

Anticorps monoclonaux et recombinants, 30 ans déjà...

par Emmanuelle Laffly* & Régis Sodoyer**

*LCCP, IBS, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 41, rue Jules Horowitz, F-38027 Grenoble, CEA.

**correspondant : Research Department, Sanofi Pasteur, Campus Merieux, 69280 Marcy l'Étoile, France.

Tél. : (+33)4 37 37 32 26. E-mail : regis.sodoyer@sanofi-pasteur.com

Reçu le 15 janvier 2007

RÉSUMÉ

La technologie des hybridomes, mise au point en 1975 par Kohler et Milstein, donnait accès pour la première fois à des anticorps monoclonaux. Ces outils révolutionnaires furent largement exploités en laboratoire durant les années qui suivirent, alors que leur utilisation *in vivo* restait très limitée. De nos jours, les anticorps, omniprésents dans les domaines de la recherche et du diagnostic, ont progressivement envahi le monde de la thérapie. Ce changement a

bénéficié de la mise en place ou de l'amélioration de techniques, telles que la présentation à la surface de bactériophages ou encore les souris transgéniques humanisées, permettant d'isoler directement des anticorps humains. Les différentes techniques d'obtention et d'ingénierie des anticorps, leur capacité à relever les nouveaux défis thérapeutiques et les derniers développements en matière de production à grande échelle seront abordés.

SUMMARY Monoclonal antibodies, 30 years of success...

The hybridoma fusion technology, proposed in 1975, gave for the first time an access to murine monoclonal antibodies. The high potential of these new molecules, as laboratory tools, was exploited during the two following decades. Nowadays, antibodies, still omnipresent in both diagnostic and research domains, have progressively invaded the therapeutic field. New technologies, such as phage display and transgenic mice, have been implemented, allowing for the isolation of fully human antibodies. The natural com-

plexity of the antibody molecules and the development of engineering methodologies helped making them ideal candidates for new applications and immunotherapeutic challenges. The present review is a temporary update of the different antibody-derived molecules as well as a walk-through among the techniques recently applied to antibody engineering. In addition it also address an important issue, such as the development of expression systems suitable large-scale production of recombinant antibodies.

Abbreviations:

AAR: anti-antibody response, Ab: antibody, ADCC: antibody-dependant cellular cytotoxicity, APC: antigen presenting cell, APEX: anchored periplasmic expression, BsAb: bispecific antibody, CAD: covalent antibody display, CDR: complementary determining regions, cGMP: current good manufacturing practice, CHO: chinese hamster ovary, EBV: Epstein-Barr virus, Fab: antigen-binding fragment, Fc: crystallisable fragment, FDA: Food and Drug Administration, H: Heavy chain, HACA: human anti-chimeric Ab, HAHA: human anti-humanized Ab, HAMA: human anti-mouse Ab, HCAb: Heavy chain antibody, HEK: Human embryo kidney, L: Light chain, mAb: monoclonal antibody, NAR: new antigen receptor, NK: natural killer, PBL: peripheral blood lymphocyte, PEG: polyethylene glycol, PSMA: prostate specific membrane antigen, scFv: single-chain Fv fragment, SCID: severe combined immunodeficiency, SIP: selectively infective phage, TNF: tumor necrosis factor, YAC: yeast artificial chromosome.

INTRODUCTION

A l'heure actuelle, une vingtaine d'anticorps à usage thérapeutique ont été approuvés par la FDA (US Food

and Drug Administration) (Tableau I) : trois sont d'origine murine, cinq chimériques, dix humanisés et deux totalement humains. Les anticorps représentent environ 30 % des produits pharmaceutiques et 75 % des produits recombinants en cours de développement. L'accroissement des marchés existants et l'ouverture de nouveaux marchés devraient permettre d'obtenir des chiffres d'affaires de l'ordre de 17 milliards de dollars à l'horizon 2008 (Riechert & Pavlou, 2004 ; Pavlou & Belsey, 2005). Plusieurs dizaines d'anticorps sont en phase d'évaluation clinique, parmi ceux-ci 55 sont des formes chimériques et au moins 40 d'origine totalement humaine. A ces molécules, il convient d'ajouter les formes conjuguées ainsi que les fragments d'anticorps. Les domaines de thérapie visés sont l'oncologie (Helguera & Penichet, 2005 ; Dela Cruz *et al.*, 2004 ; Stern & Herrmann, 2005), l'asthme, la transplantation, les domaines cardio-vasculaires, de l'inflammation, de l'auto-immunité et des maladies infectieuses (Casadevall *et al.*, 2004) ou encore de la protection contre des toxines animales (Juste *et al.*, 2007). Les anticorps ont également un fort potentiel dans

TABLEAU I. – Liste des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique, actuellement sur le marché.

Année	Nom	Cible	Type d'anticorps	Technologie	Indication	Société	DCI
1986	Orthoclone OKT, 3	CD3	IgG2a Murine	Hybridome	Rejet de transplant	Ortho Biotech	muromonab-CD3
1994	Reopro®	GpIIb/gpIIIa	Fab Chimérique		Maladie cardiovasculaire	Centocor/Eli Lilly	abciximab
1997	Rituxan®	CD20	Chimérique		Lymphome non hodgkinien	Biogen-IDEC	rituximab
1997	Zenapax®	CD25	IgG1 Humanisée		Rejet de transplant	Protein Design Labs	daclizumab
1998	Remicade®	TNF- α	IgG1 Chimérique		Maladie de Crohn	Centocor	infliximab
					Arthrite rhumatoïde		
1998	Simulect®	CD25	IgG1 Chimérique		Rejet de transplant	Novartis	basiliximab
1998	Synagis®	RSV	IgG1 Humanisée		Virus respiratoire syncytial	Medimmune	pavilizumab
1998	Herceptin®	Her-2	IgG1 Humanisée		Cancer du sein	Genentech	trastuzumab
2000	Mylotarg®	CD33	IgG4 Humanisée Conjugué toxique		Leucémie myéloïde aiguë	Wyeth	gemtuzumab
2001	Campath-1H®	CD52	IgG1 Humanisée	« Reshaping »	Leucémie lymphoïde chronique à cellules B	ILEX Pharmaceuticals	alemtuzumab
2002	Zevalin®	CD20	Murin		Lymphome non hodgkinien	Biogen-IDEC	ibrutumomab tiuxetan
2002	Humira®	TNF- α	IgG1 Humaine	Phage display	Arthrite rhumatoïde	Abott	adalimumab
				« guided selection »			
2003	Bexxar®	CD20	Murin conjugué iodé		Lymphome à cellules B non hodgkinien	Corixa	tositumomab
2003	Xolair®	IgE	IgG1 Humanisée	Phage display	Asthme, allergie	Genentech	omalizumab
2003	Raptiva™	CD11a	IgG1 Humanisée		Psoriasis	Genentech	efalizumab
2004	Erbix	EGFR	IgG1 Chimérique		Cancer colorectal	ImClone	cetuximab
2004	Avastatin	VEGF	IgG1 Humanisée	Greffe de CDR Mutagenèse dirigée	Cancer colorectal, cancers du sein, du poumon	Genentech	bevacizumab
2005	Tysabri	CD40	IgG4k Humanisée		Sclérose multiple	Elan /Biogen	natalizumab
2005	Lucentis	VEGF	Fab Humanisé		Dégénérescence néovasculaire		Ranibizumab
2005	Vectibix	EGFR	Humain		Cancer colorectal		Panitimumab

d'autres domaines tels que la détection (Shen *et al.*, 2005), la prévention (Dolk *et al.*, 2005) ou encore le traitement de problèmes liés à l'environnement (Drake *et al.*, 2003). Cette revue, essentiellement focalisée sur le potentiel thérapeutique des anticorps et des molécules dérivées, sera illustrée par les innovations techniques ayant vu le jour au cours des 30 dernières années.

ANTICORPS MONOCLONAUX : EN QUÊTE D'HUMANITÉ...

La méthodologie, décrite en 1975 par Georges J. F. Köhler et César Milstein (1975), était fondée sur l'immortalisation d'une cellule productrice d'anticorps, par fusion avec une cellule tumorale. Les hybridomes murins, ainsi créés, permirent la production à petite échelle d'anticorps monoclonaux dirigés contre une grande variété d'antigènes. Ces anticorps de première génération ont d'emblée montré quelques lacunes lors d'essais de thérapie : demi-vie très courte après injection, incapacité à recruter certaines fonctions effectrices et

surtout activation d'une réponse humaine anti-murine (HAMA, *human anti-mouse-antibody response*) en particulier lors de protocoles d'injections multiples (Schroff *et al.*, 1985). Ces problèmes ont récemment trouvé une solution au travers de stratégies permettant d'amoindrir, d'éviter ou de leurrer la réponse anti-murine. Ces techniques sont : la construction de chimères par fusion à des régions constantes humaines (Morisson *et al.*, 1984), l'humanisation (Jones *et al.*, 1986) et la dé-immunisation après masquage d'épitopes T (Roque-Navarro *et al.*, 2003 ; Mateo *et al.*, 2000).

Chimères

La construction de chimères se fait après substitution des régions constantes murines par leurs équivalents d'origine humaine. L'idée sous-jacente étant que la réponse de type HAMA est majoritairement focalisée sur ces régions et que les régions constantes humaines permettront, en outre, de rétablir le contact avec les cellules effectrices et la cascade du complément. Cette stratégie a permis une amélioration notable des effets théra-

peutiques d'anticorps tels que basiliximab (Simulect® : IgG1 anti-CD25) ou cetuximab (Erbix® : IgG1 anti-EGFR). Bien que les anticorps chimériques soient perçus comme moins immunogènes que les anticorps murins, une immunogénicité résiduelle (HACA, *human anti-chimeric antibody response*) plus ou moins prononcée a toutefois été observée. C'est en particulier le cas pour l'anticorps infliximab/Remicade® (Baert *et al.*, 2003).

Humanisation (Fig. 1)

L'humanisation implique, outre la permutation des régions constantes, la substitution des régions charpentes, au sein des domaines variables, par des équivalents humains. Dans la réalité, il s'agit le plus souvent d'une greffe de CDRs (*complementary determining regions*) sur les régions charpentes d'un anticorps humain. Différentes techniques peuvent être employées suivant la nature des séquences humaines utilisées comme support : celles-ci peuvent, en effet, être une structure cristallographique connue (Yazaki *et al.*, 2004 ; Riechmann *et al.*, 1988 ; Foote & Winter, 1992), des séquences germinales

réarrangées ou non (Tan *et al.*, 2002) ou enfin une séquence consensus (Carter *et al.*, 1992).

L'avantage d'utiliser une structure cristallographique connue est l'identification plus simple des résidus impliqués dans la liaison avec l'antigène (Graille *et al.*, 2005). Une autre stratégie, celle du "best fit" (meilleure adaptation), est basée sur le choix de la séquence humaine réarrangée ou germinale la plus proche de celle de l'anticorps murin. La méthode du consensus, quant à elle, fait appel à des séquences de régions charpentes de chaînes lourdes ou légères, dans lesquelles se trouve, à chaque position, l'acide aminé le plus fréquemment représenté au sein d'une même famille.

Quelle que soit la méthode retenue, une greffe de CDR ne permet généralement pas de retrouver les propriétés exactes de l'anticorps d'origine, sachant que certains résidus des charpentes peuvent interagir directement avec l'antigène ou exercer un effet à distance sur la conformation des CDRs (Foote & Winter, 1992). Pour corriger ce défaut, il est souvent nécessaire d'introduire des mutations supplémentaires pour retrouver l'affinité d'origine de l'anticorps pour sa cible. Ceci conduit à une situation

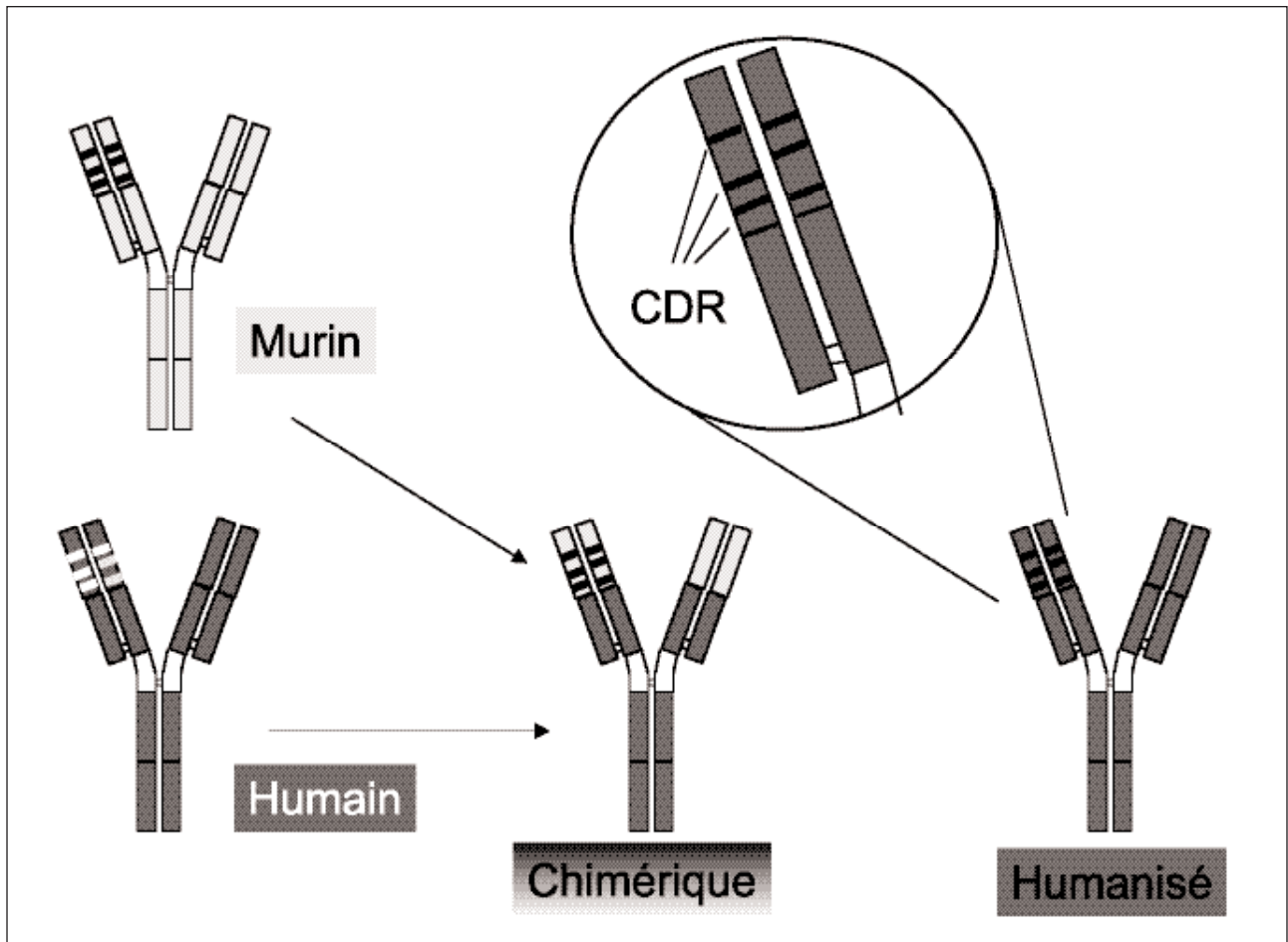


FIG. 1. – Anticorps sous formes chimérique et humanisée.

paradoxe, dans la mesure où ces nouvelles mutations sont potentiellement responsables d'une néo-antigénicité. Dans certains cas, une analyse fine permet de montrer que seul un petit nombre d'acides aminés d'un CDR est impliqué dans la liaison avec l'antigène (Padlan, 1994) et que le transfert de ces SDRs (*specificity determining residues*) sur un anticorps humain permet d'aboutir à une humanisation accompagnée d'une immunogénicité très limitée (Gonzales *et al.*, 2004). La méthode de polissage (*resurfacing*) proposée par Padlan (Roguska *et al.*, 1994; Padlan, 1991; Delagrave *et al.*, 1999) implique le remplacement de résidus des charpentes murines, exposés en surface, par des équivalents humains. Pour finir, la sélection guidée est une méthode d'humanisation entièrement basée sur les techniques de présentation à la surface de bactériophages (Jespers *et al.*, 1994; Baca *et al.*, 1997).

Bien qu'il soit possible d'éliminer presque totalement les séquences murines d'un anticorps humanisé, les observations cliniques récentes montrent que l'immunogénicité résiduelle peut être extrêmement variable (Cobleigh *et al.*, 1999; Ritter *et al.*, 2001). En tout état de cause, il semble difficilement imaginable qu'une absence totale d'immunogénicité pourra être atteinte, même avec des anticorps d'origine humaine. Il faudra, en effet, toujours prendre en compte les contributions des réponses anti-idiotypique (Clark, 2000) et anti-allotype.

Dans un tout autre domaine, la technique dite de DeImmunisation™ proposée par la société Biovation permet de supprimer certains épitopes T auxiliaires (*helper*), présents à l'intérieur de molécules recombinantes, parmi lesquelles sont répertoriés deux anticorps monoclonaux en phase clinique.

Anticorps de primates

Parallèlement aux approches précédemment décrites, il convient de citer l'existence d'anticorps obtenus après immunisation de primates. L'intérêt de ces animaux réside dans leur parenté génétique étroite avec les humains. Il n'existe, en effet, pas beaucoup plus de différences entre séquence d'anticorps de primates et séquences humaines qu'entre séquences humaines comparées entre elles (Newman *et al.*, 1992; Lewis *et al.*, 1993). Au moins trois anticorps, obtenus à partir de primates, sont actuellement en cours d'expérimentation clinique (Bugelski *et al.*, 2000; Reichert, 2004)

ANTICORPS HUMAINS (Weiner, 2006)

Les anticorps monoclonaux d'origine humaine ont par définition un grand potentiel thérapeutique. L'obtention d'hybridomes humains est cependant très délicate, ce qui explique la mise au point d'autres méthodologies telles que les souris transgéniques humanisées ou encore les banques combinatoires d'anticorps exprimées à la surface de bactériophages.

Hybridomes B humains

L'obtention d'hybridomes stables, à partir de cellules B humaines, est très délicate essentiellement par défaut d'un bon partenaire de fusion. Ceci peut éventuellement être corrigé en substituant aux myélomes humains des hétéromyélomes (hybrides humains – murins), mais ces derniers sont souvent instables. Une autre possibilité est l'immortalisation de cellules B après infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV). Les transformants ainsi obtenus sont parfois difficiles à cloner et souvent de mauvais sécréteurs d'anticorps (Karpas *et al.*, 2001). Le dernier frein à l'utilisation de la technique d'hybridomes humains est que leur répertoire ne contient pas d'anticorps dirigés contre les molécules du soi qui sont des cibles thérapeutiques majeures.

Des souris et des hommes

SOURIS SCID, ET TRANSGÉNIQUES HUMANISÉES

Des anticorps humains peuvent être obtenus après transfert d'un répertoire humain fonctionnel dans des lignées murines immunodéficientes telles les SCID (Severe Combined Immuno-Deficient), SCIDbg, ou $\gamma c^{-}/RAG2^{-}$.

Les souris SCID, dépourvues de cellules B et T matures, peuvent être «reconstituées» d'un point de vue immunologique après transfert de lymphocytes périphériques humains puis immunisées avec un antigène d'intérêt. Leurs performances sont toutefois affectées par la résurgence d'une immunité innée avec le temps, et plus particulièrement une activité *Natural Killer* (NK) qui compromet la greffe de cellules lymphoïdes humaines (Goldman *et al.*, 1998). Cet inconvénient est moins marqué avec les souris SCID-bg, partiellement dépourvues d'activité NK (Sawada-Hirai *et al.*, 2004) ou encore les lignées $\gamma c^{-}/RAG2^{-}$ qui en sont totalement exemptes.

SOURIS TRANSGÉNIQUES

Les souris transgéniques capables de réarranger des gènes codant pour des immunoglobulines humaines constituent une nouvelle source d'anticorps humains (Davis *et al.*, 2004). Ces lignées murines (XenoMouse®, HuMab® Mouse, Transchromo Mouse (TC) ont permis de montrer que la «machinerie cellulaire» murine pouvait s'accommoder de segments géniques humains et même accomplir le phénomène d'hypermutation somatique (Kellermann & Green, 2002).

Les lignées XenoMouse® produites par Abgenix (Fremont CA) ont été construites par inactivation des loci chaînes lourdes et chaînes légères κ murines suivie de l'apport de leurs équivalents humains portés par des chromosomes artificiels de levure (YAC) (Jakobovits, 1998; He *et al.*, 2002). Les premières lignées de XenoMouse® permettaient la commutation isotypique d'IgMs vers les trois sous-classes IgG1, IgG2 ou IgG4. Leur répertoire fut par la suite accru par ajout de la totalité du locus $Ig\lambda$. Bien que l'immunogénicité, chez l'homme, des anticorps issus de XenoMouse® soit généralement

très faible (Rowinski *et al.*, 2004 ; Foon *et al.*, 2004) une réponse marginale peut être observée. Celle-ci est due à la présence d'un résidu Gal α 1-3Gal (Lund *et al.*, 1993) fréquemment représenté chez les mammifères à l'exception des primates.

C'est la technique de transfert de minichromosomes humains qui a permis le transfert des loci des chaînes lourdes et chaînes légères κ humaines dans les souris Transchromo (TC) (Tomizuka *et al.*, 2000 ; Ishida *et al.*, 2002) produites par la Kirin Brewery Company (Japon). Les souris de ce type étaient capables de produire les isotypes IgG, IgA et IgM mais souffraient d'une instabilité du transchromosome portant le locus Igk. Le problème fut résolu par croisement de la souris Kirin TC avec une souris transgénique Medarex (YAC) portant environ 50 % du locus Igk. La nouvelle lignée obtenue, après cette union, fut logiquement baptisée KM.

BANQUES COMBINATOIRES DE FRAGMENTS D'ANTICORPS EXPRIMÉS À LA SURFACE DE BACTÉRIOPHAGES (Fig. 2)

La mise au point de systèmes de présentation à la surface de bactériophages a permis de s'affranchir des difficultés évoquées précédemment. Cette technique, mise au point à l'origine pour la présentation et la sélection de

peptides, a été adaptée aux fragments d'anticorps recombinants. Elle permet la sélection d'anticorps, au sein de vastes répertoires, et leur identification spécifique car il existe un lien entre la molécule exprimée et l'information génétique correspondante (Smith, 1985).

EXPOSITION À LA SURFACE DE BACTÉRIOPHAGES
(*PHAGE DISPLAY*)

Il s'agit d'une méthode générique de présentation de fragments d'anticorps et de criblage de ces mêmes entités. Des répertoires de fragments d'anticorps, de nature Fab ou scFv, sont exprimés en fusion avec une protéine de surface de bactériophage. Lors de l'étape de criblage, généralement nommée "*Biopanning*", seuls les bactériophages présentant un fragment d'anticorps interagissant avec l'antigène d'intérêt seront spécifiquement retenus, puis récupérés par élution. Une répétition du cycle de fixation permet d'enrichir la population spécifique en bactériophages porteurs de fragments d'anticorps possédant une affinité importante.

Différents types de répertoires

Les banques combinatoires d'anticorps changent de dénomination, en fonction de l'origine et la nature du

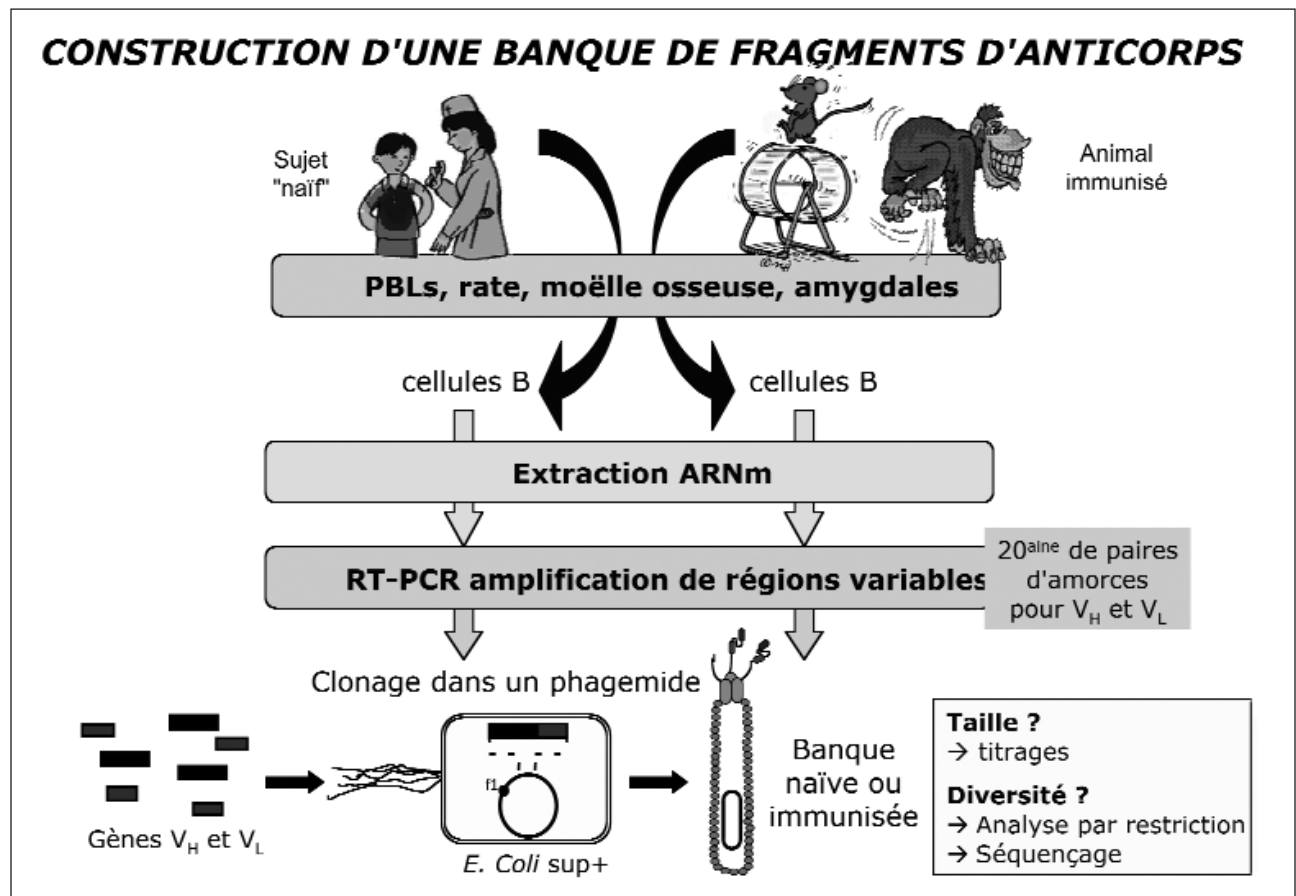


FIG. 2. – Méthode générale de construction de banques combinatoires de fragments d'anticorps.

matériel à l'origine de leur construction. Les banques naïves sont construites après clonage de régions variables d'anticorps issues de donneurs non-immunisés. L'utilité de ce type de répertoire est en relation directe avec la taille (ou complexité) obtenue. D'un point de vue théorique, il est permis de penser que l'on peut isoler des anticorps d'affinité raisonnable contre n'importe quel antigène à partir d'un répertoire dont la taille atteindrait 10^{10} ou 10^{11} éléments. Le facteur limitant la construction de très grands répertoires est l'étape de transformation bactérienne. Bien que la technique dite d'infection combinatoire ait proposé un moyen élégant de faire sauter ce verrou technologique (Waterhouse *et al.*, 1993; Geoffroy *et al.*, 1994), la plupart des répertoires de très grande taille décrits sont le fruit d'une accumulation fastidieuse de répertoires de plus petite taille (Vaughan *et al.*, 1996). Par définition, la complexité d'un répertoire est considérée au niveau ADN et définie par le nombre total d'associations V_H - V_L obtenues lors de la construction de la banque. Néanmoins, l'expérience prouve qu'il peut exister une différence entre diversité potentiellement codée et diversité véritablement exprimée. Plusieurs facteurs peuvent rendre compte de cette différence, entre autres : toxicité pour la bactérie hôte, repliement ou assemblage non-conformes, compétition entre protéines III du bactériophage fusionnées ou de type sauvage, protéolyse, etc.

Pour finir, il apparaît clairement que le problème majeur, lorsqu'un répertoire de grande taille a été construit, est son maintien au cours du temps et la capacité à contrôler la dérive inéluctable de son contenu. Le contenu d'un répertoire d'anticorps est, en effet, très variable au cours des préparations successives et de plus en plus envahi de clones remaniés possédant un avantage sélectif. Ceci peut expliquer la désaffection progressive pour ces répertoires universels de grande taille et la tendance à travailler avec des répertoires plus restreints, biaisés ou obtenus à partir de sujets préalablement immunisés. Parallèlement sont apparus des répertoires de grande taille dits « synthétiques » (Griffiths *et al.*, 1994; Knapik *et al.*, 2000) ou « semi-synthétiques » (Carlson & Soderlind, 2001). Ils sont construits à partir d'un petit nombre de régions charpentes, choisies pour leur capacité à être bien exprimées chez *E. coli*. Selon l'approche utilisée, les régions CDR peuvent être complètement artificielles ou isolées à partir de CDRs naturellement exprimés (Fig. 3).

Différents modes de présentation

Le bactériophage filamentueux M13 est de loin celui qui fut le plus sollicité pour la présentation de fragments d'anticorps. Les protéines majeures du manteau pIII et, dans une moindre mesure, pVIII sont les plus largement utilisées pour la construction de banques combinatoires. Néanmoins certains travaux font également mention de fusion aux protéines mineures pIX (Gao *et al.*, 2002) ou pVI (Jespers *et al.*, 1995).

Le potentiel d'un répertoire d'anticorps est en lien direct avec la complexité (nombre de clones qu'il contient) mais surtout l'efficacité avec laquelle ces clones seront

présentés à la surface du bactériophage. Des connaissances déjà établies, et de nouvelles études sur la structure de M13 et les mécanismes d'assemblage de ses protéines ont permis de faire évoluer le modèle d'origine (Sidhu, 2001).

La méthode de sélection de clones d'intérêt a, elle-même, bénéficié de nombreuses améliorations. C'est ainsi que trois groupes différents ont mis au point des modes de criblage permettant de créer un lien de dépendance entre reconnaissance de la cible et future capacité d'infection du bactériophage. Ces méthodes sont respectivement décrites comme : SIP (*Selectively Infective Phage*) (Krebber *et al.*, 1995), SAP (*Selection and Amplification of Phages*) (Duenas & Borrebaeck, 1994), et DIRE (*Direct Interaction REscue*) (Gramatikoff *et al.*, 1994).

La technique d'infection sélective (SIP) est basée sur le découpage de la protéine III en trois domaines fonctionnels : N1, N2 et CT. Le domaine N1, en position N-terminale, est essentiel pour l'infection de la bactérie. Le domaine CT est, quant à lui, indispensable pour la morphogénèse du bactériophage (Jung *et al.*, 1999). Le système SIP comprendra logiquement deux éléments : une particule de bactériophage non-infectieuse dans laquelle le domaine N1 de pIII est remplacé par un fragment d'anticorps et une molécule « adaptateur » constituée de l'antigène lié au domaine N1. La capacité de propagation du bactériophage se trouve donc intimement liée à l'association antigène-fragment d'anticorps (Krebber *et al.*, 1997).

Dans un tout autre domaine Lee *et al.* ont décrit la présentation de fragments Fab rendus divalents par l'association de séquences « *Leucine zippers* », ce qui constitue un moyen efficace de reproduire l'avidité naturelle d'un anticorps complet (Lee *et al.*, 2004).

Autres bactériophages et autres modes de présentation

Le bactériophage λ offre de multiples possibilités de présentation, autant à l'extrémité C-terminale de sa protéine pV qu'en fusion N- ou C-terminale avec la protéine D de la capsid. D'autres bactériophages, de morphologie voisine, tels T4 ou T7 ont été utilisés de façon similaire (Ren & Black, 1998).

D'autres travaux font état de présentation de fragments d'anticorps à la surface de bactéries (Samuelson *et al.*, 2002) ou de levures, essentiellement *Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae*. Ces nouveaux formats de présentation permettent une ouverture vers de nouvelles applications telles que l'apport d'une immunothérapie passive directe sur des muqueuses (Cano *et al.*, 2000). En outre la taille relativement importante, toutes proportions gardées, des bactéries et des levures, donne accès à des méthodes de criblage par cytométrie de flux (Feldhaus & Siegel, 2004).

« In vitro veritas »

L'une des limites des systèmes de sélection *in vivo* est la taille des répertoires que l'on peut espérer obtenir et manipuler facilement, celle-ci est, pour des raisons techniques, limitée à des chiffres de l'ordre de 10^9 pour une

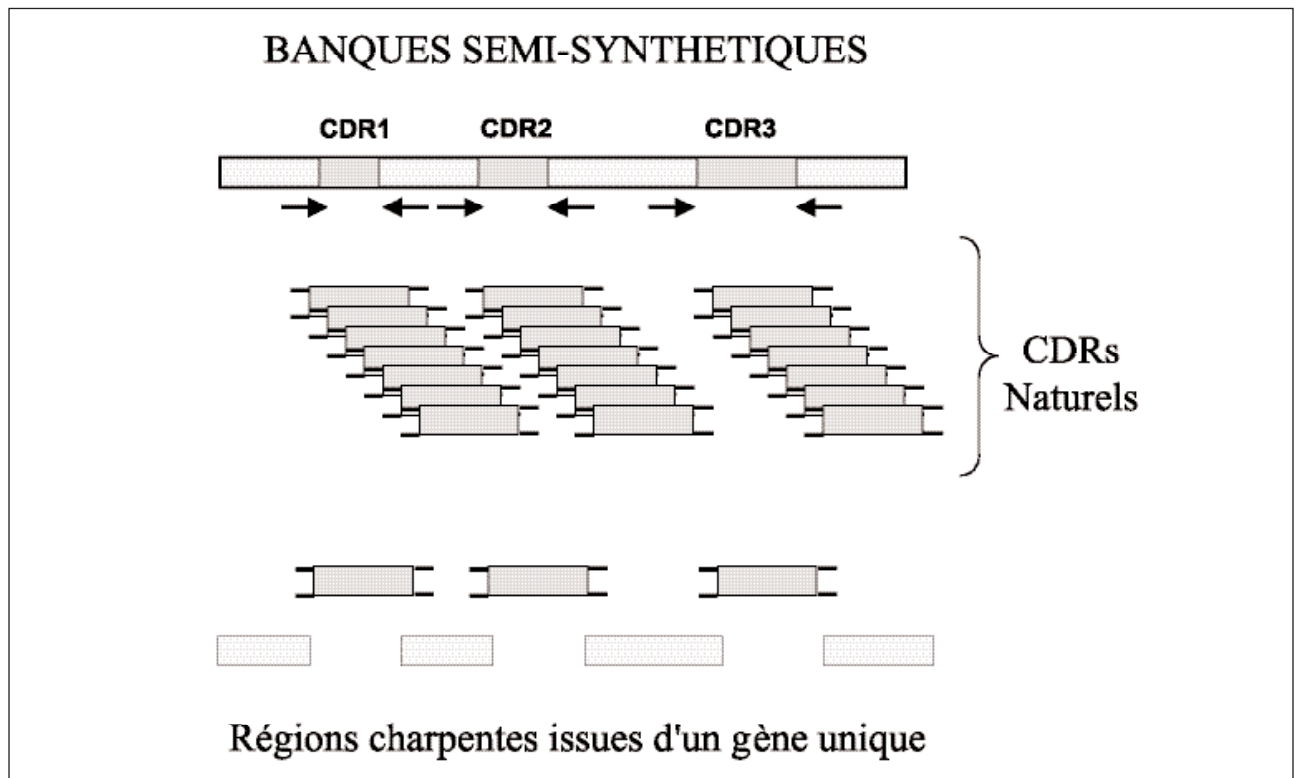
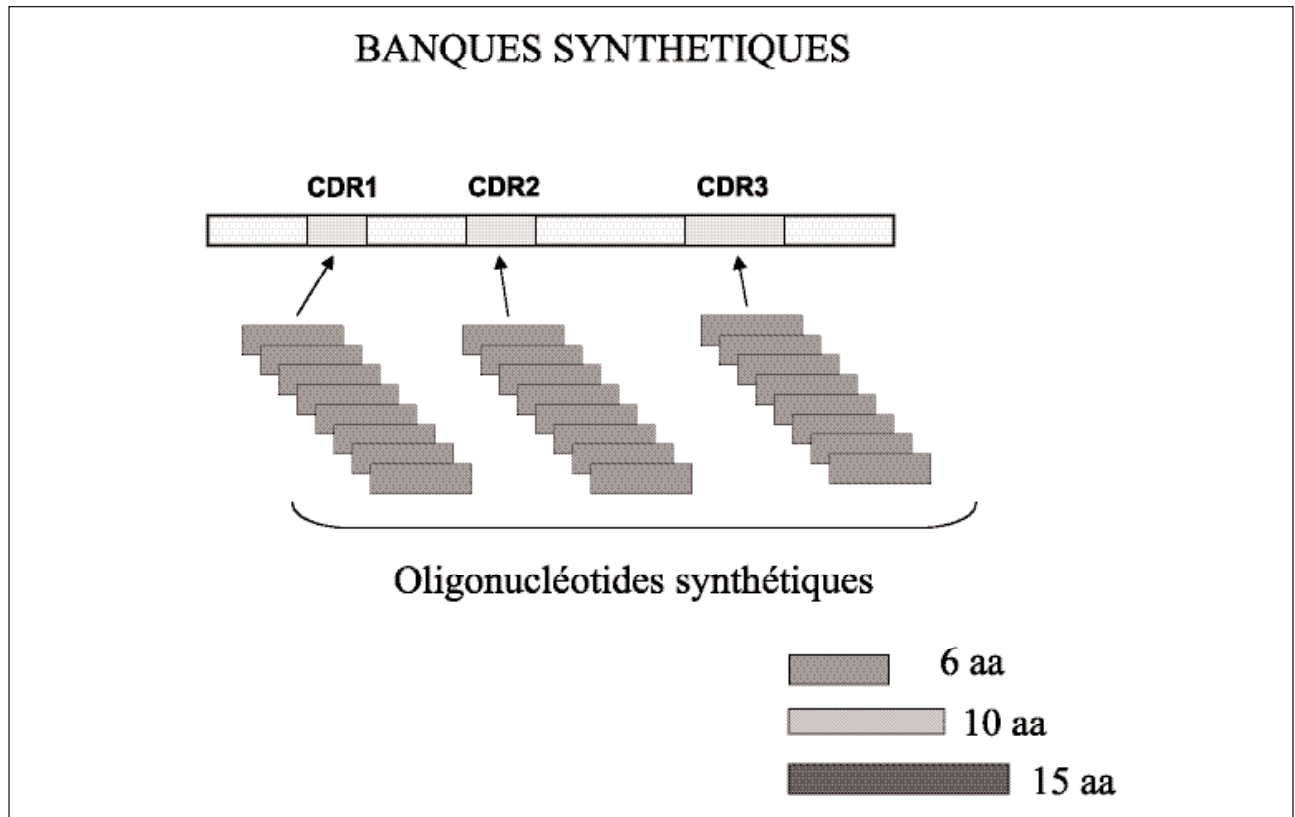


FIG. 3. – Construction de banques combinatoires «synthétiques» et «semi-synthétiques».

étape individuelle de transformation bactérienne. Les méthodes *in vitro* les plus représentées actuellement sont le *ribosome display* (Groves & Osbourn, 2005 ; Rothe *et al.*, 2006) et le *mRNA display* (Hanes *et al.*, 2000) toutes deux issues d'une idée proposée par G. Kawasaki (Brevet US n° 5,643,768 et brevet US n° 5,658,754) (Fig. 4).

Les caractéristiques intrinsèques des répertoires de fragments d'anticorps *in vitro* offrent de multiples avantages :

- ils sont par définition propres à l'automatisation ;
- les réactions de RT-PCR appliquées entre chaque cycle de sélection peuvent être conduites dans des conditions favorisant les mutations, ce qui permet d'augmenter artificiellement la diversité (Hanes *et al.*, 2000 ; Jeremius *et al.*, 2001) ;
- le criblage peut avoir lieu dans des conditions non-physiologiques telles qu'à température élevée ou encore dans un environnement très salin ou dénaturant (Jeremius *et al.*, 2001).

En marge des deux systèmes précédents ont été développées un certain nombre d'approches :

– Le CAD (*Covalent Antibody Display*) basé sur la fusion avec la protéine de bactériophage P2A qui fixe de façon covalente son propre ADN (Reiersen *et al.*, 2005) ;

– le *Polysome Display*, qui met en œuvre une interaction entre une forme dimère de la protéine d'enveloppe MSp du bactériophage MS2 et un motif de fixation spécifique porté par son ARN (Sawata & Taira, 2001).

L'ANTICORPS DANS TOUS SES ÉTATS

Fragments d'anticorps

Pour de nombreuses applications thérapeutiques, la fixation de récepteurs Fc n'est pas toujours requise, c'est en particulier le cas lors d'inactivation de cytokines, blocage de récepteurs ou encore neutralisation virale. C'est pourquoi l'emploi de fragments d'anticorps peut s'avérer, dans certains cas, plus pertinent. La réduction de taille peut, en outre s'accompagner d'une plus grande capacité de pénétration de tissus ou d'une meilleure bio-

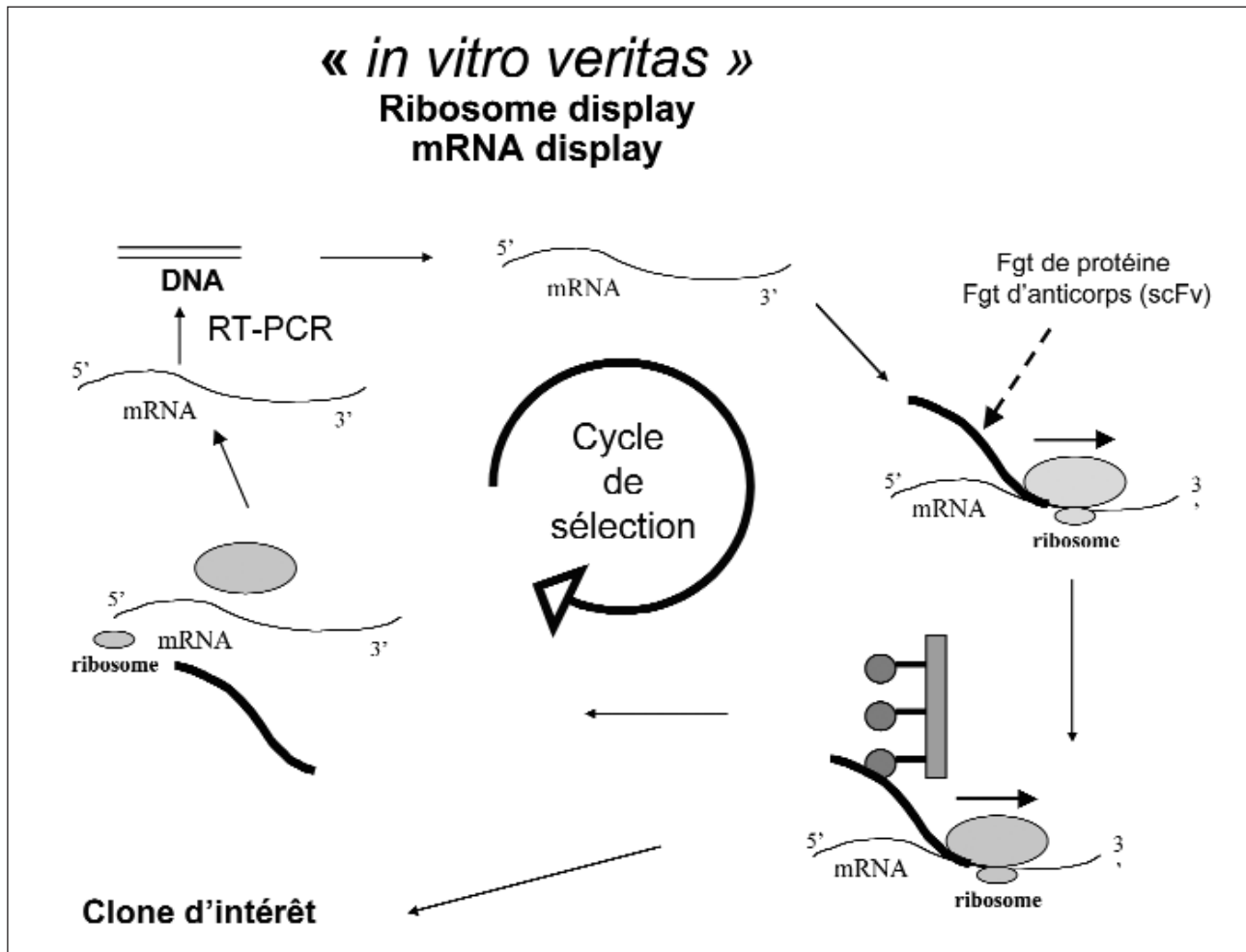


FIG. 4. – Principe général de la technologie “*Ribosome Display*”.

distribution. De plus, les fragments d'anticorps de petite taille (Fab, scFv) sont généralement plus faciles à produire dans des systèmes procaryotes ou levures, ce qui permet de s'affranchir des inconvénients et coût associés aux systèmes de cultures cellulaires à grande échelle.

Le fragment Fv, formé par l'association des régions variables V_L et V_H des chaînes légère (L) et lourde (H) peut être produit sous forme monocaténaire après liaison des 2 chaînes par un lien peptidique flexible, la molécule ainsi obtenue est un scFv (single chain Fv). La variation de taille du lien flexible permet de l'oligomérisation des molécules de scFv. Ainsi peuvent être obtenus des di-, tri- ou tétra-bodies possédant une même spécificité, avec des valeurs d'avidité croissantes (Iliades *et al.*, 1997). Les diabodies, de loin les plus représentés, se sont régulièrement montrés supérieurs à leurs équivalents scFv dans de nombreuses études pré-cliniques (Todorovska *et al.*, 2001).

Le fragment Fab (fragment antigen binding) est un hétérodimère associant V_H-C_{H1} et V_L-C_L par un pont disulfure. Fab et scFv possèdent, par comparaison à l'anticorps entier, des propriétés pharmacocinétiques et de pénétration de tissus plus favorables. En revanche, leur nature monovalente s'accompagne de constantes de dissociation plus élevées.

La demi-vie d'un fragment d'anticorps peut être augmentée après couplage à une ou plusieurs molécules de polyéthylène glycol (PEG). La «*PEGylation*» (Chapman *et al.*, 1999) de l'anti-TNF, CDP 870, sur la région charnière a permis d'augmenter sa demi-vie jusqu'à 14 jours. Cette modification peut apporter, en outre, une solubilité accrue, une meilleure résistance vis-à-vis de la protéolyse, et même un masquage partiel de l'immunogénicité (Chapman, 2002). Les travaux de Kitamura *et al.* (1990) ont mis en évidence la diminution de la réponse de type HAMA sur un anticorps murin *PEGylé*.

Anticorps bispécifiques

Les anticorps bispécifiques (BsAb) ont la capacité de lier entre elles différentes cellules ou molécules. Les méthodes décrivant l'obtention de telles formes moléculaires sont nombreuses : hybridomes hybrides ou «*quadromes*» (Suresh *et al.*, 1986), couplages chimiques, ou encore fusions génétiques permettant d'associer plusieurs fragments de type Fab.

Les techniques les plus récentes font appel à des domaines moléculaires qui ont une propension à l'auto-assemblage telles les hélices α amphipathiques (de Kruijff & Logtenberg, 1996), les structures de type coil-coil, les domaines constants d'anticorps (Hu *et al.*, 1996) et les molécules ou domaines moléculaires naturellement homomultimériques. Le choix des partenaires semble illimité ; une bonne illustration est le couple formé par la ribonucléase procaryote Barnase et son inhibiteur naturel Barsstar (Deyev *et al.*, 2003) caractérisé par une très forte constante d'association ($10^{14} M^{-1}$).

Anticorps conjugués ou «*armés*»

Anticorps et fragments d'anticorps ont été associés à une grande variété d'effecteurs ou d'activateurs tels

radioéléments, toxines, drogues, enzymes activatrices de pro-drogues ou encore cytokines capables de stimuler une réponse anti-tumorale.

CIBLAGE ET DESTRUCTION DE CELLULES TUMORALES

Le principe consiste à cibler, à l'aide d'anticorps couplés, les antigènes marqueurs spécifiques de tumeurs ou les antigènes exprimés de façon différentielle sur le réseau vasculaire irriguant les tumeurs. Des monoclonaux couplés à une drogue (calicheamicin, Mylotarg[®], Wyeth) ou un radioélément (Zevalin[®]) sont capables de livrer leur effecteur directement sur les cellules cancéreuses, diminuant ainsi la toxicité caractéristique d'une administration systémique. D'autres exemples d'immunotoxines sont l'association de fragments d'anticorps avec des formes entières ou tronquées de toxines bactériennes (e.g. *Pseudomonas* exotoxin, ricin A chain) (Reiter & Pastan, 1998).

ACTIVATION D'UNE RÉPONSE ANTI-TUMEUR

La régression de tumeurs a pu être observée à la suite de l'administration de molécules de fusions entre anticorps et cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-12 or IL-2) (Dela Cruz *et al.*, 2004). Ces «*Immuncytokines*» sont, en effet, capables d'activer une réponse locale anti-tumeur.

ACTIVATION ENZYMATIQUE DE PRO-DROGUES (ANTIBODY-DIRECTED ENZYME PRODRUG THERAPY ADEPT)

Le principe de l'ADEPT (Xu & McLeod, 2001) repose sur l'administration d'un anticorps capable de véhiculer une activité enzymatique sur le site d'une tumeur ; cette administration est suivie par celle d'une pro-droque qui ne sera transformée en composé actif qu'à proximité immédiate de la tumeur (Sharma *et al.*, 2005 ; Henry *et al.*, 2004 ; Arditti *et al.*, 2005 ; Law *et al.*, 2004). Une immunoenzyme récemment décrite se compose d'un fragment d'anticorps de type diabody et d'une ribonucléase de *Rana pipiens* (Krauss *et al.*, 2005).

Autres espèces, autres anticorps, autre profil de reconnaissance

Les anticorps monoclonaux ainsi que les fragments dérivés possèdent un paratope formé de 6 boucles CDR, cette organisation particulière permet la reconnaissance d'une grande variété moléculaire. Cette capacité de reconnaissance n'est cependant pas universelle et a révélé son inaptitude à la reconnaissance de structures particulières telles que les cavités moléculaires. La fixation spécifique de cavités ne peut se faire efficacement que par l'intermédiaire de boucles pénétrantes qui sont peu représentées dans le répertoire naturel des anticorps de mammifères (Hudson & Souriau, 2003). Les camélidés possèdent des familles d'anticorps naturellement dépourvus de chaînes légères (*heavy-chain antibodies* ou HCAs) (Hammer-Casterman *et al.*, 1993). Les anticorps monocaténaires de camélidés ne possèdent pas de

domaine C_{H1} et leur domaine variable (VHH) codé par différents gènes V possède un CDR3 de taille très importante (jusqu'à 24 résidus chez le Lama) parfaitement adapté à la fixation de cavités moléculaires (Holt *et al.*, 2003). Les fragments d'anticorps de Camélidés sont de plus extrêmement stables et faciles à produire dans des systèmes *Escherichia coli* ou Levures.

A partir de ces données et en utilisant le principe inverse, la société Domantis a créé des banques d'anticorps V_H et V_L humains monocaténaïres, le potentiel thérapeutique de ces anticorps humains « camélisés » sera prochainement évalué.

Récemment un isotype d'anticorps baptisé “*immunoglobulin isotype novel antigen receptor*” (IgNAR) a été isolé à partir du sérum d'un requin (*Ginglymostoma cirratum*). Il s'agit également d'un homodimère de chaîne lourde naturellement dépourvu de chaîne légère. Cet anticorps est formé de cinq domaines constants et d'un domaine variable comprenant deux régions analogues à des CDRs (Nuttall *et al.*, 2001 ; Nuttall *et al.*, 2003). Une banque de régions variables NAR a été construite et exprimée à la surface de bactériophages, puis validée par sélection de fragments capables de reconnaître spécifiquement l'antigène “Apical Membrane Antigen-1” (AMA1) de *Plasmodium falciparum* (Nuttall *et al.*, 2004).

De nouveaux partenaires de présentation

MOTIF RÉPÉTÉ D'ANKYRINE

Certains caractères structuraux des motifs répétés d'ankyrine permettent d'envisager l'utilisation de cette molécule pour construire des banques de paratopes (Kohl *et al.*, 2003). La molécule ankyrin repeat (AR) est, en effet, une structure compacte composée de régions charpentées auxquelles il est possible d'associer des boucles autorisant une grande variabilité (Binz *et al.*, 2003). L'avantage de ces structures minimales est leur caractère monomérique, leur faible poids moléculaire, leur absence de ponts disulfure et leur grande solubilité qui en font des outils faciles à manipuler et à produire dans des hôtes simples.

ANTICALINE ET DUOCALINE

Le principe est en tout point identique à celui évoqué précédemment, seule change la structure porteuse de boucles hypervariables ; elle est ici dérivée de l'apolipoprotéine D. Les lipocalines sont des molécules monocaténaïres présentant un jeu de quatre régions hypervariables (Schlehuber & Skerra, 2002 ; Schlehuber & Skerra, 2005). Schlehuber & Skerra (2001) ont également proposé une évolution associant deux anticalines et portant logiquement le nom de duocaline.

PEPBODIES

Il s'agit d'un type particulier de fusion dans lequel des fragments d'anticorps de petite taille, scFv ou Fab, sont associés à un peptide capable de fixer le composé C1q de

la cascade du complément. De telles molécules possèdent les caractéristiques de reconnaissance spécifique et de recrutement de fonctions effectrices d'un anticorps complet, dans un format très réduit (Lunde *et al.*, 2002).

Intrabodies et Transbodies

INTRABODIES (Popkov *et al.*, 2005 ; Stocks, 2005)

Les anticorps possédant un spectre d'action intracellulaire, également appelés Intracorps, sont généralement des scFv (Auf der Maur, 2002) ou dAbs (Tanaka *et al.*, 2003) produits dans un environnement cellulaire. Ils ont bénéficié d'un intérêt croissant au cours des dernières années en tant que molécules thérapeutiques pour, en particulier, cibler des antigènes tumoraux (Jendreyko *et al.*, 2005) ou encore agir comme modulateurs d'expression. L'inconvénient majeur associé aux *intrabodies* est leur instabilité et parfois leur insolubilité dans un environnement cytoplasmique. Le milieu intracytoplasmique, réducteur par nature, est peu propice à la formation de ponts disulfures intra-moléculaires qui sont le préalable requis pour un assemblage correct (Auf der Maur, 2004). Ce défaut d'assemblage entraîne le plus souvent une faible activité du fragment d'anticorps à l'intérieur de la cellule, c'est pourquoi un certain nombre d'approches ont été proposées pour pallier cet inconvénient.

En particulier celle du groupe de Auf der Maur, qui propose un « contrôle qualité » dans lequel des régions charpentées sont pré-sélectionnées en fonction de leur stabilité et solubilité (Auf der Maur, 2004). Des banques de boucles hypervariables sont, par la suite associées à ces régions charpentées adaptées à un environnement intracellulaire.

La technique de “*Intracellular antibody capture*” (IAC) (Visintin *et al.*, 2004) fait appel à deux sélections successives de scFv : la première est conduite *in vitro*, alors que la seconde implique une interaction *in vivo* dans un système levure.

TRANSFERT GÉNÉTIQUE D'ANTICORPS

Bakker *et al.* (2004) ont montré récemment que le procédé d'immunisation à l'aide d'ADN était une approche pertinente dans le domaine de l'immunothérapie passive. Il est, en effet, possible d'induire une réponse anticorps dirigée contre un pathogène par simple transfert d'ADN *in vivo*.

TRANSBODIES

Heng & Cao (2005) ont proposé l'hypothèse selon laquelle des scFv fusionnés à des domaines de transduction (PTD), pourraient subir une translocation à travers la membrane cellulaire et être directement internalisés dans le cytosol. Ces anticorps à perméabilité cellulaire accrue ou *Transbodies* auraient l'avantage d'avoir subi un assemblage de ponts disulfures et un repliement correct avant leur passage en fraude à l'intérieur de la cellule. Ces nouveaux outils se positionnent comme substitués des intracorps classiques et comme compétiteurs

potentiels de régulateurs d'expressions tels que les siRNA.

ANTICORPS ET VACCINATION

Manipulation du réseau idiotypique

L'immunisation à l'aide d'anticorps anti-idiotypique (Id) s'inscrit dans le cadre de l'immunothérapie active (Bendandi, 2004; Bhattacharaya-Chatterjee *et al.*, 2000). Un anticorps anti-idiotypique mime potentiellement la structure tridimensionnelle d'un antigène et porte son « image interne » (Fields *et al.*, 1995). Un vaccin basé sur ce principe ne contient ni l'antigène d'origine, ni l'un de ses fragments et par conséquent se trouve dépourvu de tout effet toxique ou indésirable potentiellement associé à l'antigène d'origine. La vaccination à l'aide d'anti-idiotypique a souvent été proposée comme un moyen capable de briser la tolérance immunitaire qui complique le traitement de certains cancers (Bhattacharya-Chatterjee *et al.*, 2000).

Anticorps véhiculant un antigène

Les anticorps dits « antigénisés » contiennent des épitopes à intérêt vaccinal à la place de leurs boucles CDR (Zanetti, 1992). Ces vecteurs possèdent le double avantage théorique de focaliser la réponse immunitaire sur un nombre restreint d'épitopes issus d'un antigène et de leur conférer une demi-vie prolongée. Musselli *et al.* (2004) ont ainsi montré qu'il était possible d'atténuer de façon significative l'encéphalomyélite allergique expérimentale à la suite d'une immunisation avec des anticorps portant les peptides dérivés du récepteur des cellules T, éléments clés dans la régulation de cette pathologie.

TROYBODIES (ANTICORPS CHEVAUX DE TROIE)

Les *Troybodies* sont tout simplement des anticorps ciblant spécifiquement des cellules présentatrices d'antigènes (APC) et contenant des épitopes T cachés au sein de boucles du domaine C_{H1} de leurs régions constantes. La difficulté étant d'insérer ces peptides sans que leur séquence ne perturbe le repliement naturel de cette région de l'anticorps. La reconnaissance par l'anticorps permet un passage clandestin des peptides, à l'intérieur de la cellule. Les épitopes T peuvent, par suite être libérés et présentés aux lymphocytes T CD4⁺ associés aux antigènes de classe II du CMH, et induire une activation cellulaire (Lunde *et al.*, 2002; Lunde *et al.*, 2001).

ANTICORPS CATALYTIQUES

Parmi les multiples facettes de la molécule anticorps, l'une des plus inattendues est la capacité à mettre en œuvre une activité catalytique. Que l'activité catalytique ou plus généralement l'activité enzymatique portée par certains anticorps soit une propriété naturelle bénéfique ou une dérive fortuite reste à établir (Nevinsky *et al.*, 2000). La littérature fait largement état d'anticorps catalytiques associés, ou du moins présents lors de situations pathologiques telles que les maladies auto-immunes. En revanche, d'autres auteurs ont mis en avant le rôle bénéfique d'anticorps catalytiques qu'ils qualifient d'enzymes

défensives (Paul *et al.*, 2005). Une activité de type Sérine protéase est souvent associée aux anticorps catalytiques naturels (Lacroix-Desmazes *et al.*, 2005) et le support de cette activité a pu être attribué à la chaîne légère de l'anticorps (Mitsuda *et al.*, 2005).

Les anticorps catalytiques présentent un potentiel thérapeutique, en théorie, très prometteur, qu'il s'agisse de lutte anti-virale, inactivation de composés toxiques ou encore pour l'activation de pro-drogues. Dans ce dernier cas, l'avantage serait de disposer d'un catalyseur perçu comme une molécule du soi, et peu susceptible de déclencher une forte réponse immunitaire.

D'intéressants travaux visant à obtenir des anticorps capables de métaboliser la cocaïne en une substance inerte ont été proposés (Larsen *et al.*, 2004; Homayoun *et al.*, 2003). L'activité de tels anticorps, bien que spécifique, est cependant encore trop réduite pour envisager d'en faire de véritables effecteurs thérapeutiques.

L'obtention d'anticorps possédant une activité catalytique importante semble encore un objectif ambitieux, les raisons qui peuvent rendre compte de la difficulté sont les suivantes :

- l'activité catalytique d'un anticorps repose sur sa capacité à stabiliser, par complémentarité de structure, l'état de transition moléculaire d'une réaction chimique qui est, par définition, une structure éphémère très instable. La première difficulté est donc d'obtenir, par synthèse chimique, un haptène qui sera un analogue de l'état de transition, c'est-à-dire une molécule stable dont la structure tridimensionnelle est très semblable à celle d'une entité instable (Xu *et al.*, 2004);

- la seconde difficulté consiste à mettre en œuvre un système de criblage capable de sélectionner une activité catalytique, ce qui est très différent des modèles classiques basés sur une affinité de liaison. Une réponse possible est l'utilisation de molécules dont les propriétés de fluorescence sont altérées après catalyse (Meijler *et al.*, 2005).

PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

L'usage clinique d'anticorps monoclonaux implique la mise à disposition de quantités importantes, voire très importantes. Cette nouvelle donnée a servi de moteur essentiel pour l'amélioration de systèmes d'expression existants et la mise au point de nouveaux systèmes. L'objectif est très ambitieux car il doit tenir compte du repliement correct de la molécule, de son profil de glycosylation et de contraintes de coût de production. Le choix du système sera guidé par le format (anticorps complet, fragment mono- ou multi-valent) le domaine d'application (thérapie, diagnostic, recherche), la taille du marché considéré et les aspects réglementaires...

Systèmes procaryotes

Les modèles bactériens peuvent convenir pour l'expression de petits fragments tels les Fab ou scFv, la molécule

peut être produite sous forme d'agrégats intra-cytoplasmiques, exportée sous forme soluble dans le périplasma ou encore sécrétée dans le surnageant de culture.

E. COLI (Fernandez, 2004)

Le rendement en protéine correctement repliée est *a priori* imprévisible et dépendant de la séquence primaire. Le plus souvent les fragments d'anticorps sont exprimés en fusion avec une séquence signal qui les guide vers le périplasma dans lequel se trouvent des chaperons moléculaires (Skp, FkpA, DsbA and DsbC) qui facilitent le repliement et permettent l'assemblage de ponts disulfures.

La protéolyse, qui risque de dégrader les fragments d'anticorps lors de leur accumulation périplasmique peut être limitée par utilisation de souche déficientes, pour lesquelles des gènes tels que DegP et Prc ont été inactivés (Chen *et al.*, 2004). Il est possible d'obtenir de l'assemblage intra-cytoplasmique par utilisation de mutants trxB qui possèdent un potentiel redox comparable à celui de cellules eucaryotes. La bactérie *Escherichia coli*, comme la plupart des gram négatifs, est, le plus souvent, un mauvais sécréteur de protéines recombinantes, néanmoins certains auteurs ont décrit ce phénomène en utilisant le système HlyA (Fernandez *et al.*, 2000).

Jusqu'à une époque récente, il était admis que l'expression d'anticorps complets dans le périplasma de *E. coli*, semblait difficile à réaliser. Simmons *et al.* (2002) ont prouvé le contraire. Les anticorps ainsi produits étaient capables de reconnaître leur cible, mais de façon prévisible la capacité de recrutement de fonctions effectrices par l'intermédiaire du fragment Fc était absente.

La question d'une glycosylation potentielle chez *Escherichia coli* a été traitée par Wacker *et al.* (2002). Cette équipe a, en effet, montré que la voie de synthèse des N-glycanes de *Campylobacter jejuni* pouvait être transférée chez *E. coli*. Bien qu'il existe des différences fondamentales entre bactéries et cellules eucaryotes, cela suggère la possibilité de produire des fragments d'anticorps glycosylés chez *E. coli*.

Il est permis de penser que la combinaison des deux méthodologies décrites précédemment pourrait laisser espérer un jour la possibilité d'exprimer des anticorps complets ou d'autres molécules glycosylées chez *E. coli*. Aussi prometteuse que soit cette perspective, il serait vain de sous-estimer les difficultés inhérentes au transfert d'une voie complète de glycosylation chez des prokaryotes et la faible capacité d'accumulation du compartiment périplasmique pour les molécules complexes de haut poids moléculaire.

AUTRES SYSTÈMES PROKARYOTES

Plusieurs bactéries gram positives ont été utilisées pour la production de fragments d'anticorps, telles *Bacillus subtilis* (Wu *et al.*, 2002), *Lactobacillus zeae* (Krugger *et al.*, 2002), *Streptomyces lividans* (Ueda *et al.*, 1993) ou encore *Staphylococcus carnosus*. (Pschorr *et al.*, 1994). L'avantage théorique des bactéries gram posi-

tive est leur potentiel de sécrétion, qui doit cependant être analysé au cas par cas.

Cellules de mammifères en culture

Les anticorps, le plus souvent de classe IgG, peuvent être obtenus sous forme sécrétée dans des surnageants de cellules de mammifères en culture. Les plus couramment utilisées sont les cellules CHO (Chinese hamster ovary), NSO (issues d'un myélome murin) ou HEK-293 (cellules embryonnaires de rein humain) (Grunberg *et al.*, 2003). Ces cellules sont jusqu'à présent le modèle de choix pour la production de la plupart des anticorps monoclonaux commercialisés, bien que le coût de production soit très élevé. Une estimation récente de la capacité de tels systèmes pour la production d'anticorps monoclonaux se situerait aux alentours de 400 à 500 000 litres (Ginsberg *et al.*, 2001). Cette capacité risque donc de ne pas pouvoir assurer la demande des prochaines années si l'on considère que 20 à 50 nouveaux anticorps monoclonaux sont en cours d'approbation et arriveront sur le marché avant 5 ans et que la production de chacun de ces anticorps pourrait correspondre à une capacité de 15 ou 20 000 litres. Les gains de productivité des cellules de mammifères en culture sont encore possibles (Wurm, 2004), mais il y a cependant urgence à développer de nouveaux moyens de production.

Levures et champignons filamenteux

L'intérêt de ces microorganismes réside dans leur capacité à croître sur des milieux chimiquement définis et surtout, exempts de composés d'origine animale. Leur capacité de glycosylation, bien qu'imparfaite, les a souvent fait préférer à *E. coli*. Plusieurs exemples d'expression de fragments d'anticorps (Fab ou scFv) sont décrits chez la levure *Pichia pastoris* (Fischer *et al.*, 1999; Ning *et al.*, 2003). De plus, la levure répond de façon satisfaisante aux contraintes de production liées au domaine pharmaceutique, dans la mesure où certains composés injectables, ainsi produits, ont déjà été acceptés par les autorités de santé. L'apport le plus récent est la mise au point de levures génétiquement modifiées dans lesquelles a été transférée une voie de synthèse des glycanes équivalente à celle des mammifères.

Les champignons filamenteux tels que : *Aspergillus awamori* (Sotiriadis *et al.*, 2001), *Aspergillus niger* (Ward *et al.*, 2004) et *Trichoderma reesei* (brevet n° WO 92/01797) ont permis l'expression, non seulement de fragments, mais aussi d'anticorps complets. Le potentiel de sécrétion et surtout l'accès à des échelles de fermentation considérables pourraient permettre le développement de systèmes de production basés sur les champignons filamenteux.

Plantes transgéniques

Les « planticorps » obtenus à partir de végétaux possèdent un grand nombre d'atouts théoriques, en particulier le coût de production, l'accès à une biomasse quasi-

illimitée et la sécurité vis-à-vis de virus animaux ou de prions (Schillberg *et al.*, 2003; Stoger *et al.*, 2002). Le premier exemple d'anticorps produit dans un système végétal remonte à 1989 (Hiatt *et al.*). De nombreux autres exemples ont suivi, utilisant une grande variété de plantes comme le tabac, le soja (Zeitlin *et al.*, 1998), alfalfa (Khouidi *et al.*, 1999) et bien d'autres (Ma *et al.*, 1998, 2005). Jusqu'à ce jour, seul un système végétal a permis l'obtention de quantités industrielles d'IgA sécrétoires (sIgA) (Larrick *et al.*, 2001). Les modèles d'expression végétaux peuvent donner accès à des molécules complètes par croisement de plantes transgéniques exprimant individuellement chaque partie de la molécule entière (Peeters *et al.*, 2001). Bien qu'il soit imprudent de sous-estimer les difficultés d'extraction et de purification à partir de matériel végétal, les plantes constituent une des voies privilégiées pour satisfaire l'énorme demande en anticorps monoclonaux des années à venir. Parallèlement aux plantes transgéniques classiques, sont amenés à se développer des systèmes bénéficiant d'une perception moins controversée par le grand public. Il s'agit, en particulier, de cellules végétales en culture, de systèmes de rhizosécrétion (Komarnytsky *et al.*, 2006) ainsi que de systèmes d'expression transitoire dans lesquels la plante n'est plus considérée comme un organisme génétiquement modifié mais comme un simple substrat (Lee & Yang, 2006; Tague & Mantis, 2006).

Animaux transgéniques

Les glandes mammaires offrent un organe de choix pour la production de protéines recombinantes dans la mesure où la récolte de lait peut être facile et abondante. L'utilisation de chèvres ou de vaches transgéniques, longtemps considérée comme une technique trop sophistiquée et complexe, pourrait s'avérer compétitive par rapport aux cellules de mammifères en culture (Pollock *et al.*, 1999). Les arguments contraires généralement évoqués : investissement matériel important, temps de génération, temps écoulé entre l'obtention de l'animal transgénique et sa première lactation pourraient perdre de leur poids si l'on considère un investissement à long terme (Limonta *et al.*, 1995; Dick *et al.*, 2003). En marge de ces grands animaux de rente se trouve un autre domaine en pleine expansion, celui de l'expression d'anticorps dans les œufs. Ce dernier semble pouvoir apporter une réponse au problème de coût de production, et surtout de délai de mise en place (Chadd & Chamow, 2001).

Quel que soit le moyen utilisé pour le produire, la valeur thérapeutique d'un anticorps peut être largement affectée par la qualité de sa glycosylation. La N-glycosylation obtenue à l'aide de systèmes d'expression de protéines recombinantes est souvent légèrement différente de celle que l'on peut rencontrer sur les glycoprotéines humaines. Les conséquences possibles sont une immunogénicité indésirable qui favorisera l'élimination rapide de l'anticorps injecté, ou encore une faible capacité de fixation sur certains Fc récepteurs et donc l'incapacité à engager les fonctions effectrices associées.

Systèmes d'expression et profil de glycosylation

Tous les systèmes décrits précédemment ne sont pas en situation d'égalité vis-à-vis des modifications post-traductionnelles et plus particulièrement de la glycosylation. Bien que la modification de l'oligosaccharide Glc2Man9-GlcNac2 en Man8GlcNac2 dans le reticulum endoplasmique soit très similaire chez les Levures, Insectes, Plantes et Mammifères les étapes suivantes, qui ont lieu dans le golgi sont très différentes (Bettenbaugh *et al.*, 2004).

Les fonctions effectrices d'un anticorps de type IgG peuvent être fortement altérées par son profil de glycosylation (Wright & Morrison, 1997). Ceci est particulièrement vrai en ce qui concerne la modification portée par l'asparagine 297 du domaine CH2 de la chaîne lourde (Siberil *et al.*, 2006). Dans ce cas, la glycosylation joue un rôle structural majeur dans la mesure où les résidus β 1,4-galactose se trouvent en contact direct avec la protéine et pourraient même participer à son repliement correct (Fig. 5).

De très légères différences de glycosylation dues au système d'expression utilisé, même si celui-ci fait appel à des cellules de mammifères, peuvent engendrer des réactions immunogènes ou parfois allergiques. De ce fait plusieurs équipes ont cherché à humaniser les voies de synthèses des glycanes afin d'optimiser un système d'expression et de produire des molécules véritablement humaines (Bettenbaugh *et al.*, 2004; Hollister *et al.*, 2002).

Le potentiel thérapeutique d'anticorps a pu être accru après ingénierie métabolique de cellules de mammifères (Grabenhorst *et al.*, 1999). C'est en particulier le cas lorsque l'on ajoute la n-acetylglucosaminyltransférase III à des cellules CHO ou NSO qui ne l'expriment pas naturellement (Umana *et al.*, 1999). Un autre exemple d'amélioration a été obtenu par Bragonzi *et al.* (2000) après transfert de l'enzyme α ,2-6 sialyltransferase dans des cellules CHO.

De même que les autres cellules eucaryotes, les cellules d'insectes ont la capacité de produire une N-glycosylation, celle-ci est cependant beaucoup moins complexe que celle des cellules humaines, la sialylation N-terminale est, en particulier, toujours absente. L'ingénierie de la voie de synthèse des glycanes a également été décrite pour des cellules d'insectes (Chang *et al.*, 2003).

La N-glycosylation des végétaux met en œuvre des résidus β (1,2)-xylose et α (1,3)-fucose (Ko *et al.*, 2003) qui peuvent être responsables de réactions allergiques, mais dont l'immunogénicité est souvent faible. Des travaux d'humanisation des voies de synthèses des glycanes végétaux sont décrits, ils consistent le plus souvent à éteindre les gènes produisant des résidus spécifiquement végétaux et parfois ajouter la β -1,4-galactosyltransférase humaine (Bakker *et al.*, 2001; Cox *et al.*, 2006).

La levure a une propension naturelle à produire de l'hypermannosylation, ceci explique que les travaux d'humanisation de la voie de glycosylation de ce micro-organisme passent par une étape de délétion de l'un des gènes responsables (α -1,6-mannosyltransférase Och1p)

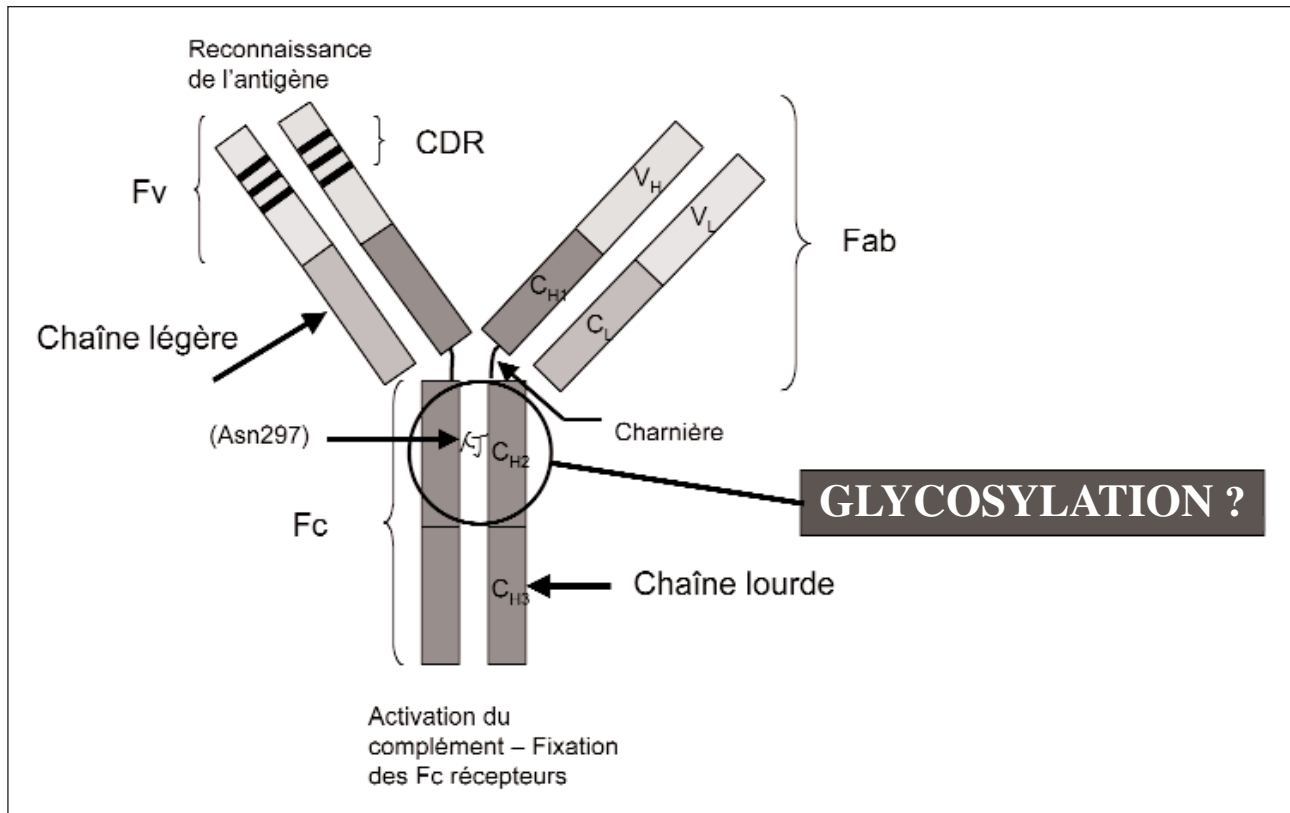


FIG. 5. – Importance de la glycosylation des anticorps en position Asn 297.

(Wildt & Gerngross, 2005). Cette première étape est suivie par l'introduction de gènes associés au transport et l'ajout de polysaccharides humains (α -1,2 mannosidase, galactosyltransferases) (Bretthauer, 2003 ; Verweken *et al.*, 2004 ; Bobrowicz *et al.*, 2004).

ANTICORPS RECOMBINANTS : QUE NOUS RÉSERVENT LES 30 ANS À VENIR ?

Après une longue et douloureuse période de gestation, une vingtaine d'anticorps monoclonaux ont envahi le marché thérapeutique. Les raisons qui permettent d'expliquer ce succès sont une demande toujours plus importante et l'arrivée à maturité des techniques d'ingénierie et d'humanisation de ces molécules. La tendance observée ne fera que s'accroître et la première vague pourrait être suivie par une déferlante si l'on considère que plus de 300 anticorps ou fragments d'anticorps sont actuellement en phase d'évaluation clinique. Certains problèmes restent cependant à résoudre, en particulier la mise à disposition de systèmes d'expression permettant d'associer coûts de production raisonnables, grandes quantités et conformité moléculaire (Farid, 2006). L'anticorps apparaît comme un moteur essentiel pour l'élaboration et la mise au point de tels systèmes qui constituent le véritable défi technologique des années à venir.

BIBLIOGRAPHIE

- Arditti F. D., Rabinkov A., Miron T., Reisner Y., Berrebi A., Wilchek M. & Mirelman D., Apoptotic killing of B-chronic lymphocytic leukemia tumor cells by allicin generated in situ using a rituximab-alliinase conjugate. *Mol. Cancer Ther.*, 2005, 4 (2), 325-331.
- Auf der Maur A., Zahnd C., Fischer F., Spinelli S., Honegger A., Cambillau C., Escher D., Pluckthun A. & Barberis A., Direct *in vivo* screening of intrabody libraries constructed on a highly stable single-chain framework. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 45075-45085.
- Auf der Maur A., Tissot K. & Barberis A., Antigen-independent selection of intracellular stable antibody frameworks. *Methods*, 2004, 34, 215-224.
- Baca M., Presta L. G., O'Connor S. & Wells J. A., Antibody humanization using monovalent phage display. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 10678-10684.
- Baert F., Noman M., Vermeire S., Van Assche G., D'Haens G., Carbonez A. & Rutgeerts P., Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.*, 2003, 348 (7), 601-608.
- Bakker H., Bardorff M., Molthoff J. W., Gomord V., Elbers I., Stevens L. H., Jordi W., Lommen A., Faye L., Lerouge P. *et al.*, Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, 2899-2904.
- Bakker J. M., Bleeker W. K. & Parren P. W., Therapeutic antibody gene transfer: an active approach to passive immunity. *Mol. Ther.*, 2004, 10, 411-416.

- Bendandi M., The role of idiotype vaccines in the treatment of human B-cell malignancies. *Expert Rev. Vaccines*, 2004, 3, 163-170.
- Betenbaugh M. J., Tomiya N., Narang S., Hsu J. T. A. & Lee Y. C., Biosynthesis of human-type N-glycans in heterologous systems. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2004, 14, 601-606.
- Bhattacharya-Chatterjee M., Chatterjee S. K. & Foon K. A., Anti-idiotype vaccine against cancer. *Immunol. Lett.*, 2000, 74, 51-58.
- Binz H. K., Stumpp M. T., Forrer P., Amstutz H. & Pluckthun A., Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins. *J. Mol. Biol.*, 2003, 332, 489-503.
- Bobrowicz P., Davidson R. C., Li H., Potgieter T. I., Nett J. H., Hamilton S. R., Stadheim T. A., Miele R. G., Bobrowicz B., Mitchell T. *et al.*, Engineering of an artificial glycosylation pathway blocked in core oligosaccharide assembly in the yeast *Pichia pastoris*: production of complex humanized glycoproteins with terminal galactose. *Glycobiology*, 2004, 14, 757-766.
- Bragonzi A., Distefano G., Buckberry L. D., Acerbis G., Foglieni C., Lamotte D., Campi G., Marc A., Soria M. R., Jenkins N. *et al.*, A new chinese hamster ovary cell line expressing $\alpha 2,6$ -sialyltransferase used as universal host for the production of human-like sialylated recombinant glycoproteins. *Biochem. Biophys. Acta*, 2000, 1474, 273-282.
- Bretthauer R. K., Genetic engineering of *Pichia pastoris* to humanize N-glycosylation of proteins. *Trends Biotechnol.*, 2003, 21, 459-462.
- Bugelski P. J., Herzyk D. J., Rehm S., Harmsen A. G., Gore E. V., Williams D. M., Maleeff B. E., Bagder A. M., Truneh A., O'Brien S. R. *et al.*, Preclinical development of keliximab, a primatized anti-CD4 monoclonal antibody, in human CD4 transgenic mice: characterization of the model and safety studies. *Hum. Exp. Toxicol.*, 2000, 19, 230-243.
- Cano F., Plotnicky-Gilquin H., Nguyen T. N., Liljeqvist S., Samuelson P., Bonnefoy J. Y., Stahl S., Robert A., Partial protection to respiratory syncytial virus (RSV) elicited in mice by intranasal immunization using live staphylococci with surface-displayed RSV-peptides. *Vaccine*, 2000, 18, 2743-2752.
- Carlsson R., Soderlind E., n-CoDeR concept: unique types of antibodies for diagnostic use and therapy. *Expert. Rev. Mol. Diagn.*, 2001, 1, 102-108.
- Carter P., Presta L., Gorman C. M., Ridgway J. B. B., Henner D., Wong W. L. T., Rowland A. M., Kotts C., Carver M. E. & Shepard H. M., Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 4285-4289.
- Casadevall A., Dadachova E. & Pirofski L. A., Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2004, 2 (9), 695-703.
- Chadd H. E. & Chamow S. M., Therapeutic antibody expression technology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2001, 12 (2), 188-194.
- Chang G. D., Chen C. J., Lin C. Y., Chen H. C. & Chen H., Improvement of glycosylation in insect cells with mammalian glycosyltransferases. *J. Biotechnol.*, 2003, 102, 61-71.
- Chapman A. P., PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002, 54, 531-545.
- Chapman A. P., Antoniw P., Spitali M., West S., Stephen S. & King D. J., Therapeutic antibody fragments with prolonged *in vivo* half-lives. *Nat. Biotech.*, 1999, 17, 780-783.
- Chen C., Snedecor B., Nishihara J. C., Joly J. C., McFarland N., Andersen D. C., Battersby J. E. & Champion K. M., High-level accumulation of a recombinant antibody fragment in the periplasm of *Escherichia coli* requires a triple-mutant (degP prc spr) host strain. *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, 85, 463-474.
- Clark M., Antibody humanization: a case of the "Empror's new clothes"? *Immunol. Today*, 2000, 21, 397-402.
- Cobleigh M. A., Vogel C. L., Tripathy D., Robert N. J., Scholl S., Fehrenbacher L., Wolter J. M., Paton V., Shak S., Lieberman G. *et al.*, Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J. Clin. Oncol.*, 1999, 17, 2639-2648.
- Cox K. M., Sterling J. D., Regan J. T., Gasdaska J. R., Frantz K. K., Peele C. G., Black A., Passmore D., Moldovan-Loomis C., Srinivasan M., Cuisson S., Cardarelli P. M. & Dickey L. F., Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. *Nat. Biotechnol.*, 2006, 24 (12), 1591-1597.
- Davis C. G., Jia X. C., Feng X. & Haak-Frendscho M., Production of human antibodies from transgenic mice. *Methods Mol. Biol.*, 2004, 248, 191-200.
- de Kruijff J. & Logtenberg T., Leucine Zipper dimerized bivalent and bispecific scFv antibodies from a semi-synthetic antibody phage display library. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 7630-7634.
- Dela Cruz J. S., Huang T. H., Penichet M. L. & Morrison S. L., Antibody-cytokine fusion proteins: innovative weapons in the war against cancer. *Clin. Exp. Med.*, 2004, 4 (2), 57-64.
- Delagrave S., Catalan J., Sweet C., Drabik G., Henry A., Rees A., Monath T. P. & Guirakhoo F., Effect of humanization by variable domain resurfacing on the antiviral activity of a single-chain antibody against respiratory syncytial virus. *Protein Eng.*, 1999, 12, 357-362.
- Deyev S. M., Waibel R., Lebedenko E. N., Shubiger A. P. & Pluckthun A., Design of multivalent complexes using the barnase*barstar module. *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21, 1486-1492.
- Dick M. K., Lacroix D., Pothier F. & Sirard M. A., Making recombinant proteins in animals – different systems, different applications. *Trends Biotechnol.*, 2003, 21, 394-399.
- Dolk E., van der Vaart M., Hulsik D. L., Vriend G., de Haard H., Spinelli S., Cambillau C., Frenken L. & Verrips T., Isolation of Lama antibody fragments for prevention of dandruff by phage display in shampoo. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71, 442-450.
- Drake P. M., Charlelegue D. M., Vine N. D., van Dolleweerd C. J., Obregon P. & Ma J., Rhizosecretion of a monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots. *Plant. Mol. Biol.*, 2003, 52, 233-241.
- Duenas M. & Borrebaeck C. A., Clonal selection and amplification of phage displayed antibodies by linking antigen recognition and phage replication. *Biotechnology (NY)*, 1994, 12, 999-1002.
- Dufner P., Jermutus L. & Minter R. R., Harnessing phage and ribosome display for antibody optimisation. *Trends Biotechnol.*, 2006, 24 (11), 523-529.
- Farid S. S., Established bioprocesses for producing antibodies as a basis for future planning. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2006, 101, 1-42.
- Feldhaus M. & Siegel R., Flow cytometric screening of yeast surface display libraries. *Methods Mol. Biol.*, 2004, 263, 311-332.
- Fernandez L. A., Sola I., Enjuanes L. & de Lorenzo V., Specific secretion of active single-chain Fv antibodies into the supernatants of *Escherichia coli* cultures by use of the hemolysin system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66, 5024-5029.
- Fernandez L. A., Procarotic expression of antibodies and affibodies. *Curr. Opin. Biotech.*, 2004, 15, 364-373.
- Fields B. A., Goldbaum F. A., Ysern X., Poljak R. J. & Mariuzza R. A., Molecular basis of antigen mimicry by an anti-idiotypic. *Nature*, 1995, 374, 739-742.
- Fischer R., Drossard J., Emans N., Commandeur U. & Hellwig S., Towards molecular farming in the future: *Pichia pastoris*

- based production of single-chain antibody fragments. *Bio-technol. Appl. Biochem.*, 1999, 30, 117-120.
- Foon K. A., Yang X. D., Weiner L. M., Belldegrun A. S., Figlin R. A., Crawford J., Rowinsky E. K., Dutcher J. P., Vogelzang N. J., Gollub J. *et al.*, Preclinical and clinical evaluations of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2004, 58 (3), 984-990.
- Foot J. & Winter G., Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J. Mol. Biol.*, 1992, 224, 487-499.
- Gao C., Mao S., Kaufmann G., Wirshing P., Lerner R. A. & Janda K. D., A method for the generation of combinatorial antibody libraries using pIX phage display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 12612-12616.
- Geoffroy F., Sodoyer R. & Aujame L., A new phage display system to construct multicombinatorial libraries of very large antibody repertoires. *Gene*, 1994, 151, 109-113.
- Ginsberg P. L., Bhatia S. & McMinn R. L., The road ahead for biologicals manufacturing. *US Bancorp Piper Jaffray*, 2001, 1-23.
- Goldman J. P., Blundell M. P., Lopes L., Kinnon C., Di Santo J. & Thrasher A. J., Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor γ chain. *Brit. J. Haematol.*, 1998, 103, 335-342.
- Gonzales N. R., Padlan E., De Pascalis R., Schuck P., Schlom J. & Kashmiri S. V., SDR grafting of a murine antibody using multiple human germline templates to minimize its immunogenicity. *Mol. Immunol.*, 2004, 41, 863-872.
- Grabenhorst E., Schlenke P., Pohl S., Nimitz M. & Conradt H. S., Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. *Glycoconj. J.*, 1999, 16, 81-97.
- Graille M., Stura E. A., Bossus M., Muller B. H., Letourneur O., Battail-Poirot N., Sibai G., Gauthier M., Rolland D., Le Du M. H. & Ducancel F., Crystal structure of the complex between the monomeric form of *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) and a monoclonal antibody that mimics the human immune response. *J. Mol. Biol.*, 2005, 354 (2), 447-58.
- Gramatikoff K., Georgiev O. & Schaffner W., Direct interaction rescue, a novel filamentous phage technique to study protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22, 5761-5762.
- Griffiths A. D., Williams S. C., Hartley O., Tomlinson I. M., Waterhouse P., Crosby W. L., Kontermann R. E., Jones P. T., Low N. M., Allison T. J. *et al.*, Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.* 1994, 13, 3245-3260.
- Groves M. A. & Osbourn J. K., Applications of ribosome display to antibody drug discovery. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2005, 5, 125-135.
- Grunberg J., Knogler K., Waibel R. & Novak-Hofer I., High-yield production of recombinant antibody fragments in HEK-293 cells using sodium butyrate. *Biotechniques*, 2003, 34, 968-972.
- Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers G., Songa E. B., Bendahman N. & Hamers R., Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 1993, 363, 446-448.
- Hanes J., Schaffitzel C., Knappik A. & Pluckthun A., Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naïve library selected and evolved by ribosome display. *Nat. Biotechnol.*, 2000, 18, 1287-1292.
- Hanes J., Jermutus L. & Pluckthun A., Selecting and evolving functional proteins *in vitro* by ribosome display. *Adv. Protein Chem.*, 2000, 328, 404-430.
- He Y., Honnen W. J., Krachmarov C. P., Burkhart M., Kayman S. C., Corvalan J. & Pinter A., Efficient isolation of novel human monoclonal antibodies with neutralizing activity against HIV-1 from transgenic mice expressing human Ig loci. *J. Immunol.*, 2002, 169, 595-605.
- Helguera G. & Penichet M. L., Antibody-cytokine fusion proteins for the therapy of cancer. *Methods Mol. Med.*, 2005, 109, 347-374.
- Heng B. C. & Cao T., Making cell-permeable antibodies (*Trans-body*) through fusion transduction domains (PTD) with single chain variable fragment (scFv) antibodies: potential advantages over antibodies expressed within the intracellular environment (*Intrabody*). *Med. Hypotheses* 2005, 64, 1105-1108.
- Henry M. D., Wen S., Silva M. D., Chandra S., Milton M., Worland P. J., A prostate-specific membrane antigen-targeted monoclonal antibody-chemotherapeutic conjugate designed for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res.*, 2004, 64, 7995-8001.
- Hiatt A., Cafferkey R. & Bowdish K., Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 1989, 342, 76-78.
- Hollister J., Grabenhorst E., Nimitz M., Conradt H., Jarvis D. L., Engineering the protein N-glycosylation pathway in insect cells for production of biantennary complex N-glycans. *Biochem.*, 2002, 41, 15093-15104.
- Holt L. J., Herring C., Jespers L. S., Woolven B. P. & Tomlinson I. M., Domain antibodies: proteins for therapy. *Trends Biotechnol.*, 2003, 21, 484-490.
- Homayoun P., Mandal T., Landry D. & Komiskey H., Controlled release of anti-cocaine catalytic antibody from biodegradable polymer microspheres. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2003, 55, 933-938.
- Hu S., Shively L., Raubitschek A., Sherman M., Williams L. E., Wong J. Y., Shively J. E. & Wu A. M., 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, 3055-3061.
- Hudson P. J. & Souriau C., Engineered antibodies. *Nat. Med.*, 2003, 9, 129-134.
- Iliades P., Kortt A. A. & Hudson P. J., Triabodies: single chain Fv fragments without a linker form trivalent trimers. *FEBS Lett.*, 1997, 409, 437-441.
- Itoh K., Development of diagnostically and therapeutically useful human antibody medicines by phage display system. *Yakugaku Zasshi*, 2007, 127 (1), 43-53.
- Ishida I., Tomizuka K., Yoshida H., Tahara T., Takahashi N., Ohguma A., Tanaka S., Umehashi M., Maeda H., Nozaki C. *et al.*, Production of human monoclonal and polyclonal antibodies in TransChromo animals. *Cloning Stem. Cells*, 2002, 4, 91-102.
- Jakovovits A., The long-awaited magic bullets: therapeutic human monoclonal antibodies from transgenic mice. *Expert. Opin. Investig. Drugs*, 1998, 7, 607-614
- Jendreyko N., Popkov M., Rader C. & Barbas C. F. 3rd, Phenotypic knockout of VEGF-R2 and Tie-2 with an intradiabody reduces tumor growth and angiogenesis *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102 (23), 8293-8298.
- Jermutus L., Honegger A., Schwesinger F., Hanes J. & Pluckthun A., Tailoring *in vitro* evolution for protein affinity or stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, 75-80.
- Jespers L. S., Roberts A., Mahler S. M., Winter G. & Hoogenboom H. R., Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen. *Biotechnology (NY)*, 1994, 12 (9), 899-903.
- Jespers L. S., Messens J. H., De Keyser A., Eeckhout D., Van den Brande I., Gansemans Y. G., Lauwereys M. J., Vlasuk G. P. & Stanssens P. E., Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI. *Biotechnology (NY)*, 1995, 13, 378-382.
- Jones P. T., Dear P. H., Foote J., Neuberger M. & Winter G., Replacing the complementary-determining regions in a

- human antibody with those from a mouse. *Nature*, 1986, 321, 522-525.
- Jung S., Arndt K. M., Muller K. M. & Plückthun A., Selectively infective phage (SIP) technology: scope and limitations. *J. Immunol. Methods*, 1999, 9, 93-104.
- Juste M., Martin-Eauclaire M. F., Devaux C., Billiald P. & Aubrey N., Using a recombinant bispecific antibody to block Na^v-channel toxins protects against experimental scorpion envenoming. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2007, 2, 206-218.
- Karpas A., Dremucheva A. & Czepulkowski B. H., A human myeloma cell line suitable for the generation of human monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 1799-1804.
- Kellermann S. A. & Green L., Antibody discovery: the use of transgenic mice to generate human monoclonal antibodies for therapeutics. *Curr. Opin. Biotech.*, 2002, 13, 593-597.
- Khoudi H., Laberge S., Ferullo J. M., Bazin R., Darveau A., Castongay Y., Allard G., Lemiex R. & Vezina L. P., Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, 64, 135-143.
- Kitamura K., Takahashi T., Takashina K., Yamaguchi T., Noguchi A., Tsurumi H., Toyokuni T. & Hakomori S., Polyethylene glycol modification of the monoclonal antibody A7 enhances its tumor localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, 171 (3), 1387-1394.
- Ko K., Tekoah Y., Rudd P. M., Harvey D. J., Dwek R. A., Spitsin S., Hanlon C. A., Rupprecht C., Dietzschold B., Golovkin M. *et al.*, Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100, 8013-8018.
- Kohl A., Binz H. K., Forrer P., Stumpp M. T., Plückthun A. & Grütter M. G., Designed to be stable: crystal structure of a consensus ankyrin repeat protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100, 1700-1705.
- Kohler G. & Milstein C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256, 495-497.
- Komarnytsky S., Borisjuk N., Yakoby N., Garvey A. & Raskin I., Cosecretion of protease inhibitor stabilizes antibodies produced by plant roots. *Plant. Physiol.*, 2006, 141 (4), 1185-93.
- Knappik A., Ge L., Honegger A., Pack P., Fischer M., Wellnhöfer G., Hoess A., Wolle J., Plückthun A. & Virrekas B., Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J. Mol. Biol.*, 2000, 296, 57-86.
- Krauss J., Arndt K. M., Vu B. K., Newton D. L., Seeber S., Rybak S. M., Efficient killing of CD22⁺ tumor cells by a humanized diabody-RNase fusion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 331, 595-602.
- Krebber C., Spada S., Desplancq D. & Plückthun A., Co-selection of cognate antibody-antigen pairs by selectively infective phages. *FEBS Lett.*, 1995, 377, 227-231.
- Krebber C., Spada S., Desplancq D., Krebber A., Ge L., Plückthun A., Selectively-infective phage (SIP): a mechanistic dissection of a novel *in vivo* selection for protein-ligand interactions. *J. Mol. Biol.*, 1997, 268, 607-618.
- Kruger C., Hu Y., Pan Q., Marcotte H., Hultberg A., Delwar D., Van Dalen P. J., Pouwels P. H., Leer R. J., Kelly C. G. *et al.*, *In situ* delivery of passive immunity by lactobacilli producing single-chain antibodies. *Nat. Biotech.*, 2002, 20, 702-706.
- Lacroix-Desmazes S., Bayry J., Kaveri SV, Hayon-Sonsino D, Thorenou N, Charpentier J, Luyt CE, Mira JP, Nagaraja V, Kazatchkine MD *et al.*: High levels of catalytic antibodies correlate with favorable outcome in sepsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102:4109-4113.
- Larrick J. W., Yu L., Naftzger C., Jaiswal S. & Wycoff K., Production of secretory IgA antibodies in plants. *Biomol. Eng.*, 2001, 18, 87-94.
- Larsen N. A., de Prada P., Deng S. X., Mittal A., Braskett M., Zhu X., Wilson I. A. & Landry D. W., Crystallographic and biochemical analysis of cocaine-degrading antibody 15A10. *Biochemistry*, 2004, 43, 8067-8076.
- Law C. L., Cervený C., Gordon K. A., Klussman K., Mixan B. J., Chace D. F., Meyer D. L., Doronina S. O., Siegall C. B., Francisco J. A. *et al.*, Efficient elimination of B-lineage lymphomas by anti-CD20-auristatin conjugates. *Clin. Cancer Res.*, 2004, 10, 7842-7851.
- Lee C. V., Sidhu S. S. & Fuh G., Bivalent antibody phage display mimics natural immunoglobulin. *J. Immunol. Methods*, 2004, 284, 119-132.
- Lee M. W. & Yang Y., Transient expression assay by agroinfiltration of leaves. *Methods Mol. Biol.*, 2006, 323, 225-229.
- Lewis A. P., Barber K. A., Cooper H. J., Sims M. J., Worden J., Crowe J. S., Cloning and sequence analysis of κ and γ cynomolgus monkey immunoglobulin cDNAs. *Dev. Comp. Immunol.*, 1993, 17, 549-560.
- Limonta J., Pedraza A., Rodriguez A., Freyre F. M., Barral A. M., Castro F. O., Lleonart R., Gracia C. A., Gavilondo J. V. & de la Fuente J., Production of active anti-CD6 mouse/human chimeric antibodies in the milk of transgenic mice. *Immunotechnology*, 1995, 1, 107-113.
- Lund J., Takahashi N., Nakagawa H., Goodall M., Bentley T., Hindley S. A., Tyler R. & Jefferis R., Control of IgG/Fc glycosylation: a comparison of oligosaccharides from chimeric human/mouse and mouse subclass immunoglobulin Gs. *Mol. Immunol.*, 1993, 30, 741-748.
- Lunde E., Rasmussen I. B., Eidem J. K., Gregers T. F., Western K. H., Bogen B. & Sandlie I., "Troy-bodies": antibodies as vector proteins for T cell epitopes. *Biomol. Eng.*, 2001, 18, 109-116.
- Lunde E., Lauvrak V., Rasmussen I. B., Schjetne K. W., Thompson K. M., Michaelsen T. E., Brekke O. H., Sollid L. M., Bogen B. & Sandlie I., *Troybodies* and *pepbodies*. *Biochem. Soc. Trans.*, 2002, 30, 500-506.
- Ma J., Hikmat B. Y., Wycoff K., Vine N. D., Charlelegue D., Yu L., Hein M. B. & Lehner T., Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat. Med.*, 1998, 4, 601-606.
- Ma J., Drake P. M., Charlelegue D., Obregon P. & Prada A., Antibody processing and engineering in plants, and new strategies for vaccine production. *Vaccine*, 2005, 23, 1814-1818.
- Mateo C., Lombardero J., Moreno E., Bombino G., Coloma J., Wims L., Morrison S. L. & Perez R., Removal of amphipathic epitopes from genetically engineered antibodies: production of modified immunoglobulins with reduced immunogenicity. *Hybridoma*, 2000, 19, 463-471.
- Meijler M. M., Kaufmann G. F., Qi L., Mee J. M., Coyle A. R., Moss J. A., Wirshing P., Matsuhita M. & Janda K. D., Fluorescent cocaine probes: a tool for the selection and engineering of therapeutic antibodies. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 2477-2484.
- Mitsuda Y., Tsuruhata K., Hifumi E., Takagi M. & Uda T., Investigation of active form of catalytic antibody light chain 41S-2-L. *Immunol. Lett.*, 2005, 96, 63-71.
- Morrison S. L., Johnson M. J., Herzenberg L. A. & Oi V. T., Chimeric human antibody molecules mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 6851-6855.
- Musselli C., Daverio-Zanetti S. & Zanetti M., Antigenized antibodies expressing V β 8.2 TCR peptides immunize against rat experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immune Based Ther. Vaccines*, 2004, 2, 9.
- Nevinsky G. A., Kanyshkova T. G. & Buneva V. N., Natural cata-

- lytic antibodies (abzymes) in normalcy and pathology. *Biochemistry*, 2000, 65, 1245-1255.
- Newman R., Alberts J., Anderson D., Carner K., Heard C., Norton F., Raab R., Reff M., Shuey S. & Hanna N., "Primitization" of recombinant antibodies for immunotherapy of human diseases: a macaque/human chimeric antibody against human CD4. *Biotechnology (NY)*, 1992, 10, 1455-1459.
- Ning D., Junjian X., Xunzhang W., Wenying C., Qing Z., Kuan-yuan S., Guirong R., Xiangrong R., Qingxin L. & Zhouyao Y., Expression, purification, and characterization of humanized anti-HBs Fab fragment. *J. Biochem.*, 2003, 134, 813-817.
- Nuttall S. D., Krishnan U. V., Hattarki M., De Gori R., Irving R. A. & Hudson P. J., Isolation of the new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries. *Mol. Immunol.*, 2001, 38, 313-326.
- Nuttall S. D., Krishnan U. V., Doughty L., Pearson K., Ryan M. T., Hoogenraad N. J., Hattarki M., Carmichael J. A., Irving R. A. & Hudson P. J., Isolation and characterization of an IgNAR variable domain specific for the human mitochondrial translocase receptor Tom70. *Eur. J. Biochem.*, 2003, 270, 3543-3554.
- Nuttall S. D., Humberstone K. S., Krishnan U. V., Carmichael J. A., Doughty L., Hattarki M., Coley A. M., Casey J. L., Anders R. F., Foley M. *et al.*, Selection and affinity maturation of IgNAR variable domains targeting Plasmodium falciparum AMA1. *Proteins*, 2004, 55, 187-197.
- Padlan E., A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. *Mol. Immunol.*, 1991, 28, 489-498.
- Padlan E., Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol.*, 1994, 31, 169-217.
- Paul S., Nishiyama Y., Planque S., Karle S., Taguchi H., Hanson C. & Weksler M. E., Antibodies as defensive enzymes. *Springer Semin. Immunopathol.*, 2005, 26, 485-503.
- Pavlou A. & Belsey M. J., The therapeutic antibodies market to 2008. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2005, 59, 389-396.
- Peeters K., De Wilde C., De Jaeger G., Angenon G. & Depicker A., Production of antibodies and antibody fragments in plants. *Vaccine*, 2001, 19, 2756-2761.
- Pollock D. P., Kutzko J. P., Birck-Wilson E., Williams J. L., Eche-lard Y. & Meade H. M., Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *J. Immunol. Methods*, 1999, 231, 147-157.
- Popkov M., Jendreyko N., McGavern D. B., Rader C. & Barbas C. F. I., Targeting tumor angiogenesis with adenovirus-delivered anti-Tie2 intrabody. *Cancer Res.*, 2005, 65, 972-981.
- Pschorr J., Bieseler B. & Fritz H. J., Production of the immunoglobulin variable domain REiv via a fusion protein synthesized and secreted by *Staphylococcus carnosus*. *Biol. Chem. Happe Seyler*, 1994, 375, 271-280.
- Reichert J. M., Technology evaluation: lumiliximab, Biogen Idec. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2004, 6, 675-683.
- Reichert J. & Pavlou A., Monoclonal antibodies market. *Nature Rev.*, 2004, 3, 383-384.
- Riechmann L., Clark H., Waldmann H. & Winter G., Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*, 1988, 332, 323-327.
- Reiersen H., Lobersli I., Loset G. A., Hvattum E., Simonsen B., Stacy J. E., McGregor D., Fitzgerald K., Welschof M., Brekke O. H. *et al.*, Covalent antibody display - an *in vitro* antibody DNA library selection system. *Nucleic Acids Res.*, 2005, 33, e10.
- Reiter Y. & Pastan I., Recombinant Fv immunotoxins and Fv fragments as novel agents for cancer therapy and diagnosis. *TIBTECH*, 1998, 16, 513-520.
- Ren Z. & Black L. W., Phage T4 SOC and HOC display of biologically active, full-length proteins on the viral capsid. *Gene*, 1998, 215, 439-444.
- Ritter G. L., Cohen L. S., Williams C. J., Richards E. C., Old L. J. & Welt S., Serological analysis of human anti-human antibody responses in colon cancer patients treated with repeated doses of humanized monoclonal antibody A33. *Cancer Res.*, 2001, 61, 6851.
- Roguska M. A., Pedersen J. T., Keddy C. A., Henry A. H., Searle S. J., Lambert J. M., Goldmacher V. S., Blattler W. A., Rees A. R. & Guild B. C., Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 969-973.
- Roque-Navarro L., Mateo C., Lombardero J., Mustelier G., Fernandez A., Sosa K., Morrison S. L. & Perez R., Humanization of predicted T-cell epitopes reduces the immunogenicity of chimeric antibodies: new evidence supporting a simple method. *Hybrid Hybridomics*, 2003, 22, 245-257.
- Rothe A., Hosse R. J. & Power B. E., Ribosome display for improved biotherapeutic molecules. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, 2006, 6 (2), 177-187.
- Rowinsky E. K., Schwartz G. H., Gollob J. A., Thompson J. A., Vogelzang N. J., Figlin R., Bukowski R., Haas N., Lockbaum P., Li Y. P. *et al.*, Safety, pharmacokinetics, and activity of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in patients with metastatic renal cell cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2004, 22 (15), 3003-3015.
- Samuelson P., Gunneriusson E., Nygren P. A. & Stahl S., Display of proteins on bacteria. *J. Biotechnol.*, 2002, 96, 129-154.
- Sawada-Hirai R., Jiang I., Wang F., Sun S. M., Nedellec R., Ruther P., Alvarez A., Millis D., Morrow P. R. & Kang A. S., Human anti-anthrax protective antigen neutralizing monoclonal antibodies derived from donors vaccinated with anthrax vaccine adsorbed. *J. Immune Based Ther. Vaccines*, 2004, 2, 5.
- Sawata S. Y. & Taira K., Development of an advanced polysome display system dependent on a specific protein-RNA motif interaction. *Nucleic Acids Res.*, 2001, *Suppl.*, 99-100.
- Schillberg S., Fischer R. & Emans N., Molecular farming of recombinant antibodies in plant. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2003, 60, 433-445.
- Schlehuber S. & Skerra A., Duocalins: engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold. *Biol. Chem.*, 2001, 382, 1335-1342.
- Schlehuber S. & Skerra A., Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant - a so-called "anticalin" - using a molecular random approach. *Bio-phys. Chem.*, 2002, 96, 213-228.
- Schlehuber S. & Skerra A., Lipocalins in drug discovery: from natural ligand-binding proteins to "anticalins". *Drug Discov. Today*, 2005, 10 (1), 23-33.
- Schroff R. W., Foon K. F., Beatty S. M., Oldham R. K. & Morgan A. C. J., Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res*, 1985, 45, 879-885.
- Sergeeva A., Kolonin M. G., Molidrem J. J., Pasqualini R., Arap W., Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2006, 58, 1622-1654.
- Sharma S. K., Pedley R. B., Bhatia J., Boxer G. M., El-Emir E., Qureshi U., Tolner B., Lowe H., Michael N. P., Minton N. *et al.*, Sustained tumor regression of human colorectal cancer xenografts using a multifunctional mannosylated fusion protein in antibody-directed enzyme prodrug therapy. *Clin. Cancer Res.*, 2005, 11, 814-825.
- Shen Z., Stryker G. A., Mernaugh R. L., Yu L., Yan H. & Zeng X., Single-chain fragment variable antibody piezoelectroimmunosen-sors. *Anal. Chem.*, 2005, 77, 797-805.
- Siberil S., Dutertre C. A., Boix C., Bonnin E., Menez R., Stura E., Jorieux S., Fridman W. H. & Teillaud J. L., Molecular aspects of human FcγR interactions with IgG: functional and therapeutic consequences. *Immunol. Lett.*, 2006, 106 (2), 111-118.

- Sidhu S. S., Engineering M13 for phage display. *Biomol. Eng.*, 2001, 18, 57-63.
- Simmons L. C., Reilly D., Klimowski L., Raju T. S., Meng G., Sims P., Hong K., Shields R. L., Damico L. A., Rancatore P. *et al.*, Expression of full-length immunoglobulins in *Escherichia coli*: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies. *J. Immunol. Methods*, 2002, 263, 133-147.
- Smith G. P., Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, 228, 1315-1317.
- Sotiriadis A., Keshavarz T. & Keshavarz-Moore E., Factors affecting the production of a single-chain antibody fragment by *Aspergillus awamori* in a stirred tank reactor. *Biotechnol. Prog.*, 2001, 17, 618-623.
- Stern M. & Herrmann R., Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2005, 54, 11-29.
- Stocks M., Intrabodies as drug discovery tools and therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2005, 4, 359-365.
- Stoger E., Sack M., Fischer R. & Christou P., Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks. *Curr. Opin. Biotech.*, 2002, 13, 161-166.
- Suresh M. R., Cuello A. C. & Milstein C., Bispecific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas. *Methods Enzymol.*, 1986, 121, 210-228.
- Tague B. W. & Mantis J., In planta Agrobacterium-mediated transformation by vacuum infiltration. *Methods Mol. Biol.*, 2006, 323, 215-23.
- Tan P., Mitchell D. A., Buss T. N., Holmes M. A., Anasetti C. & Foote J., "Superhumanized" antibodies: reduction of immunogenic potential by complementarity-determining region grafting with human germline sequences: application to an anti-CD28. *J. Immunol.*, 2002, 169, 1119-1125.
- Tanaka T., Lobato M. N. & Rabbitts T. H., Single domain intracellular antibodies: a minimal fragment for direct *in vivo* selection of antigen-specific intrabodies. *J. Mol. Biol.*, 2003, 331, 1109-1120.
- Todorovska A., Roovers R. C., Dolezal O., Kortt A. A., Hoogenboom H. R. & Hudson P. J., Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J. Immunol. Methods*, 2001, 248, 47-66.
- Tomizuka K., Shinohara T., Yoshida H., Uejima H., Ohguma H., Tanaka S., Sato K., Oshimura M. & Ishida I., Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 722-727.
- Ueda Y., Tsumoto K., Watanabe K. & Kumagai I., Synthesis and expression of a DNA encoding the Fv domain of an anti-lysozyme monoclonal antibody, HyHEL10, in *Streptomyces lividans*. *Gene*, 1993, 129, 129-134.
- Umana P., Jean-Mairet J., Moudry R., Amstutz H. & Bailey J. E., Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependant cellular cytotoxic activity. *Nat. Biotech.*, 1999, 17, 176-180.
- Vaughan T. J., Williams A. J., Pritchard K., Osbourn J. K., Pope A. R., Earnshaw J. C., McCafferty J., Hodits R. A., Wilton J. & Johnson K. J., Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat. Biotechnol.*, 1996, 14, 309-314.
- Vervecken W., Kaigorodov V., Callewaert N., Geysens S., De Vusser K. & Contreras R., *In vivo* synthesis of mammalian-like, hybrid-type N-glycans in *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70, 2639-2646.
- Visintin M., Quondam M. & Cattaneo A., The intracellular antibody capture technology: towards the high-throughput selection of functional intracellular antibodies for target validation. *Methods*, 2004, 34 (2), 200-214.
- Wacker M., Linton D., Hitchen P. G., Nita-Lazar M., Haslam S. M., North S. J., Panico M., Morris H. R., Dell A., Wren B. W. *et al.*, N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science* 2002, 298, 1790-1793.
- Ward M., Lin C., Victoria D. C., Fox J. A., Wong D. L., Meerman H. J., Pucci J. P., Fong R. B., Heng M. H., Tsurushita N. *et al.*, Characterization of humanized antibodies secreted by *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70, 2567-2576.
- Waterhouse P., Griffiths A. D., Johnson K. S. & Winter G., Combinatorial infection and *in vivo* recombination: a strategy for making large phage antibody repertoires. *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21, 2265-2266.
- Weiner L. M., Fully human therapeutic monoclonal antibodies. *J. Immunother.*, 2006, 29 (1), 1-9.
- Wildt S. & Gerngross T. U., The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, 3, 119-128.
- Wright A. & Morrison S. L., Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. *Trends Biotechnol.*, 1997, 15, 26-32.
- Wu S. C., Yeung J. C., Duan Y., Ye R., Szarka S. J., Habibi H. R. & Wong S. L., Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: Effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68, 3261-3269.
- Wurm F. M., Production or recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotech.*, 2004, 22, 1393-1398.
- Xu G. & McLeod H. L., Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy. *Clin. Cancer Res.*, 2001, 7, 3314-3324.
- Xu Y., Yamamoto N. & Janda K. D., Catalytic antibodies: hapten design strategies and screening methods. *Bioorg. Med. Chem.*, 2004, 12, 5247-5268.
- Yazaki P. J., Sherman M. A., Shively J. E., Ikle D., Williams L. E., Wong J. Y., Colcher D., Wu A. M. & Raubitschek A. A., Humanization of the anti-CEA T84.66 antibody based on crystal structure data. *Protein Eng. Des. Sel.*, 2004, 17, 481-489.
- Zanetti M., Antigenized antibodies. *Nature*, 1992, 355, 476-477.
- Zeitlin L., Olmsted S. S., Moench T. R., Co M. S., Martinell B. J., Paradkar V. M., Russell D. R., Queen C., Cone R. A. & Whaley K. J., A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nat. Biotechnol.*, 1998, 16, 1361-1364.