodies. *Lancet* 2000 ; 355 : 735-40.
5. Oltrogge JB, Baum RP, Lema KN, Donnerstag B, Hor G. How to overcome the disturbing effects of human anti-mouse antibodies (Hama) on *in vitro* assays. *Int J Biol Markers* 1997 ; 12 : 15-7.
6. Sun LK, Curtis P, Rakowicz Szulczynska E, Ghayeb J, Chang N, Morrison SL, *et al.* Chimeric antibody with human constant regions and mouse variable regions directed against carcinoma-associated antigen 17-1A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 214-8.
7. Shaw DR, Khazaeli MB, LoBuglio AF. Mouse/human chimeric antibodies to a tumor-associated antigen : biologic activity of the four human IgG subclasses. *J Natl Cancer Inst* 1988 ; 80 : 1553-9.
8. Vaughan TJ, Osbourn JK, Tempest PR. Human antibodies by design. *Nature Biotechnol* 1998 ; 16 : 535-9.
9. Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, Tronstine M, Higgins KM, Schramm SR, *et al.* Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 1994 ; 368 : 856-9.
10. Mendez MJ, Green LL, Corvalan JR, Jia XC, Maynard-Currie CE, Yang XD, *et al.* Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nature Genet* 1997 ; 15 : 146-56.
11. Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, Wang P, Davis CG, Jakobovits A. Eradication of established tumors by a fully human monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor without concomitant chemotherapy. *Cancer Res* 1999 ; 59 : 1236-43.
12. Yang X-D, Corvalan J, Wang P, Roy C-N, Davis C. Fully human anti-interleukin-8 monoclonal antibodies : potential therapeutics for the treatment of inflammatory disease states. *J Leukocyte Biol* 1999 ; 66 : 401-10.
13. Skerra A, Pluckthun A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 1988 ; 240 : 1038-41.
14. Jackson H, Bacon L, Pedley RB, Derbyshire E, Field A, Osbourn J, *et al.* Antigen specificity and tumour targeting efficiency of a human carcinoembryonic antigen-specific scFv and affinity-matured derivatives. *Br J Cancer* 1998 ; 78 : 181-8.
15. Pietersz GA, Patrick MR, Chester KA. Preclinical characterization and *in vivo* imaging studies of an engineered recombinant technetium-99m-labeled metallothionein-containing anti-carcinoembryonic antigen single-chain antibody. *J Nucl Med* 1998 ; 39 : 47-56.
16. Hu S, Shively L, Raubitschek A, Sherman M, Williams LE, Wong JY, *et al.* Minibody : a novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Res* 1996 ; 56 : 3055-61.
17. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies : filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990 ; 348 : 552-4.
18. Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 1991 ; 352 : 624-8.
19. Barbas CFD, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 7978-82.
20. Hawkins RE, Russell SJ, Winter G. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol* 1992 ; 226 : 889-96.
21. Chames P, Coulon S, Baty D. Improving the affinity and the fine specificity of an anti-cortisol antibody by parsimonious mutagenesis and phage display. *J Immunol* 1998 ; 161 : 5421-9.
22. Huls GA, Heijnen IA, Cuomo ME, Koningsberger JC, Wiegman L, Boel E, *et al.* A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments. *Nature Biotechnol* 1999 ; 17 : 276-81.
23. Begent RHJ, Verhaar MJ, Chester KA, Casey JL, Green AJ, Napier MP, *et al.* Clinical evidence of efficient tumor targeting based on single-chain Fv antibody selected from a combinatorial library. *Nature Med* 1996 ; 2 : 979-84.
24. Begent RH. Targeting cancer therapy. *Br J Cancer* 1999 ; 80 (suppl. 1) : 104-9.
25. Bertucci F, Van Hulst S, Bernard K, Loriod B, Granjeaud S, Tagett R, *et al.* Expression scanning of an array of growth control genes in human tumor cell lines. *Oncogene* 1999 ; 18 : 3905-12.
26. Primus FJ, Wang RH, Goldenberg DM, Hansen HJ. Localization of human GW-39 tumors in hamsters by radiolabeled

heterospecific antibody to carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* 1973 ; 33 : 2977-82.

27. Goldenberg DM, Preston DF, Primus FJ, Hansen HJ. Photoscan localization of GW-39 tumors in hamsters using radiolabeled anti-carcinoembryonic antigen immunoglobulin G. *Cancer Res* 1974 ; 34 : 1-9.

28. Mach JP, Carrel S, Merenda C, Sordat B, Cerottini JC. *In vivo* localisation of radiolabelled antibodies to carcinoembryonic antigen in human colon carcinoma grafted into nude mice. *Nature* 1974 ; 248 : 704-6.

29. Goldenberg DM, DeLand F, Kim E, Bennett S, Primus FJ, VanNagell JR, *et al.* Use of radiolabeled antibodies to carcinoembryonic antigen for the detection and localization of diverse cancers by external photoscanning. *N Engl J Med* 1978 ; 298 : 1384-8.

30. Mach JP, Buchegger F, Forni M, Ritschard J, Berche C, Lumbroso JD, *et al.* Use of radiolabelled monoclonal anti-CEA antibodies for the detection of human carcinomas by external photoscanning and tomoscintigraphy. *Immunol Today* 1981 ; 2 : 239-49.

31. Berche C, Mach JP, Lumbroso JD, Langlais C, Aubry F, Buchegger F, *et al.* Tomoscintigraphy for detecting gastrointestinal and medullary thyroid cancers : first clinical results using radiolabeled monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen. *Br Med J* 1982 ; 285 : 1447-51.

32. Epenetos AA, Mather S, Granowska M, Nimmon CC, Hawkins LR, Britton KE, *et al.* Targeting of iodine-123-labelled tumour-associated monoclonal antibodies to ovarian, breast and gastrointestinal tumours. *Lancet* 1982 ; II : 999-1005.

33. Larson SM, Brown JP, Wright PW, Carrasquillo JA, Hellstrom I, Hellstrom KE. Imaging of melanoma with L-131-labeled monoclonal antibodies. *J Nucl Med* 1983 ; 24 : 123-9.

34. Goldenberg DM. Tumor imaging with monoclonal antibodies. *J Nucl Med* 1983 ; 24 : 360-2.

35. Buchegger F, Haskell CM, Schreyer M, Scazziga BR, Randin S, Carrel S, *et al.* Radiolabeled fragments of monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen for localization of human colon carcinoma grafted into nude mice. *J Exp Med* 1983 ; 158 : 413-27.

36. Colcher D, Keenan AM, Larson SM, Schlom J. Prolonged binding of a radiolabeled monoclonal antibody (B72.3) used for the *in situ* radioimmunodetection of human colon carcinoma xenografts. *Cancer Res* 1984 ; 44 : 5744-51.

37. Carrel S, Accolla RS, Carmagnola AL, Mach JP. Common human melanoma-associated antigens detected by monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1980 ; 40 : 2523-8.

38. Accolla RS, Carrel S, Mach JP. Monoclonal antibodies specific for carcinoembryonic antigen and produced by two hybrid cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980 ; 77 : 563-6.

39. Pinkas L, Robins PD, Forstrom LA, Mahoney DW, Mullan BP. Clinical experience with radiolabelled monoclonal antibodies in the detection of colorectal and ovarian carcinoma recurrence and review of the literature. *Nucl Med Commun* 1999 ; 20 : 689-96.

40. Erb DA, Nabi HA. Clinical and technical considerations for imaging colorectal cancers with technetium-99m-labeled antiCEA Fab' fragment. *J Nucl Med Technol* 2000 ; 28 : 12-8 ; quiz 21.

41. Murphy GP, Elgamal AA, Troychak MJ, Kenny GM. Follow-up ProstaScint scans verify detection of occult soft-tissue recurrence after failure of primary prostate cancer therapy. *Prostate* 2000 ; 42 : 315-7.

42. Petronis JD, Regan F, Lin K. Indium-111 capromab pendetide (ProstaScint) imaging to detect recurrent and metastatic prostate cancer. *Clin Nucl Med* 1998 ; 23 : 672-7.

43. Martin DT, Hinkle GH, Tuttle S, Olsen J, Nabi H, Houchens D, *et al.* Intraoperative radioimmunodetection of colorectal tumor with a hand-held radiation detector. *Am J Surg* 1985 ; 150 : 672-5.

44. Di Carlo V, De Nardi P, Stella M, Magnani P, Fazio F. Preoperative and intraoperative radioimmunodetection of cancer pretargeted by biotinylated monoclonal antibodies. *Semin Surg Oncol* 1998 ; 15 : 235-8.

45. Veroux G, Nicosia AS, Veroux P, Cardillo P, Veroux M, Amodeo C. Radioimmunoguided surgery. *Hepatogastroenterology* 1999 ; 46 : 3099-108.

46. Schneebaum S, Even-Sapir E, Cohen M, Shacham-Lehrman H, Gat A, Brazovsky E, *et al.* Clinical applications of gamma-detection probes - radioguided surgery. *Eur J Nucl Med* 1999 ; 26 : S26-35.

47. Schneebaum S, Arnold MW, Houchens DP, Greenson JK, Cote RJ, Hitchcock CL, *et al.* The significance of intraoperative periportal lymph node metastasis identification in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1995 ; 75 : 2809-17.

48. De Labriolle-Vaylet C, Cattan P, Sarfati E, Wioland M, Billotey C, Brocheriou C, *et al.* Successful surgical removal of

occult metastases of medullary thyroid carcinoma recurrences with the help of immunoscintigraphy and radioimmunoguided surgery. *Clin Cancer Res* 2000 ; 6 : 363-71.

49. Snook DE, Rowlinson Busza G, Sharma HL, Epenetos AA. Preparation and *in vivo* study of ¹²⁴I-labelled monoclonal antibody H17E2 in a human tumour xenograft model. A prelude to positron emission tomography (PET). *Br J Cancer Suppl* 1990 ; 10 : 89-91.

50. Profio AE, Balchum OJ. Fluorescence diagnosis of cancer. *Adv Exp Med Biol* 1985 ; 193 : 43-50.

51. Pèlegriin A, Folli S, Buchegger F, Mach JP, Wagnières G, van den Bergh H. Antibody-fluorescein conjugates for photoimmunodiagnosis of human colon carcinoma in nude mice. *Cancer* 1991 ; 67 : 2529-37.

52. Folli S, Wagnières G, Pèlegriin A, Calmes JM, Braichotte D, Buchegger F, *et al.* Immunophotodiagnosis of colon carcinomas in patients injected with fluoresceinated chimeric antibodies against carcinoembryonic antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 7973-7.

53. Gutowski M, Carcenac M, Pourquier D, Larroque C, Rouanet P, Pèlegriin A. Intraoperative immunophotodetection for radical resection of cancer : evaluation in an experimental model. *Submitted* 2000.

54. Birchler M, Viti F, Zardi L, Spiess B, Neri D. Selective targeting and photocoagulation of ocular angiogenesis mediated by a phage-derived human antibody fragment. *Nature Biotechnol* 1999 ; 17 : 984-8.

55. Birchler M, Neri G, Tarli L, Halin C, Viti F, Neri D. Infrared photodetection for the *in vivo* localisation of phage-derived antibodies directed against angiogenic markers. *J Immunol Methods* 1999 ; 231 : 239-48.

56. Zhou L, Tedder T. CD20 workshop panel report. *In* : Schlossman S, Boumsell M, Gilks W, *et al.* (eds). *Leucocyte typing V : white cell differentiation antigens*. Oxford, UK : Oxford University, 1995 ; vol. V : 511-4.

57. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, *et al.* Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma : half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 1998 ; 16 : 2825-33.

58. Czuczman MS. CHOP plus rituximab chemoimmunotherapy of indolent B-cell lymphoma. *Semin Oncol* 1999 ; 26 : 88-96.

59. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, *et al.* Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989 ; 244 : 707-12.

60. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, *et al.* Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1996 ; 14 : 737-44.

61. Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D, *et al.* Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* 1998 ; 16 : 2659-71.

62. Pegram M, Hsu S, Lewis G, Pietras R, Beryt M, Sliwkowski M, *et al.* Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 1999 ; 18 : 2241-51.

63. Riethmüller G, Schneider-Gadicke E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, *et al.* Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group. *Lancet* 1994 ; 343 : 1177-83.

64. Riethmüller G, Holz E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, *et al.* Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer : seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 1998 ; 16 : 1788-94.

65. Press OW. Radiolabeled antibody therapy of B-cell lymphomas. *Semin Oncol* 1999 ; 26 : 58-65.

66. Kaminski MS, Zasadny KR, Francis IR, Fenner MC, Ross CW, Milik AW, *et al.* Iodine-131-anti-B1 radioimmunotherapy for B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1996 ; 14 : 1974-81.

67. Corcoran MC, Eary J, Bernstein I, Press OW. Radioimmunotherapy strategies for non-Hodgkin's lymphomas. *Ann Oncol* 1997 ; 8 : 133-8.

68. Liu SY, Eary JF, Petersdorf SH, Martin PJ, Maloney DG, Appelbaum FR, *et al.* Follow-up of relapsed B-cell lymphoma patients treated with iodine-131-labeled anti-CD20 antibody and autologous stem-cell rescue. *J Clin Oncol* 1998 ; 16 : 3270-8.

69. Jurcic JG, Scheinberg DA. Radioimmunotherapy of hematological cancer : problems and progress. *Clin Cancer Res* 1995 ; 1 : 1439-46.

70. Ychou M, Pèleguin A, Faurous P, Robert B, Saccavini JC, Guerreau D, *et al.* Phase I/II radio-immunotherapy study with iodine-131-labeled anti-CEA monoclonal antibody F6 F(ab')₂ in patients with non-resectable liver metastases from colorectal cancer. *Int J Cancer* 1998 ; 75 : 615-9.
71. Juweid ME, Sharkey RM, Behr T, Swayne LC, Dunn R, Siegel J, *et al.* Radioimmunotherapy of patients with small-volume tumors using iodine-131-labeled anti-CEA monoclonal antibody NP-4 F(ab')₂. *J Nucl Med* 1997 ; 37 : 1504-10.
72. Vogel CA, Galniche MC, Buchegger F. Radioimmunotherapy and fractionated radiotherapy of human colon cancer liver metastases in nude mice. *Cancer Res* 1997 ; 57 : 447-53.
73. Bardies M, Thedrez P, Gestin JF, Marcille BM, Guerreau D, Faivre-Chauvet A, *et al.* Use of multi-cell spheroids of ovarian carcinoma as an intraperitoneal radio-immunotherapy model : uptake, retention kinetics and dosimetric evaluation. *Int J Cancer* 1992 ; 50 : 984-91.
74. Sgouros G. Radioimmunotherapy of micrometastases : sidestepping the solid-tumor hurdle. *J Nucl Med* 1995 ; 36 : 1910-2.
75. Jain RK. Barriers to drug delivery in solid tumors. *Sci Am* 1994 ; 271 : 58-65.
76. Kairemo KJ. Radioimmunotherapy of solid cancers : a review. *Acta Oncol* 1996 ; 35 : 343-55.
77. Delaloye B, Bischof Delaloye A, Buchegger F, von Flidner V, Grob JP, Volant JC, *et al.* Detection of colorectal carcinoma by emission-computerized tomography after injection of ¹²³I-labeled Fab or F(ab')₂ fragments from monoclonal anti-carcinoembryonic antigen antibodies. *J Clin Invest* 1986 ; 77 : 301-11.
78. Behr TM, Memtsoudis S, Sharkey RM, Blumenthal RD, Dunn RM, Gratz S, *et al.* Experimental studies on the role of antibody fragments in cancer radio-immunotherapy : influence of radiation dose and dose rate on toxicity and anti-tumor efficacy. *Int J Cancer* 1998 ; 77 : 787-95.
79. Schubiger PA, Alberto R, Smith A. Vehicles, chelators, and radionuclides : choosing the « building blocks » of an effective therapeutic radioimmunoconjugate. *Bioconjug Chem* 1996 ; 7 : 165-79.
80. Goldenberg DM, Goldenberg H, Sharkey RM, Higginbotham Ford E, Lee RE, Swayne LC, *et al.* Clinical studies of cancer radioimmunodetection with carcinoembryonic antigen monoclonal antibody fragments labeled with ¹²³I or ^{99m}Tc. *Cancer Res* 1990 ; 50 : 909s-21.
81. Rosebrough SF. Two-step immunological approaches for imaging and therapy. *Q J Nucl Med* 1996 ; 40 : 234-51.
82. Paganelli G, Magnani P, Zito F, Villa E, Sudati F, Lopalco L, *et al.* Three-step monoclonal antibody tumor targeting in carcinoembryonic antigen-positive patients. *Cancer Research* 1991 ; 51 : 5960-6.
83. Axworthy DB, Reno JM, Hyalarides MD, Mallett RW, Theodore LJ, Gustavson LM, *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 : 1802-7.
84. Breitz HB, Weiden PL, Beaumier PL, Axworthy DB, Seiler C, Su FM, *et al.* Clinical optimization of pretargeted radioimmunotherapy with antibody-streptavidin conjugate and 90Y-DOTA-biotin. *J Nucl Med* 2000 ; 41 : 131-40.
85. Weiden PL, Breitz HB, Press O, Appelbaum JW, Bryan JK, Gaffigan S, *et al.* Pretargeted radioimmunotherapy (PRIT) for treatment of non-Hodgkin's lymphoma (NHL) : initial phase I/II study results. *Cancer Biother Radiopharm* 2000 ; 15 : 15-29.
86. 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 (published erratum appears in *Cancer Res* 1990 ; 50 : 6115). *Cancer Res* 1990 ; 50 : 3445-52.
87. Le Doussal JM, Gautherot E, Martin M, Barbet J, Delaage M. Enhanced *in vivo* targeting of an asymmetric bivalent hapten to double-antigen-positive mouse B cells with monoclonal antibody conjugate cocktails. *J Immunol* 1991 ; 146 : 169-75.
88. Janevik-Ivanovska E, Gautherot E, Hillairet de Boisferon M, Cohen M, Milhaud G, Tartar A, *et al.* Bivalent hapten-bearing peptides designed for iodine-131 pretargeted radioimmunotherapy. *Bioconjug Chem* 1997 ; 8 : 526-33.
89. Le Doussal JM, Chetanneau A, Gruaz-Guyon A, Martin M, Gautherot E, Lehur PA, *et al.* Bispecific monoclonal antibody-mediated targeting of an indium-111-labeled DTPA dimer to primary colorectal tumors: pharmacokinetics, biodistribution, scintigraphy and immune response. *J Nucl Med* 1993 ; 34 : 1662-71.
90. Peltier P, Curtet C, Chatal JF, Le Doussal JM, Daniel G, Aillet G, *et al.* Radioimmunodetection of medullary thyroid cancer using a bispecific anti-CEA/anti-indium-DTPA antibody and an indium-111-labeled DTPA dimer. *J Nuclear Med* 1993 ; 34 : 1267-73.

91. Vuillez JP, Moro D, Brichon PY, Rouvier E, Brambilla E, Barbet J, *et al.* Two-step immunoscintigraphy for non-small-cell lung cancer staging using a bispecific anti-CEA/anti-indium-DTPA antibody and an indium-111-labeled DTPA dimer. *J Nucl Med* 1997 ; 38 : 507-11.
92. Gautherot E, Bouhou J, Le Doussal JM, Manetti C, Martin M, Rouvier E, *et al.* Therapy for colon carcinoma xenograft with bispecific antibody-targeted, iodine-131-labeled bivalent hapten. *Cancer* 1997 ; 80 (suppl.) : 2618-23.
93. Kraeber-Bodere F, Faivre-Chauvet A, Sai-Maurel C, Campion L, Fiche M, Gautherot E, *et al.* Toxicity and efficacy of radioimmunotherapy in carcinoembryonic antigen-producing medullary thyroid cancer xenograft : comparison of iodine ¹³¹-labeled F(ab')₂ and pretargeted bivalent hapten and evaluation of repeated injections. *Clin Cancer Res* 1999 ; 5 : 3183s-9.
94. Kraeber-Bodere F, Bardet S, Hoefnagel CA, Vieira MR, Vuillez JP, Murat A, *et al.* Radioimmunotherapy in medullary thyroid cancer using bispecific antibody and iodine ¹³¹-labeled bivalent hapten : preliminary results of a phase I/II clinical trial. *Clin Cancer Res* 1999 ; 5 : 3190s-8s.
95. Vuillez JP, Kraeber-Bodere F, Moro D, Bardies M, Douillard JY, Gautherot E, *et al.* Radioimmunotherapy of small cell lung carcinoma with the two-step method using a bispecific anti-carcinoembryonic antigen/anti-diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) antibody and iodine-131 Di-DTPA hapten : results of a phase I/II trial. *Clin Cancer Res* 1999 ; 5 : 3259s-67.
96. Geerlings MW. Radionuclides for radioimmunotherapy: criteria for selection. *Int J Biol Markers* 1993 ; 8 : 180-6.
97. McDevitt MR, Sgouros G, Finn RD, Humm JL, Jurcic JG, Larson SM, *et al.* Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med* 1998 ; 25 : 1341-51.
98. Keler T, Graziano RF, Mandal A, Wallace PK, Fisher J, Guyre PM, *et al.* Bispecific antibody-dependent cellular cytotoxicity of HER2/neu- overexpressing tumor cells by Fc gamma receptor type I-expressing effector cells. *Cancer Res* 1997 ; 57 : 4008-14.
99. Michon J, Moutel S, Barbet J, Romet-Lemonne JL, Deo YM, Fridman WH, *et al.* *In vitro* killing of neuroblastoma cells by neutrophils derived from granulocyte colony-stimulating factor-treated cancer patients using an anti-disialoganglioside/anti-Fc gamma RI bispecific antibody. *Blood* 1995 ; 86 : 1124-30.
100. Marasco WA. Intrabodies : turning the humoral immune system outside in for intracellular immunization. *Gene Ther* 1997 ; 4 : 11-5.
101. Cochet O, Kenigsberg M, Delumeau I, Virone-Oddos A, Multon MC, Fridman WH, *et al.* Intracellular expression of an antibody fragment-neutralizing p21 ras promotes tumor regression. *Cancer Res* 1998 ; 58 : 1170-6.
102. Caron de Fromentel C, Gruel N, Venot C, Debussche L, Conseiller E, Dureuil C, *et al.* Restoration of transcriptional activity of p53 mutants in human tumour cells by intracellular expression of anti-p53 single chain Fv fragments. *Oncogene* 1999 ; 18 : 551-7.
103. Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 720-4.
104. Moritz D, Wels W, Mattern J, Groner B. Cytotoxic T lymphocytes with a grafted recognition specificity for ERBB2-expressing tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 4318-22.
105. Papahadjopoulos D, Allen TM, Gabizon A, Mayhew E, Matthay K, Huang SK, *et al.* Sterically stabilized liposomes : improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 11460-4.
106. Allen TM, Hansen C, Martin F, Redemann C, Yau-Young A. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives *in vivo*. *Biochim Biophys Acta* 1991 ; 1066 : 29-36.
107. Dams ET, Becker MJ, Oyen WJ, Boerman OC, Storm G, Laverman P, *et al.* Scintigraphic imaging of bacterial and fungal infection in granulocytopenic rats. *J Nucl Med* 1999 ; 40 : 2066-72.
108. Bakker-Woudenberg IA, Lokerse AF, ten Kate MT, Mouton JW, Woodle MC, Storm G. Liposomes with prolonged blood circulation and selective localization in *Klebsiella pneumoniae*-infected lung tissue. *J Infect Dis* 1993 ; 168 : 164-71.
109. Dams ET, Oyen WJ, Boerman OC, Storm G, Laverman P, Kok PJ, *et al.* ^{99m}Tc-PEG liposomes for the scintigraphic detection of infection and inflammation : clinical evaluation. *J Nucl Med* 2000 ; 41 : 622-30.
110. Presant CA, Blayney D, Proffitt RT, Turner AF, Williams LE, Nadel HI, *et al.* Preliminary report: imaging of Kaposi sarcoma and lymphoma in Aids with indium-111-labelled liposomes. *Lancet* 1990 ; 335 : 1307-9.
111. Lasic DD. Doxorubicin in sterically stabilized liposomes. *Nature* 1996 ; 380 : 561-2.

- 112.** Allen TM, Brandeis E, Hansen CB, Kao GY, Zalipsky S. A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1995 ; 1237 : 99-108.
- 113.** Lopes de Menezes DE, Pilarski LM, Allen TM. *In vitro* and *in vivo* targeting of immunoliposomal doxorubicin to human B-cell lymphoma. *Cancer Res* 1998 ; 58 : 3320-30.
- 114.** Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev* 1999 ; 51 : 691-743.
- 115.** Bataille R, Barlogie B, Lu ZY, Rossi JF, Lavabre-Bertrand T, Beck T, *et al.* Biologic effects of anti-interleukin-6 murine monoclonal antibody in advanced multiple myeloma. *Blood* 1995 ; 86 : 685-91.
- 116.** Rebouissou C, Wijdenes J, Autissier P, Tarte K, Costes V, Liautard J, *et al.* A gp130 interleukin-6 transducer-dependent SCID model of human multiple myeloma. *Blood* 1998 ; 91 : 4727-37.

[Copyright © 2007 John Libbey Eurotext - Tous droits réservés](#)