



**HAL**  
open science

## **FR $\alpha$ : a target for prophylactic photodynamic therapy of ovarian peritoneal metastasis?**

Henri Azais, Albert Moussaron, Soraya Khodja Bach, A. Bassil, Nacim Betrouni, Céline Frochot, Pierre Collinet, Serge Mordon

### **► To cite this version:**

Henri Azais, Albert Moussaron, Soraya Khodja Bach, A. Bassil, Nacim Betrouni, et al.. FR $\alpha$ : a target for prophylactic photodynamic therapy of ovarian peritoneal metastasis?. *Bulletin du Cancer*, 2014, 101 (12), pp.1109/1113. 10.1684/bdc.2014.1977 . hal-01183288

**HAL Id: hal-01183288**

**<https://hal.science/hal-01183288>**

Submitted on 9 Sep 2015

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

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

**FR $\alpha$  : Une cible pour la thérapie photodynamique prophylactique des  
métastases péritonéales ovariennes ?**

**FR $\alpha$  : A target for prophylactic photodynamic therapy of ovarian peritoneal  
metastasis ?**

Henri AZAÏS<sup>1,2</sup>, Albert MOUSSARON<sup>3</sup>, Soraya KHODJA BACH<sup>1,2</sup>, Alfred BASSIL<sup>1,2</sup>,  
Nacim BETROUNI<sup>1</sup>, Céline FROCHOT<sup>3</sup>, Pierre COLLINET<sup>1,2</sup>, Serge MORDON<sup>1</sup>

1- Unité INSERM U703, CHRU Lille, France.

2- Service de gynécologie, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille, France.

3- Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UMR 7274 CNRS - Université de Lorraine, France

*Thérapie photodynamique prophylactique ciblant FR $\alpha$*

**Contact**

**Henri Azaïs**

INSERM Unité 703

152, rue du Dr. Yersin

59120 LOOS - France

Mail : henriazais@gmail.com

Tel : 06 30 99 22 44

## Résumé

Le pronostic des cancers ovariens reste sombre, en particulier en raison du retard diagnostic. Les traitements actuels associent une chirurgie de cytoréduction maximale à l'utilisation de chimiothérapie à base de sels de platine. 60% des femmes en rémission à l'issue de ce traitement vont présenter une récurrence. Pour cette raison, une attention particulière est portée au traitement des métastases péritonéales. Il est admis en effet que le facteur principal de réduction des récurrences est l'absence de résidu tumoral en fin d'intervention.

Les thérapies ciblées ont pour objectif d'apporter au niveau de la cellule cible et du microenvironnement tumoral des produits d'imagerie, de chimiothérapie, de radiothérapie ou des photosensibilisateurs (PS). Parmi les cibles permettant d'atteindre les cellules tumorales ovariennes, l'isoforme  $\alpha$  du récepteur au folate (FR $\alpha$ ) est prometteuse dans la mesure où elle est surexprimée par la majorité des cancers épithéliaux de l'ovaire avec une bonne spécificité. Le nombre important de publications récentes à ce sujet montre l'intérêt porté à cette cible.

L'objectif de cette étude est de présenter FR $\alpha$  et de discuter les raisons pour lesquelles ce récepteur représente aujourd'hui une cible de choix pour les thérapies ciblées des carcinomes ovariens. La thérapie photodynamique prophylactique (PPDT) ciblée des lésions de carcinose péritonéale ovarienne utilisant un photosensibilisateur de nouvelle génération couplé au folate pourrait permettre, en complément de la chirurgie, de diminuer l'incidence des récurrences. Des études précliniques sont en cours avant de définir un protocole applicable en clinique humaine.

**Mots-Clés :** Cancer ovarien, Carcinose péritonéale, Thérapie photodynamique prophylactique, Thérapie ciblée, Récepteur au folate  $\alpha$ .

## Abstract

Partly due to delays in its diagnosis, ovarian cancer's prognosis remains dire after primary therapy. Treatment consists in complete cytoreductive surgery and platinum-based chemotherapy.

Recurrence rates are disappointingly high as 60% of women with advanced epithelial ovarian cancer considered in remission will develop recurrent disease within five years. Special attention to undetected peritoneal metastasis and residual tumorous cells during surgery is necessary as they are the main predictors of recurrences.

Targeted therapies aim to bring chemotherapy, radiotherapy and selective tumor photosensitizer (PS) agents to the targeted cell and its tumoral microenvironment. Folate receptor  $\alpha$  (FR $\alpha$ ) shows promising prospects in targeting ovarian cancerous cells. Indeed, with good specificity and frequent overexpression in ovarian cancer, FR $\alpha$  is a recurrent topic in recent publications.

The aim of this review is to present FR $\alpha$  and the reasons that make it an ideal targeting ligand for ovarian carcinoma therapy. Prophylactic photodynamic therapy (PPDT) using new generation FR $\alpha$ -coupled agents combined with complete cytoreductive surgery could allow for a significant decrease in recurrence rates. Preclinical trials are being run in order to allow for human clinical applications.

**Keywords:** Ovarian cancer, Peritoneal carcinomatosis, Prophylactic photodynamic therapy, Targeted therapy, Folate receptor  $\alpha$

## Introduction

Le pronostic des cancers ovariens reste sombre, en particulier en raison du retard diagnostic. Les traitements actuels associent une chirurgie de cytoréduction maximale à l'utilisation de chimiothérapie à base de sels de platine. 60% des femmes en rémission à l'issue de ce traitement vont présenter une récurrence (1). Pour cette raison, une attention particulière est portée au traitement des métastases péritonéales. Il est admis en effet que le facteur principal de réduction des récurrences est l'absence de résidu tumoral en fin d'intervention(2,3). Les métastases viscérales sont en effet très rares et la maladie est longtemps localisée à la cavité péritonéale. Le recours à la chimiothérapie hyperthermique intrapéritonéale, dont l'objectif est de traiter la cavité en diminuant la toxicité systémique des drogues utilisées, est toujours à l'étude dans le cancer de l'ovaire (4).

Les autres voies de recherche sont dominées par les thérapies ciblées dont l'objectif est d'apporter au niveau de la cellule cible et du microenvironnement tumoral des produits d'imagerie, de chimiothérapie, de radiothérapie ou des photosensibilisateurs (PS). Parmi les cibles permettant d'atteindre les cellules tumorales ovariennes, l'isoforme  $\alpha$  du récepteur au folate (FR $\alpha$ ) est prometteuse dans la mesure où elle est surexprimée par la majorité des cancers épithéliaux de l'ovaire avec une bonne spécificité. Le nombre important de publications récentes à ce sujet montre l'intérêt porté à cette cible.

Notre objectif est de réaliser la destruction ciblée par thérapie photodynamique prophylactique (PPDT) des microlésions de carcinose péritonéale qui sont ignorées lors de la chirurgie. Nous espérons ainsi diminuer l'incidence des récurrences locales qui concernent la majorité des patientes. Nous disposons d'un photosensibilisateur (PS), la tétraphénylporphyrine (TPP), couplée au folate (TPP-Fol).

L'objet de ce travail est de présenter FR $\alpha$  et l'intérêt qu'il représente actuellement en tant que cible pour le traitement des cancers ovariens, et en particulier pour la prise en charge des lésions de carcinose péritonéale par thérapie photodynamique.

## **Thérapie photodynamique ciblée prophylactique.**

Le concept de thérapie photodynamique antitumorale repose sur l'activation d'un photosensibilisateur par une lumière de longueur d'onde spécifique de ce dernier.

Le PS, ou un précurseur, est administré par voie intraveineuse, et va se concentrer dans les cellules cibles tumorales. Il est activé par l'exposition à une source lumineuse ce qui entraîne la formation d'espèces réactives de l'oxygène, en particulier d'oxygène singulet (courte durée de vie : environ 0.01- 0.004  $\mu$ s), molécule très réactive vis-à-vis des composants intracellulaires (certains organelles, comme les mitochondries et le réticulum endoplasmique). Seules les lésions accessibles à la lumière, et peu volumineuses peuvent bénéficier d'un tel traitement, la lumière ne pouvant pénétrer dans le tissu à plus de 10 mm de profondeur(5).

A ce jour, la plupart des travaux menés sur la thématique de la carcinose péritonéale ont eu recours à l'utilisation de protoporphyrine IX (PPIX), un PS endogène dont la synthèse tissulaire est stimulée par l'administration d'un précurseur (hémaminolévulinate). Nous avons constaté que cette technique permettait d'induire la nécrose des tissus cibles (6), mais que la spécificité suffisante du photosensibilisateur était responsable d'une mauvaise tolérance de la procédure et d'une morbi-mortalité importante du modèle animal (en particulier en raison de la toxicité hépatique) (donnés non publiées).

Un des enjeux principaux est donc de disposer d'un photosensibilisateur plus spécifique.

Nous disposons d'un photosensibilisateur de nouvelle génération, la tétraphénylporphyrine qui a été couplée au folate sur son groupe  $\gamma$ -carboxyl par l'intermédiaire d'un bras espaceur de polyéthylèneglycol (PEG). L'objectif de cette synthèse est d'associer les propriétés de photosensibilisateur de la porphyrine à une molécule d'adressage (folate) ciblant le récepteur

au folate FR $\alpha$  avec une forte affinité. Les formules moléculaires de l'acide folique, de la tétraphénylporphyrine (TPP) et du couple tétraphénylporphyrine-folate (TPP-Fol) sont représentées par la figure 1. Nous avons mis en évidence la bonne spécificité de ce PS pour les lésions de carcinose ovarienne sur modèle animal (données non publiées).

Il existe dans la littérature d'autres photosensibilisateurs utilisant un adressage par le folate. La tétraphénylporphyrine couplée au folate que nous utilisons (figure 1) a été décrite pour la première fois par Schneider et al. en 2005 (7). D'autres PS ont été couplés au folate, en particulier des chlorines (8–10). Ces couplages ont permis de montrer une meilleure sélectivité du PS pour la cible, une meilleure solubilité et une diminution de la cytotoxicité sur les tissus sains, mais également une amélioration de l'activité photodynamique de la molécule.

Le développement récent, en clinique humaine, de procédures utilisant la fluorescence et l'adressage par folate pour réaliser une chirurgie guidée des lésions de carcinose péritonéale ovarienne (11) nous incite à poursuivre nos travaux dans le but de proposer, en fin de chirurgie de cytoréduction maximale complète, une destruction prophylactique par PDT des microfoyers tumoraux qui restent inaccessibles à la chirurgie.

## **Acide folique et récepteur au folate : Généralités**

### ***Folate***

L'acide folique (folate, vitamine B9) est une vitamine hydrosoluble. Il est le précurseur métabolique d'une coenzyme, le tétrahydrofolate, impliquée notamment dans la synthèse des bases nucléotidiques, purines et pyrimidines, constituant des acides nucléiques (ADN et

ARN). A ce titre, le folate est essentiel au métabolisme des cellules, car il est indispensable pour la synthèse et la réparation de l'ADN. Les cellules normales et tumorales sont donc dépendantes du folate, en particulier pour les cellules à développement rapide (12).

Le folate est apporté par l'alimentation. Deux mécanismes permettent la capture du folate circulant par les cellules de l'organisme :

- Le RFC (*Reduced Folate Carrier*) est un transporteur ATP-dépendant dont l'expression est ubiquitaire et qui assure dans les conditions physiologiques normales la capture du folate par la plupart des cellules. Il lie le folate (sous forme réduite) avec une faible affinité et représente le plus souvent le seul type de récepteur au folate exprimé par la cellule(13,14).
- La famille des récepteurs au folate (FR) permet aux cellules d'internaliser l'acide folique (sous forme oxydée) dans des vésicules d'endocytose après fixation à un récepteur de forte affinité(15). Il existe trois isoformes de ce récepteur,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Chacune d'entre elle à une distribution tissulaire spécifique et une capacité différente à fixer le folate (14).

### **Récepteur au Folate $\alpha$ .**

L'isoforme  $\alpha$  (FR $\alpha$ ) est une glycoprotéine transmembranaire de poids moléculaire 38-40 kDa ancrée à la membrane des cellules par un glycosylphosphatidylinositol (GPI) (16). Son expression est hautement limitée au pôle apical des cellules épithéliales polarisées et elle n'est pas exposée au folate circulant(17). Elle est la plus étudiée des isoformes de FR (14).

Le récepteur fixe le folate puis le complexe est internalisé par endocytose dans le cytoplasme de la cellule. Le récepteur est recyclé secondairement à la surface de la cellule (17).



### ***Profil d'expression de FR $\alpha$ et cancer de l'ovaire***

FR $\alpha$  est surexprimé dans environ 40 % des tumeurs solides, en particulier dans les cancers d'origine épithéliale de l'ovaire, du sein, du rein, du poumon (17). 72 à 100 % des carcinomes ovariens le surexpriment(17–21), en particulier les carcinomes séreux (18). Selon Crane et al., ce récepteur est surexprimé par 81,8% des carcinomes séreux contre seulement 39,9% des carcinomes mucineux(22).

Le récepteur est absent de la majorité des tissus normaux (14,20). Il représente à ce titre une cible de choix pour les thérapies ciblées des carcinomes ovariens, d'autant plus qu'il a été montré que le profil d'expression du récepteur entre la lésion primitive et les localisations secondaires (péritonéales et ganglionnaires) est le même. De la même manière, les récurrences adoptent le même profil d'expression que la tumeur initiale (18).

O'Shannessy et al. ont récemment précisé la nature de l'expression de FR $\alpha$  par les organes du tractus génital féminin. Il semble que l'ovaire normal n'exprime pas FR $\alpha$  chez la femme, mais que l'épithélium tubaire normal l'exprime. Pour les auteurs, cela renforce l'hypothèse de l'origine tubaire des cancers ovariens et suggère que l'expression de FR $\alpha$  par les carcinomes ovariens provient davantage de l'origine des clones tumoraux qui exprimaient déjà le récepteur ce qui leur conférerait un avantage de prolifération, plutôt qu'une expression aberrante secondaire à leur transformation tumorale (21).

Il a également été montré que la chimiothérapie n'avait pas d'impact sur l'expression du récepteur par les lésions résiduelles, après comparaison de prélèvements avant traitement et lors d'une chirurgie d'intervalles ou de clôture (13,22).

Il est donc possible de faire le choix d'une thérapie ciblée dès les résultats d'une biopsie initiale et de poursuivre cette stratégie aux différentes étapes de la prise en charge des patientes.

L'expression de FR $\alpha$  pourrait également avoir un rôle pronostique. Certains auteurs affirment

que des taux élevés de FR $\alpha$  sont associés à une agressivité tumorale plus importante et par conséquent à un pronostic plus péjoratif(16,23,24). Pour d'autres auteurs, il n'existe pas d'association démontrée entre l'expression du récepteur et la survie globale ou sans récurrence, même si le récepteur est plus exprimé par les tumeurs de haut grades(13,22). Au contraire, une expression forte de RFC est associée avec un allongement de la survie globale et sans récurrence chez les patients qui surexprimentFR $\alpha$ (25).

*In vitro*, il semble que la surexpression du récepteur stimule la croissance cellulaire et participe à inhiber les phénomènes d'apoptose induits par les drogues cytotoxiques. Cela pourrait participer aux mécanismes de résistance aux produits de chimiothérapie(23,26). Le folate stimulerait par ailleurs la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion par une diminution de l'expression de la E-Cadherine(25). Cette diminution est associée à une survie diminuée et à une augmentation des métastases(27,28).

Enfin, l'alimentation et les apports en folate pourraient influencer l'expression du récepteur et donc avoir un impact sur les traitements qui l'utiliseraient comme cible, même si leurs influences semblent faibles (29). Il convient d'être vigilant lors de la supplémentation en folate proposée aux patients atteints d'un cancer (25).Le folate pourrait ainsi prévenir l'initiation du cancer d'une part en tant que cofacteur indispensable aux mécanismes de réparation de l'ADN, mais sa supplémentation pourrait d'autre part stimuler la progression de la maladie après son apparition.

### ***Thérapies ciblées par le folate***

L'adressage de molécule à visée diagnostique ou thérapeutique utilisant le récepteur au folate FR $\alpha$  fait l'objet de recherche depuis plus de 20 ans (30). La plupart des données concernant la délivrance de molécule par l'intermédiaire du folate proviennent d'études réalisées *in vitro*. Les données permettant son évaluation *in vivo* sont plus rares (15).

Le récepteur au folate est une des cibles les plus prometteuses pour le développement de thérapies ciblées pour le cancer de l'ovaire (31–33). Pour Sudimack et al, le folate possède une forte affinité pour le récepteur lorsqu'il est lié de manière covalente à la molécule transportée par son groupe  $\gamma$ -carboxyl (figure 1). Il rassemble de nombreuses qualités requises pour une molécule d'adressage, en particulier sa sélectivité démontrée (15). La petite taille de la molécule permettrait de conférer au conjugué de meilleures propriétés pharmacocinétiques, et réduirait son immunogénicité, permettant alors des administrations répétées. Il est facilement disponible et peu onéreux. La conjugaison de composés chimiques avec cette molécule est relativement simple. L'adressage vers un récepteur de haute affinité avec une expression faible en tissu normal et par conséquent une forte spécificité en raison d'un fort différentiel d'expression entre les tissus sains et la cible est possible. L'incorporation du composé se fait par endocytose ce qui peut faciliter l'administration cytosolique de l'agent (16). Enfin, il existe une large distribution du récepteur dans différents types de tumeurs, ce qui permet d'envisager d'autres champs d'application avec en particulier dans le domaine de la gynécologie, le cancer de l'endomètre (13).

Il existe donc de nombreuses applications prometteuses à visée diagnostique ou thérapeutique pour les cancers épithéliaux non mucineux. Pour être efficaces, ces stratégies imposent une connaissance de l'expression du récepteur par le tissu cible (13).

Il est possible d'adresser des produits de chimiothérapie ou radiothérapie sous la forme de nanoparticules adressées par folate. *In vitro* et *in vivo*, dans un modèle animal de carcinose péritonéale (modèle de souris NuNu avec inoculation de cellules issues de lignées de carcinomes ovariens humains), il a été montré que ces molécules étaient plus efficaces que les produits seuls sans adressage par folate (34).

Si le récepteur n'est pas utilisé pour l'internalisation de molécule d'intérêt, il peut être inhibé par l'administration d'un anticorps monoclonal humanisé de haute affinité, MORAb-003 ou Farletuzumab (31). Son administration inhibe *in vitro* la croissance cellulaire dépendante de

la présence du récepteur au folate (35) et active une réaction immunitaire à médiation cellulaire ou médiée par le complément contre les cellules exprimant FR $\alpha$ (36).

Récemment l'équipe de van Dam a publié la première intervention de résection chirurgicale de nodules de carcinose péritonéale ovarienne guidée par la fluorescence utilisant un marqueur fluorescent (Fluorescéine Isothiocyanate - FITC) couplé au folate (11) développé par le laboratoire Endocyte (Etats-Unis d'Amérique). Cette société participe également au développement d'une chimiothérapie (vinblastine) couplée au folate, le vintafolide, qui permettrait une amélioration de la survie sans récurrence des femmes résistantes aux sels de platine et présentant des lésions exprimant FR $\alpha$  (37). Cette molécule fait l'objet actuellement d'un essai de phase III international (38).

## **Conclusion.**

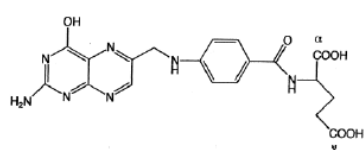
Le développement d'un photosensibilisateur de nouvelle génération ciblant les cellules de carcinose péritonéale ovarienne par l'intermédiaire du récepteur au folate  $\alpha$ , nous permet d'envisager le traitement de ces lésions par thérapie photodynamique prophylactique ciblée. Nous souhaitons proposer une stratégie innovante complémentaire de la chirurgie, permettant la destruction prophylactique des lésions microscopiques. Nous pensons ainsi réduire le volume tumoral résiduel en fin d'intervention, et par conséquent la fréquence des récurrences péritonéales. Des études précliniques sont en cours avant de définir un protocole applicable en clinique humaine.

**Conflit d'intérêt : Aucun**

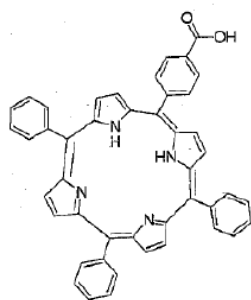
## Remerciement

Ce projet de recherche est soutenu par le SIRIC ONCOLille, financement INCa- DGOS-Inserm 6041.

Figure 1 : Formule moléculaire de l'acide folique, de la tétraphénylporphyrine et du couple tétraphénylporphyrine-folate.

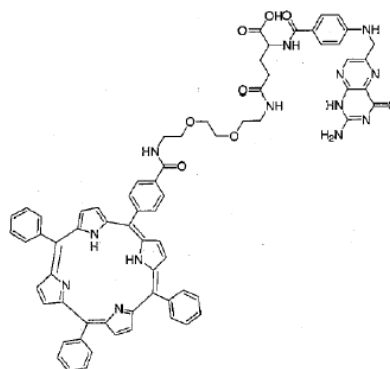


Acide Folique (AF)



Tétraphénylporphyrine (TPP)

$C_{45}H_{30}N_4O_2$   
Masse mol : 658 g/mol



Tétraphénylporphyrine-Folate (TPP-Fol)

$C_{70}H_{61}N_{13}O_8$   
Masse mol : 1211 g/mol

## Références

1. Al Rawahi T, Lopes AD, Bristow RE, Bryant A, Elattar A, Chattopadhyay S, et al. Surgical cytoreduction for recurrent epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;2:CD008765.
2. Eisenkop SM, Spirtos NM, Lin W-CM. "Optimal" cytoreduction for advanced epithelial ovarian cancer: A commentary. *GynecolOncol*. 2006 Oct;103(1):329–35.
3. Vergote I, Amant F, Kristensen G, Ehlen T, Reed NS, Casado A. Primary surgery or neoadjuvant chemotherapy followed by interval debulking surgery in advanced ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 2011 Sep;47, Supplement 3:S88–S92.
4. Elias D, Goéré D, Dumont F, Honoré C, Dartigues P, Stoclin A, et al. Role of hyperthermic intraoperative peritoneal chemotherapy in the management of peritoneal metastases. *Eur J Cancer* [Internet]. [cited 2013 Dec 15]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095980491300899X>
5. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin*. 2011 Aug;61(4):250–81.
6. Ascencio M, Delemer M, Farine MO, Jouve E, Collinet P, Mordon S. Evaluation of ALA-PDT of ovarian cancer in the Fisher 344 rat tumor model. *Photodiagnosis PhotodynTher*. 2007 Dec;4(4):254–60.
7. Schneider R, Schmitt F, Frochot C, Fort Y, Lourette N, Guillemin F, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. *Bioorg Med Chem*. 2005 Apr;13(8):2799–808.
8. Gravier J, Schneider R, Frochot C, Bastogne T, Schmitt F, Didelon J, et al. Improvement of meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin-like photosensitizer selectivity with folate-based targeted delivery. Synthesis and in vivo delivery studies. *J Med Chem*. 2008;51(13):3867–77.
9. Moret F, Scheglmann D, Reddi E. Folate-targeted PEGylated liposomes improve the selectivity of PDT with meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC). *PhotochemPhotobiol Sci*. 2013;12(5):823.

10. Li D, Li P, Lin H, Jiang Z, Guo L, Li B. A novel chlorin-PEG-folate conjugate with higher water solubility, lower cytotoxicity, better tumor targeting and photodynamic activity. *J PhotochemPhotobiol B*. 2013 Jul 9;127C:28–37.
11. Van Dam GM, Themelis G, Crane LMA, Harlaar NJ, Pleijhuis RG, Kelder W, et al. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- $\alpha$  targeting: first in-human results. *Nat Med*. 2011 Sep 18;17(10):1315–9.
12. Choi S-W, Mason JB. Folate and Carcinogenesis: An Integrated Scheme. *J Nutr*. 2000 Jan 1;130(2):129–32.
13. Despierre E, Lambrechts S, Leunen K, Berteloot P, Neven P, Amant F, et al. Folate receptor alpha (FRA) expression remains unchanged in epithelial ovarian and endometrial cancer after chemotherapy. *GynecolOncol*. 2013 Jul;130(1):192–9.
14. Antony AC. Folate Receptors. *Annu Rev Nutr*. 1996;16(1):501–21.
15. Leamon CP, Low PS. Folate-mediated targeting: from diagnostics to drug and gene delivery. *Drug Discov Today*. 2001 Jan 1;6(1):44–51.
16. Sudimack J, Lee RJ. Targeted drug delivery via the folate receptor. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000;41(2):147–62.
17. Parker N, Turk MJ, Westrick E, Lewis JD, Low PS, Leamon CP. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Anal Biochem*. 2005 Mar;338(2):284–93.
18. Kalli KR, Oberg AL, Keeney GL, Christianson TJH, Low PS, Knutson KL, et al. Folate receptor alpha as a tumor target in epithelial ovarian cancer. *GynecolOncol*. 2008 Mar;108(3):619–26.
19. Markert S, Lassmann S, Gabriel B, Klar M, Werner M, Gitsch G, et al. Alpha-folate Receptor Expression in Epithelial Ovarian Carcinoma and Non-neoplastic Ovarian Tissue. *Anticancer Res*. 2008 Nov 1;28(6A):3567–72.
20. Elnakat H, Ratnam M. Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004 Apr 29;56(8):1067–84.
21. O'Shannessy DJ, Somers EB, Smale R, Fu Y-S. Expression of folate receptor- $\alpha$  (FRA) in

- gynecologic malignancies and its relationship to the tumor type. *Int J GynecolPatholOff J IntSocGynecolPathol*. 2013 May;32(3):258–68.
22. Crane LMA, Arts HJG, Oosten M, Low PS, Zee AGJ, Dam GM, et al. The effect of chemotherapy on expression of folate receptor-alpha in ovarian cancer. *CellOncol*. 2011 Jun 7;35(1):9–18.
  23. Chen Y-L, Chang M-C, Huang C-Y, Chiang Y-C, Lin H-W, Chen C-A, et al. Serous ovarian carcinoma patients with high alpha-folate receptor had reducing survival and cytotoxic chemo-response. *MolOncol*. 2012 Jun;6(3):360–9.
  24. Toffoli G, Cernigoi C, Russo A, Gallo A, Bagnoli M, Boiocchi M. Overexpression of folate binding protein in ovarian cancers. *Int J Cancer*. 1997;74(2):193–8.
  25. Siu MKY, Kong DSH, Chan HY, Wong ESY, Ip PPC, Jiang L, et al. Paradoxical Impact of Two Folate Receptors, FR $\alpha$  and RFC, in Ovarian Cancer: Effect on Cell Proliferation, Invasion and Clinical Outcome. Ling MT, editor. *PLoS ONE*. 2012 Nov 7;7(11):e47201.
  26. Bottero F, Tomassetti A, Canevari S, Miotti S, Ménard S, Colnaghi MI. Gene Transfection and Expression of the Ovarian Carcinoma Marker Folate Binding Protein on NIH/3T3 Cells Increases Cell Growth in Vitro and in Vivo. *Cancer Res*. 1993 Dec 1;53(23):5791–6.
  27. Daraï E, Scoazec JY, Walker-Combrouze F, Mlika-Cabanne N, Feldmann G, Madelenat P, et al. Expression of cadherins in benign, borderline, and malignant ovarian epithelial tumors: a clinicopathologic study of 60 cases. *Hum Pathol*. 1997 Aug;28(8):922–8.
  28. Sawada K, Mitra AK, Radjabi AR, Bhaskar V, Kistner EO, Tretiakova M, et al. Loss of E-Cadherin Promotes Ovarian Cancer Metastasis via  $\alpha$ 5-Integrin, which Is a Therapeutic Target. *Cancer Res*. 2008 Apr 1;68(7):2329–39.
  29. Leamon CP, Reddy JA, Dorton R, Bloomfield A, Emsweller K, Parker N, et al. Impact of High and Low Folate Diets on Tissue Folate Receptor Levels and Antitumor Responses Toward Folate-Drug Conjugates. *J PharmacolExpTher*. 2008 Sep 5;327(3):918–25.
  30. Leamon CP, Low PS. Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis. *ProcNatlAcad Sci*. 1991 Jul 1;88(13):5572–6.
  31. Itamochi H, Kigawa J. Clinical trials and future potential of targeted therapy for ovarian cancer. *Int J ClinOncol*. 2012 Aug 28;17(5):430–40.



32. Kelemen LE. The role of folate receptor  $\alpha$  in cancer development, progression and treatment: Cause, consequence or innocent bystander? *Int J Cancer*. 2006 Jul 15;119(2):243–50.
33. Crane LMA, van Oosten M, Pleijhuis RG, Motekallemi A, Dowdy SC, Cliby WA, et al. Intraoperative imaging in ovarian cancer: fact or fiction? *Mol Imaging*. 2011 Aug;10(4):248–57.
34. Werner ME, Karve S, Sukumar R, Cummings ND, Copp JA, Chen RC, et al. Folate-targeted nanoparticle delivery of chemo- and radiotherapeutics for the treatment of ovarian cancer peritoneal metastasis. *Biomaterials*. 2011 Nov;32(33):8548–54.
35. Figini M, Ferri R, Mezzanzanica D, Bagnoli M, Luison E, Miotti S, et al. Reversion of transformed phenotype in ovarian cancer cells by intracellular expression of anti folate receptor antibodies. *Gene Ther*. 2003 Jun;10(12):1018–25.
36. Ebel W, Routhier EL, Foley B, Jacob S, McDonough JM, Patel RK, et al. Preclinical evaluation of MORAb-003, a humanized monoclonal antibody antagonizing folate receptor-alpha. *Cancer Immun J Acad Cancer Immunol [Internet]*. 2007 [cited 2013 Aug 5];7. Available from: [/pmc/articles/PMC2935753/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC2935753/?report=abstract)
37. Naumann RW, Coleman RL, Burger RA, Sausville EA, Kutarska E, Ghamande SA, et al. PRECEDENT: A Randomized Phase II Trial Comparing Vintafolide (EC145) and Pegylated Liposomal Doxorubicin (PLD) in Combination Versus PLD Alone in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *J ClinOncol*. 2013 Oct 14;JCO.2013.49.7685.
38. Razzak M. Gynaecological cancer: Vintafolide-targeting the folate receptor with a cytotoxic offers hope. *Nat Rev ClinOncol*. 2013 Dec;10(12):668.