

Le deuxième acte des anticorps monoclonaux : de nouvelles molécules pour de nouveaux défis

par Charles-Antoine Dutertre*,** & Jean-Luc Teillaud*

*INSERM UMRS 872, Centre de Recherche des Cordeliers, Université Paris 5 et Université Paris 6, Paris, France ;

**Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies, Les Ulis, France.

Correspondance : Jean-Luc Teillaud, Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM UMRS 872, 15, rue de l'École de Médecine, 75270 Paris cedex 06. Tél. : 01 53 10 04 09. Fax : 01 40 51 04 20.

E-mail : jean-luc.teillaud@u255.bhdc.jussieu.fr

Reçu le 29 décembre 2006

RÉSUMÉ

Après des débuts difficiles dus en partie à leur origine murine et à des critères de sélection discutables, les anticorps monoclonaux sont devenus, notamment grâce à une ingénierie moléculaire de plus en plus sophistiquée, des outils thérapeutiques de premier plan dans des domaines thérapeutiques de plus en plus divers. Cette ingénierie a visé à améliorer l'affinité de leurs régions variables vis-à-vis des molécules cibles, à les rendre moins immunogènes en raison de leur origine murine et à les doter de meilleures propriétés effectrices, initialement limitées du fait de leur origine murine. Le succès de cette première génération d'anticorps a lancé de nouveaux défis que la communauté scientifique et médicale a déjà relevé : conception d'anticorps aux activités fonctionnelles optimisées et aux effets secondaires mieux contrôlés,

détection et sélection des patients répondeurs, conception de nouveaux formats moléculaires (anticorps couplés à des drogues, anticorps bi-spécifiques, anticorps à durée de vie améliorée), production à moindre coût. Non seulement une nouvelle génération d'anticorps est en train d'apparaître rapidement, mais le futur des anticorps se profile déjà à l'horizon : approches oligoclonales fondées sur l'utilisation de cocktails de différents anticorps monoclonaux, sélection rationnelle des patients éligibles, production en masse à des coûts moindres... À ce jour, vingt-trois anticorps monoclonaux sont sur le marché et/ou ont reçu l'approbation des autorités sanitaires aux États-Unis et/ou en Europe et plus de deux cent cinquante sont évalués dans des essais cliniques. Une nouvelle vague se prépare...

SUMMARY Monoclonal antibodies, Act two: new molecules for new challenges

After early difficulties due in part to their mouse origin and questionable selection criteria, monoclonal antibodies have become major therapeutic tools thanks to more and more sophisticated molecular engineering. They are now used in a growing number of therapeutic areas. Molecular engineering has focused on the improvement of antibody affinity, the reduction of immunogenicity due to the murine origin of the first generation of monoclonal antibodies and on the increase of antibody effector properties, initially limited by their murine origin. The current success of antibodies raises new challenges that the scientific and medical communities are taking up: design of antibodies with optimized functional pro-

perties, with lower side effects, design of new molecular formats (drug-coupled antibodies, bi-specific antibodies, antibodies with optimized half-lives), detection and selection of "responder" patients. As a new antibody generation is quickly emerging, the future of antibodies is already at sight: development of oligoclonal strategies where cocktails of monoclonal antibodies are used, rationale selection of eligible patients, bulk production at lower costs. To date, twenty-three monoclonal antibodies have received an approval in the United States and/or in Europe and more than two hundred and fifty are currently evaluated in clinical trials. A new wave is coming...

INTRODUCTION

En 1975, Köhler et Milstein montrèrent qu'il était possible de générer des cellules B hybrides, ou hybridomes, produisant de façon stable des anticorps ayant une spé-

cificité pré-définie (Köhler & Milstein, 1975). Ces anticorps furent appelés anticorps monoclonaux (AcM) du fait de la nature clonale des cellules productrices. Cinq ans plus tard, le premier essai clinique utilisant un anticorps monoclonal fut réalisé sur un patient présentant un

lymphome, témoignant de l'extraordinaire intérêt thérapeutique qu'avait suscité la publication de Köhler et Milstein. Aucune réponse clinique significative ne fut observée, mais l'anticorps fut bien toléré (Nadler *et al.*, 1980). En 1982, le premier cas de rémission complète fut observé chez un patient également atteint d'un lymphome B, après traitement avec un AcM de souris dirigé contre les immunoglobulines exprimées à la surface des cellules tumorales (anticorps anti-idiotype) (Miller *et al.*, 1982). Cette approche, impliquant de créer un anticorps spécifique pour chaque patient, s'avéra cependant trop complexe à mettre en place pour une utilisation à grande échelle. Elle ouvrit néanmoins la voie à de nombreux autres essais thérapeutiques utilisant des AcM.

L'enthousiasme initial fut rapidement tempéré par les questions soulevées au cours de ces premiers essais. D'une part, il apparut rapidement qu'il fallait disposer d'anticorps dirigés contre des cibles spécifiques pertinentes, un objectif qui reste toujours d'actualité, et qui est particulièrement complexe à atteindre. D'autre part, du fait de l'origine murine de ces anticorps, trois problèmes liés à leur utilisation chez l'Homme apparurent : 1) génération d'anticorps humains anti-anticorps de souris ("HAMA",

pour *Human Anti-Mouse Antibody*) lors d'une utilisation itérative chez les patients, conduisant à une diminution d'efficacité et à des effets secondaires indésirables dus à la formation de complexes immuns; 2) propriétés effectrices des anticorps injectés médiocres (malgré l'absence d'une barrière d'espèce au sens strict); 3) courte demi-vie plasmatique de ces anticorps de souris.

LA LONGUE MARCHÉ VERS LES ANTICORPS THÉRAPEUTIQUES HUMAINS

Il devint donc évident que l'obtention d'anticorps plus « humains » voire humains était un objectif essentiel à atteindre. Les approches cellulaires ne donnant pas les résultats escomptés, la manipulation des AcM par génie génétique commença au début des années 1980 et permit au fil des années de résoudre en grande partie les problèmes associés à l'utilisation d'AcM murins. Quatre stratégies principales d'ingénierie moléculaire furent mises en œuvre (Fig. 1) :

– Construction d'anticorps chimériques constitués des domaines VH et VL de souris, le reste de la molécule

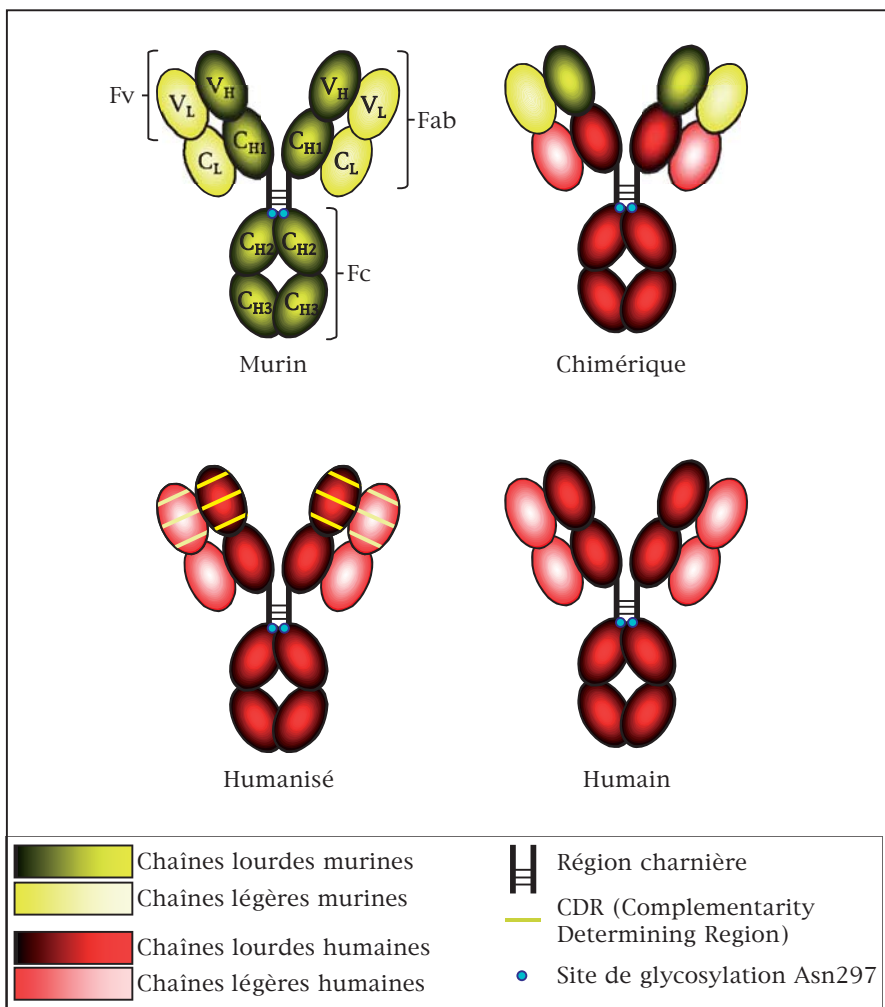


FIG. 1. – Les différents types d'anticorps thérapeutiques. L'ingénierie moléculaire *in vitro* et *in vivo* a permis d'obtenir des anticorps dont les séquences primaires sont soit partiellement soit complètement humaines à partir d'anticorps de souris.

étant d'origine humaine (Boulianne *et al.*, 1984; Morrison *et al.*, 1984; Takeda *et al.*, 1985).

– Construction d'anticorps humanisés par greffe de régions hypervariables d'anticorps monoclonaux de souris sur des régions charpentes ("Frameworks, FR") VH et VL humaines ("CDR grafting") (Jones *et al.*, 1986; Queen *et al.*, 1989), ou par "resurfacing", une approche consistant à donner un «profil» humain à un domaine VH ou VL murin, en ne changeant que certains acides aminés des régions charpentes de ces domaines (Roguska *et al.*, 1994).

– Construction de banques combinatoires de domaines VH et VL humains, exprimés à la surface de bactériophages (*phage display*) (McCafferty *et al.*, 1990). Cette

approche a été notamment rendue possible par la maîtrise des techniques d'expression de peptides à la surface des phages filamenteux (Smith, 1985) et de génération et d'expression chez *E. coli* de fragments recombinants "scFv" ("single chain Fv") liant un domaine VH et un domaine VL ou de fragments recombinants Fab, constitués de la chaîne légère associée au segment peptidique VH-CH1 (Bird *et al.*, 1988; Huston *et al.*, 1988; Skerra & Pluckthün, 1988).

– Obtention de souris transgéniques ou trans-chromosomiques contenant une grande partie des gènes codant les chaînes lourdes et légères humaines (Green *et al.*, 1994; Lonberg *et al.*, 1994; Tomizuka *et al.*, 2000).

TABLEAU 1. – Anticorps monoclonaux à usage thérapeutique sur le marché (décembre 2006).

Nom commercial	Nom	Compagnie	Type	Date	Isotype	Cible	Indication
Orthoclone OKT3	Muromonab	Ortho Biotech (J&J)	Souris	1986	IgG2a	CD3	Prévention de rejets aigus d'allogreffes
RéoPro	Abciximab	Centocor	Chimérique	1994	Fab	GPIIb/IIIa	Prévention des thrombus post-chirurgicaux
Panorex*	Edrecolomab	Centocor/GSK	Souris	1995	IgG2a	EpCAM	Cancer colorectal métastatique
Zenapax	Daclizumab	Roche	Humanisé	1997	IgG1	CD25	Prévention de rejets aigus d'allogreffes
Rituxan (Mabthera)	Rituximab	Biogen-Idex Genentech/Roche	Chimérique	1997	IgG1	CD20	LNH ^o , Arthrite rhumatoïde
Simulect	Basiliximab	Novartis	Chimérique	1998	IgG1	CD25	Prévention de rejets aigus d'allogreffes
Synagis	Palivizumab	MedImmune	Humanisé	1998	IgG1	RSV+	Infection à RSV
Herceptin	Trastuzumab	Genentech	Humanisé	1998	IgG1	HER2/neu	Cancer du sein métastatique
Remicade	Infliximab	Centocor	Chimérique	1998	IgG1	TNF α	Arthrite rhumatoïde, maladie de Crohn
Mylotarg	Gemtuzumab-ozogamicin	Wyeth-Ayerst	Humanisé	2000	IgG4	CD33	Leucémie myéloïde aiguë
CAMPATH-1H	Alemtuzumab	Ilex Pharm./Schering	Humanisé	2001	IgG1	CD52	Leucémie lymphoïde chronique B (LLC-B)
Humira	Adalimumab	CAT/Abbott	Humain	2002	IgG1	TNF α	Arthrite rhumatoïde
Zevalin	¹¹¹ In et ⁹⁰ Y-Ibritumomab tiuxétan	Biogen-Idex	Souris	2002	IgG1	CD20	LNH ^o
Xolair	Omalizumab	Genentech/Novartis	Humanisé	2003	IgG1	IgE(Fc)	Asthme allergique
Raptiva	Efalizumab	Genentech/Serono	Humanisé	2003	IgG1	CD11a	Psoriasis
Bexxar	¹³¹ I-Tositumomab	GSK (Corixa)	Souris	2003	IgG2a	CD20	LNH ^o
Erbix	Cetuximab	ImClone/Merck KGaA	Chimérique	2004	IgG1	EGF-R	Cancer colorectal métastatique
Avastin	Bevacizumab	Genentech/Roche	Humanisé	2004	IgG1	VEGF	Cancer colorectal métastatique
Tysabri	Natalizumab	Biogen Idec/Elan	Humanisé	2004	IgG4	a4	Sclérose en plaques
HuMax-CD4 [#]	Zanolimumab	Genmab	Humain	2005	IgG1	CD4	Lymphome cutané T
HuMax-CD20 [#]	Ofatumumab	Genmab	Humain	2005	IgG1	CD20	LNH ^o , LLC-B
Lucentis	Ranibizumab	Genentech	Humanisé	2006	Fab'	VEGF	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
Vectibix	Panitumumab	Amgen	Humain	2006	IgG2	EGF-R	Cancer colorectal métastatique

* Approuvé seulement en Allemagne.

^o Lymphome B Non-Hodgkinien.

⁺ Virus respiratoire syncytial.

[#] Statut de médicament orphelin en Europe et aux États-Unis.

C'est en 1986 qu'un AcM obtint pour la première fois une autorisation de mise sur le marché aux États-Unis : le muromonab-CD3 (OKT3), un anticorps murin dirigé contre la molécule CD3 pour la prévention du rejet aigu des allogreffes rénales (Tableau I). Il fallut attendre huit ans (1994) pour qu'un second AcM, chimérique, l'abciximab (ReoPro) dirigé contre la molécule GP IIb/IIIa, obtienne également une autorisation de mise sur le marché pour la prévention de la formation de thrombus à la suite d'opérations cardio-vasculaires. Le premier AcM humanisé, le daclizumab (Zenapax), dirigé contre la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25), pour la prévention des rejets aigus des allogreffes rénales fut mis sur le marché en 1997. Enfin, le premier AcM complètement humain à être mis sur le marché, l'adalimumab (Humira) dirigé contre le TNF α et utilisé pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde, le fut en 2002 (Tableau I).

Les AcM utilisés à des fins thérapeutiques peuvent avoir différents modes d'action, non mutuellement exclusifs les uns des autres, selon la molécule cible à laquelle ils se lient (Fig. 2) :

– Neutralisation de molécules solubles, comme des toxines ou des cytokines.

– Induction d'un programme de mort cellulaire impliquant ou non les caspases, après fixation à des molécules exprimées à la surface des cellules cibles.

– Blocage par compétition de récepteurs membranaires de facteurs de croissance ou de cytokines.

– Effets agonistes (activation de la production de cytokines, de la différenciation, de la migration cellulaire...).

– Activation de mécanismes effecteurs après fixation à des molécules exprimées à la surface de cellules cibles [activation de la voie classique du complément conduisant à la lyse de la cellule cible (CDC ou "Complement Dependent Cytotoxicity"); activation cellulaire faisant suite à l'engagement des RFc γ conduisant à une lyse des cellules cibles (ADCC ou "Antibody Dependent Cell Cytotoxicity") ou à leur phagocytose.

DES MOLÉCULES OPTIMISÉES POUR DE MEILLEURS RÉSULTATS

Une question de cibles et/ou de régions variables...

L'une des raisons des résultats décevants obtenus lors des premiers essais cliniques utilisant des AcM fut la dif-

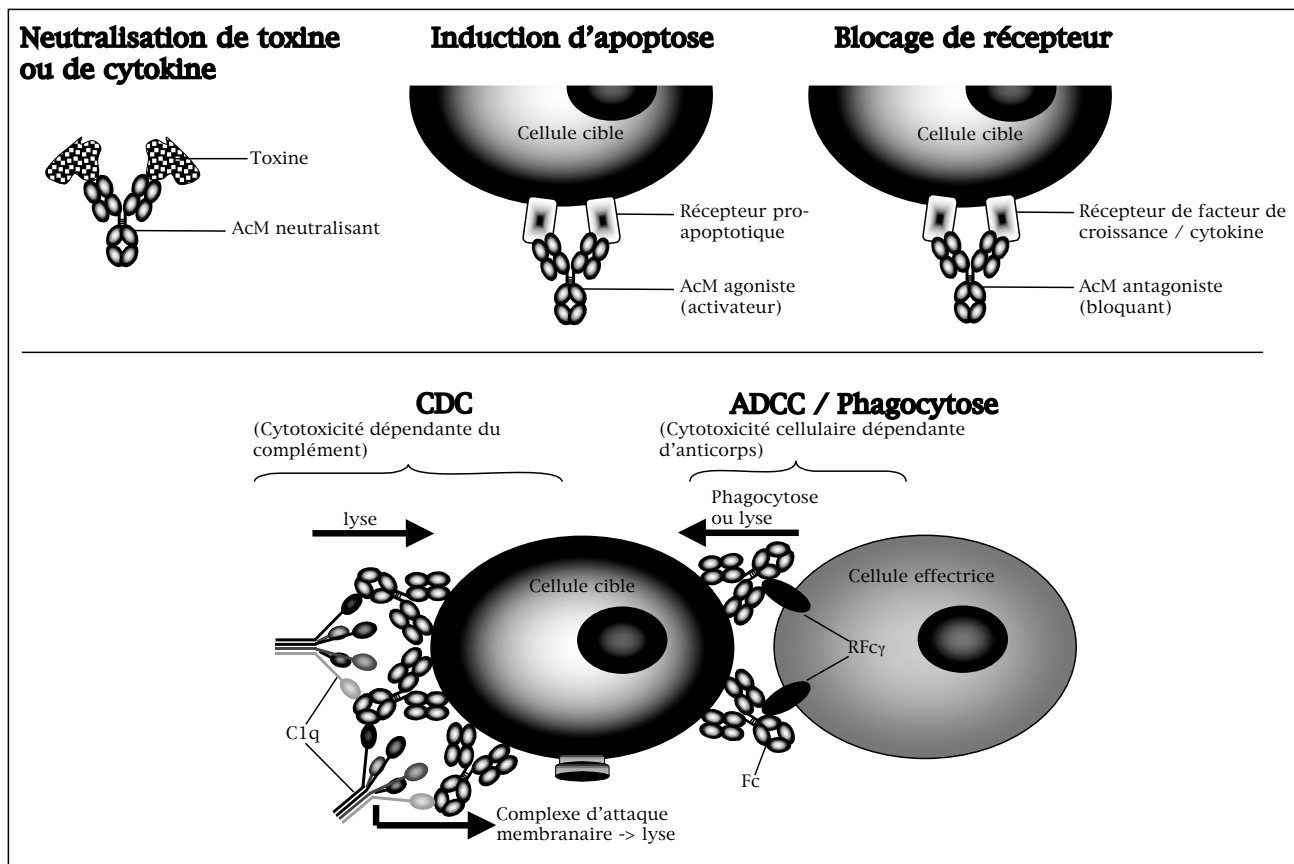


FIG. 2. – Les différents mécanismes d'action possibles des anticorps thérapeutiques. L'efficacité clinique des anticorps thérapeutiques est probablement due à différents mécanismes d'action, non mutuellement exclusifs, reflétant la dualité fonctionnelle de ces molécules : activités liées aux régions variables (neutralisation, effets agonistes ou antagonistes) et activités liées à la région Fc (cytotoxicité cellulaire, phagocytose, activation de la voie classique du complément).

ficulté de définir des cibles moléculaires pertinentes, ne présentant pas de risques majeurs pour les patients. Les paramètres à prendre en compte dans le choix de la cible moléculaire d'un AcM sont multiples. Ils doivent intégrer des facteurs très variés: spécificité et sélectivité de l'expression, densité et capacité de modulation de cette expression (internalisation, libération dans les liquides biologiques, mutations), éventuels polymorphismes associés, effets agonistes ou antagonistes des anticorps sélectionnés, signalisation intracellulaire et conséquences fonctionnelles (effet cytotostatique, induction d'apoptose, induction de la production de médiateurs solubles...).

La majorité des AcM ayant montré une efficacité clinique est dirigée contre des cibles moléculaires dont ils modulent ou neutralisent la fonction. Par exemple, le cetuximab et le panitumumab, dirigés contre le récepteur de l'EGF (EGF-R, *Epidermal Growth Factor-Receptor*), le trastuzumab, dirigé contre HER2/neu, une molécule appartenant également à la famille des EGF-R, bloquent l'effet mitogénique de ce facteur de croissance. L'anticorps anti-CD20 rituximab induit l'apoptose des cellules de lymphomes non-Hodgkiniens (LNH) et les anticorps anti-CD25 daclizumab et basiliximab bloquent l'activation par l'IL-2... (Tableau I).

L'ingénierie des AcM a visé en partie à améliorer l'affinité de ces derniers, en se fondant sur l'hypothèse qu'une meilleure affinité signifiait une rétention prolongée de l'AcM sur sa cible et une meilleure efficacité thérapeutique... Bien que cela soit vrai pour des anticorps dirigés contre des molécules solubles comme des cytokines ou des toxines, cette hypothèse reste controversée dans le domaine de la cancérologie, notamment en ce qui concerne les tumeurs solides. Une forte affinité pourrait provoquer une rétention des anticorps par les cellules tumorales « superficielles », réduisant considérablement leur pénétration dans les tumeurs solides (Adams *et al.*, 2001). La manipulation des banques combinatoires de régions VH et VL exprimées par "phage display" a permis de sélectionner un grand nombre d'AcM ayant des affinités différentes pour une même molécule. Cette manipulation a été effectuée à l'aide de différentes approches, chacune d'entre elles ayant de nombreuses variantes selon les laboratoires: mutagenèse aléatoire ou dirigée, échange de chaînes ("*chain-shuffling*"), expression dans des souches bactériennes mutagènes ou de levures mutagènes (Schier *et al.*, 1996; Colby *et al.*, 2004). L'un des anticorps anti-TNF α actuellement sur le marché, l'adalimumab a subi un tel processus de maturation d'affinité.

Les questions de pénétration intra-tumorale et de biodistribution ont conduit à une recherche intensive sur différents formats d'anticorps, bien qu'à ce jour, quasiment aucun de ces formats (à l'exception de deux fragments Fab, l'abciximab dirigé contre le complexe GP IIb/IIIa, utilisé pour la prévention de thrombus post-chirurgicaux et le ranibizumab dirigé contre le VEGF), n'ait trouvé sa place dans l'arsenal thérapeutique (Fig. 3 et Tableau I): fragments monovalents Fab et scFv ("single chain Fv"), fragments multivalents de type "diabodies" ou "triabodies", fragments « minimum » comme les

"minibodies". Tous ces fragments ont deux avantages potentiels: ils peuvent être produits à faible coût dans des bactéries par rapport aux AcM entiers produits actuellement dans des lignées cellulaires de mammifères; de petites tailles, ils pénètrent efficacement au cœur des tumeurs solides. Ils ont cependant deux inconvénients majeurs: leur manque de stabilité et une demi-vie courte. Cependant, des techniques de couplage au polyéthylène glycol (« PEGylation ») ont montré qu'il était possible d'améliorer considérablement ces paramètres (Chapman, 2002). De plus, certains de ces fragments d'anticorps ont été « reformatés » en molécules multivalentes et multi-spécifiques et ont montré des propriétés effectrices encourageantes au moins *in vitro*.

Une question de région constante...

Chez l'Homme, l'ADCC, la phagocytose et la CDC sont des fonctions effectrices exercées par les anticorps d'isotype IgG1 et IgG3. C'est d'ailleurs pour cette raison que la plupart des anticorps sur le marché, qu'ils soient chimériques, humanisés ou humains sont des IgG1 (Tableau I). Il existe seulement sur le marché deux anticorps ayant des Fc appartenant à une autre sous-classe humaine: le gentuzumab (IgG4) et le panitumumab (IgG2). L'objectif ouvertement recherché est que ces anticorps n'engagent pas les mécanismes effecteurs « naturels » de l'immunité.

ADCC et phagocytose se trouvent activées à la suite de l'engagement des RFc γ activateurs (RFc γ I, RFc γ IIA et RFc γ IIIA) exprimés à la surface de nombreuses cellules effectrices de l'immunité (cellules NK, monocytes, macrophages, cellules dendritiques et polynucléaires). L'importance de l'interaction Fc-RFc γ dans l'activité anti-tumorale d'AcM *in vivo* a été démontrée en utilisant des souris invalidées pour les RFc γ I et RFc γ III (Clynes *et al.*, 1998). Chez ces souris, l'activité anti-tumorale du rituximab et du trastuzumab est fortement diminuée. Par contre, l'invalidation du RFc γ IIB inhibiteur accroît notablement l'activité anti-tumorale de ces deux anticorps (Clynes *et al.*, 2000). Plus récemment, Cartron et ses collègues ont montré que la réponse au rituximab chez des patients présentant un lymphome était corrélée au polymorphisme du RFc γ IIIA (Cartron *et al.*, 2002).

Toutes ces études suggèrent que l'activité thérapeutique des anticorps monoclonaux pourrait s'améliorer en manipulant leur région Fc afin d'augmenter/diminuer leurs affinités pour les RFc γ activateurs et/ou les RFc γ IIB inhibiteurs selon les objectifs thérapeutiques recherchés. De nombreux programmes de mutations de la région Fc ont donc été lancés. Des mutations ponctuelles de la région Fc, permettant d'augmenter la fixation à tout ou partie des RFc γ activateurs, voire inhibiteurs ont été identifiées *in vitro*. Certains de ces mutants ont montré une ADCC fortement accrue *in vitro* (Shields *et al.*, 2001). Actuellement, au moins un anticorps anti-CD20 présentant plusieurs mutations ponctuelles conduisant à un engagement accru du RFc γ IIIA est à l'étude *in vivo*.

Par ailleurs, la N-glycosylation des IgG1 humaines au niveau de l'asparagine 297 (Asn297) participe au main-

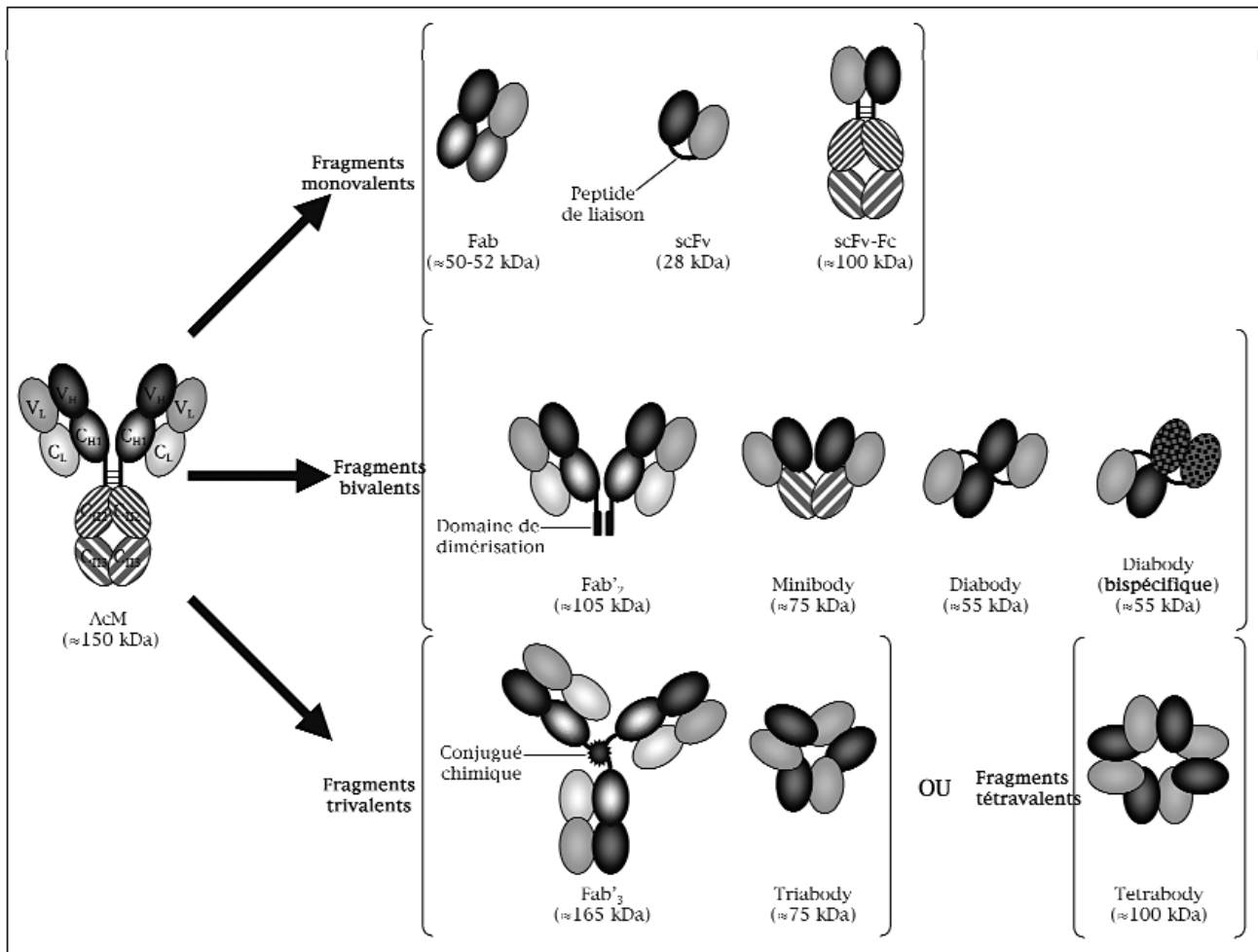


FIG. 3. – Les différents formats d'anticorps thérapeutiques. L'ingénierie moléculaire *in vitro* a permis d'obtenir des anticorps de formats très variés, visant à améliorer leurs propriétés fonctionnelles et pharmacocinétiques. Cependant, aucun de ces formats (à l'exception des Fab') n'est actuellement sur le marché.

tien de la structure tertiaire des domaines CH2 nécessaire à leurs fonctions effectrices. D'une part, la présence de résidus N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) intermédiaires permet aux IgG1 humaines de se lier plus fortement aux RFc γ IIIa et d'induire une ADCC accrue (Umana *et al.*, 1999). D'autre part, une absence de fucose (Shinkawa *et al.*, 2003) ou un faible taux de ce sucre (Sibérial *et al.*, 2006) permet également une fixation accrue aux RFc γ IIIa et une meilleure ADCC. Un faible taux de fucose a également un impact sur l'engagement du RFc γ IIB, qui est amélioré. Cette capacité des IgG peu fucosylées à lier plus fortement le RFc γ III et, dans une moindre mesure le RFc γ IIB, a récemment permis de sélectionner un AcM humain anti-D pour la prévention de l'allo-immunisation foeto-maternelle (Sibérial *et al.*, 2006). Cet anticorps a montré une excellente capacité de clairance dans un essai de phase I chez l'Homme (Béliard *et al.*, en préparation). La lignée cellulaire utilisée pour produire les anticorps monoclonaux, ainsi que les conditions de culture, peuvent affecter significativement la

glycosylation et donc la fonctionnalité de l'AcM (Lifely *et al.*, 1995). Des entreprises de biotechnologies se consacrent donc à l'optimisation du profil de glycosylation de la région Fc des AcM en modifiant des lignées cellulaires utilisées pour la production d'AcM : lignée cellulaire CHO transfectée avec le gène codant la β 1-4-N-acetylglucosaminyltransférase III (GnTIII⁺) (Davies *et al.*, 2001 ; Ferrara *et al.*, 2006) ; lignée cellulaire CHO/DG44 invalidée pour le gène codant la fucosyltransférase (FUT8⁻) (Yamane-Ohnuki *et al.*, 2004).

Enfin, l'utilisation d'anticorps optimisés en ce qui concerne leur capacité à activer la voie classique du complément est également explorée activement. Il a été récemment suggéré que la diminution du K_{off} des anticorps permet d'aboutir à un tel résultat (Teeling *et al.*, 2005). Une série d'anticorps optimisés, reposant sur ce principe, est à l'étude, notamment un anticorps anti-CD20 (HuMaxCD20) (Tableau I), dont l'une des indications pourrait être la leucémie lymphoïde chronique B (LLC-B).

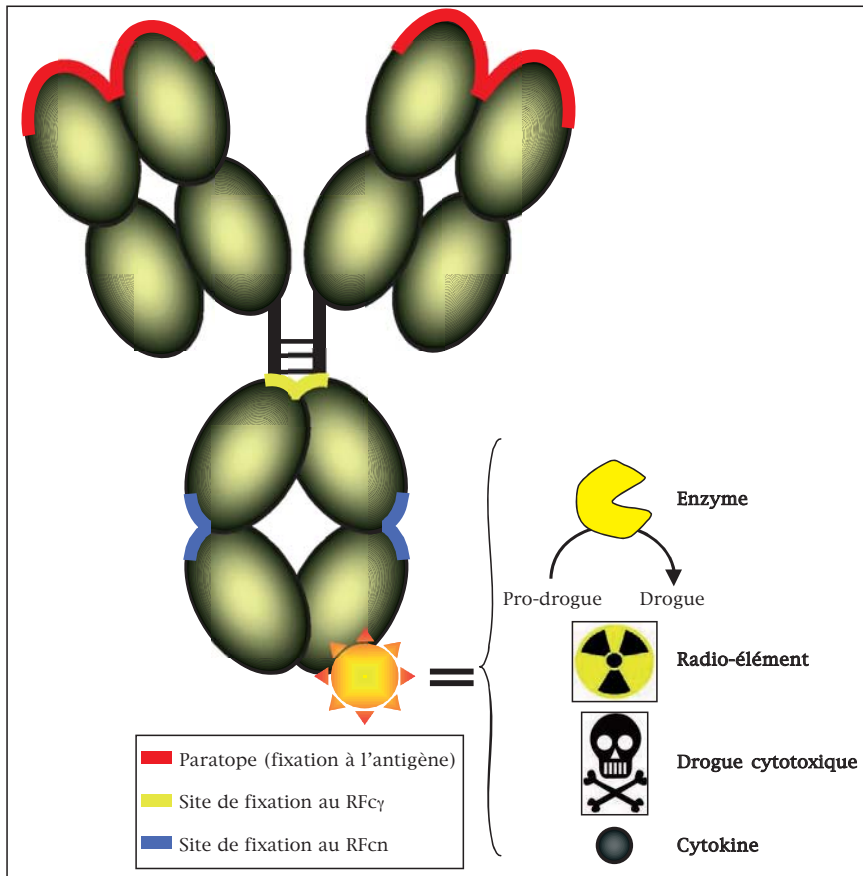


FIG. 4. – Les anticorps anti-tumeurs conjugués. Les anticorps peuvent s'utiliser comme vecteurs pour apporter et concentrer aux sites de la tumeur des drogues toxiques, des radio-éléments, des cytokines, ou des enzymes. Seuls, trois des 23 anticorps sur le marché sont des anticorps de ce type à ce jour.

Mais aussi une question de vectorisation

Les AcM conjugués (à des radio-éléments, des drogues toxiques, des pro-drogues, ou des cytokines) représentent des outils potentiels de traitement en oncologie (Fig. 4). Le concept de base, apparu dès le début des années 80 repose sur l'idée que l'anticorps peut s'utiliser comme vecteur pour apporter et concentrer au site de la tumeur une molécule toxique ou immunomodulatrice. L'anticorps n'est alors pas utilisé pour ses propres propriétés effectrices. De nombreuses variantes ont été imaginées au cours de ces trente dernières années, qu'il serait fastidieux d'énumérer. Cependant, il n'existe actuellement que trois AcM « conjugués » sur le marché : deux d'entre eux sont des anticorps de souris radio-conjugués [une IgG1 (^{90}Y -ibritumomab tiuxetan) et une IgG2a, (^{131}I -tositumomab)], dirigés contre la molécule CD20 et utilisés pour le traitement des lymphomes B ; le troisième est un AcM humanisé d'isotype IgG4, couplé à un dérivé de la calchémicine (une drogue utilisée en chimiothérapie), le gemtuzumab ozogamicin. Cet anticorps est dirigé contre la molécule CD33 et est utilisé pour le traitement de la leucémie myéloïde aiguë. L'avenir de certains de ces AcM conjugués semble prometteur puisque neuf d'entre eux étaient en phase 2 et un en phase 3 fin 2005. De même, il n'existe que deux fragments d'anticorps monoclonaux sur le marché à ce jour : l'abciximab dirigé contre le complexe GP IIb/IIIa, utilisé

pour la prévention de thrombus post-chirurgicaux et le ranibizumab dirigé contre le VEGF. Tous deux sont des fragments Fab.

Enfin la quadrature du cercle : les anticorps oligoclonaux

L'optimisation fonctionnelle des AcM s'adresse aussi aux anticorps utilisés dans le cadre de la lutte contre les maladies infectieuses, où la difficulté majeure réside dans la grande variabilité des différentes souches d'un même pathogène (bactéries, virus) et de leur acquisition de résistances par mutations ou perte d'expression des antigènes potentiellement cibles d'AcM. La solution envisagée actuellement est la mise au point de cocktails d'AcM. Cette approche « oligoclonale » soulève de nombreuses et intéressantes questions. Les différents AcM d'un tel cocktail doivent-ils avoir des spécificités différentes et des fonctionnalités complémentaires ? Combien d'anticorps monoclonaux sont-ils nécessaires dans un cocktail pour lui assurer une efficacité optimale ? Quels isotypes doivent être inclus ? Faut-il inclure à dessein des anticorps d'affinité différentes ? Pour ne pas parler de la validation de lot à lot et des études comparatives à mener...

Ce type de stratégie est envisagé pour le remplacement de la prophylaxie post-exposition au virus de la rage,

qui consiste à ce jour en l'injection d'anticorps polyclonaux (RIGs, pour "rabies immune globulin") (de Kruijff *et al.*, 2006) pour la neutralisation de la toxine botulique à l'aide d'un cocktail d'oligoclonaux isolés par "phage display" (Nowakowski *et al.*, 2002), ou pour le traitement de l'hépatite C à l'aide de deux AcM dirigés contre différents épitopes de la protéine d'enveloppe E2 du virus de l'hépatite C (VHC) (Eren *et al.*, 2006). Cette stratégie thérapeutique intéresse aussi le domaine de l'oncologie. Deux AcM dirigés chacun contre la molécule HER2/neu sont actuellement évalués pour le traitement de certains cancers du sein : le trastuzumab, déjà sur le marché, et le pertuzumab. Ces deux AcM ont la particularité d'agir en synergie, le second bloquant la dimérisation (et ainsi la signalisation) de la molécule HER2/neu avec d'autres récepteurs de la même famille et le premier accélérant la dissociation du complexe HER2/EGF-R.

Enfin, il a été récemment proposé de substituer les anticorps polyclonaux anti-D, utilisés dans la prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle et dans le traitement du Purpura Thrombocytopenique Idiopathique (PTI), avec un cocktail de 25 anticorps recombinants, l'objectif initial étant d'évaluer l'efficacité d'un tel cocktail dans le traitement du PTI.

LA NOUVELLE (DEMIE)-VIE DES ANTICORPS MONOCLONAUX

L'optimisation de la région Fc des AcMs vise aussi à améliorer leur demie-vie sérique, régulée en grande partie par le récepteur Fc néonatal (RFcn) qui fixe les IgG au niveau de l'interface des domaines CH2-CH3 de leur région Fc. Le développement d'AcM chimériques et humanisés n'a pas seulement réduit l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques chez l'Homme mais a amélioré aussi la demie-vie sérique et donc l'efficacité thérapeutique de ces anticorps. La demie-vie sérique d'un anticorps humain de type IgG varie de quelques jours à quelques semaines selon l'isotype.

Le RFcn régule l'homéostasie des IgG circulantes chez l'Homme et la Souris. Le RFcn est une protéine hétéro-dimérique permettant le transport des IgG par un mécanisme d'association/dissociation des IgG dépendant du pH. A pH 6,0, la liaison Fc-RFcn est forte. Elle diminue progressivement lorsque le pH approche 7,4. La structure du RFcn est similaire à la structure des molécules de classe I du Complexe Majeur d'Histocompatibilité, constituées d'une chaîne α , associée de façon non-covalente à la β -2-microglobuline (Burmeister *et al.*, 1994). Le RFcn est exprimé sur les cellules endothéliales vasculaires (Borvak *et al.*, 1998), permettant de protéger les IgG sériques de la dégradation en les isolant des voies lysosomales et en les recyclant dans la circulation (Ober *et al.*, 2004).

Les différentes stratégies d'optimisation des interactions Fc-RFcn ont pour objectif de moduler positivement ou négativement la demie-vie sérique de l'anticorps, ainsi que sa biodistribution. Vaccaro et ses collaborateurs

(2005) ont mis au point un anticorps monoclonal d'isotype IgG1 muté dans sa région Fc qui, en fixant fortement le RFcn même à pH neutre (7,4), augmente la clairance des IgG endogènes sériques par compétition, puisque ces dernières ont un accès réduit au RFcn. Un tel anticorps pourrait s'utiliser pour traiter des maladies liées à de forts taux d'IgG sériques ou pour induire une clairance rapide d'AcM couplés à des drogues ou des toxines. Dall'Acqua et ses collègues (2002) ont aussi généré des IgG monoclonales mutées, ayant une affinité accrue pour le RFcn à pH 6,0 et ont montré l'importance du maintien de la dissociation Fc/RFcn à pH 7,4 : dans le cas contraire, les IgG ne sont plus libérées par le RFcn, ce qui peut entraîner un effet opposé à celui recherché. Enfin, Hinton et ses collaborateurs (2004) ont généré des IgG mutées ayant une affinité accrue à pH 6,0 et présentant une absence de fixation à pH 7,5. Ils ont ainsi montré une augmentation d'un facteur deux de la demie-vie sérique de leurs IgG mutantes dans des singes Rhésus.

Une autre approche pour augmenter la demie-vie sérique d'AcM ou de fragments d'AcM consiste à effectuer une modification chimique, la PEGylation [couplage chimique de polyéthylène glycol (PEG) sur des résidus cystéine], qui a également l'avantage de réduire leur immunogénicité (Chapman, 2002). La contribution majeure du PEG à l'effet sur la demie-vie est l'augmentation de la taille de la molécule au-dessus de la limite de filtration glomérulaire, ce qui est critique lorsqu'il s'agit de fragments Fab (50-52 kDa). Il est essentiel de pouvoir diriger la PEGylation sur des résidus de l'anticorps distants des régions CDR ou des régions effectrices du Fc pour ne pas affecter la spécificité et la fonctionnalité de l'anticorps ou du fragment d'anticorps. *In fine*, les résultats obtenus semblent prometteurs. Un fragment Fab (CDP 870) dirigé contre le TNF α a vu sa durée de vie prolongée de 14 jours après PEGylation de sa région charnière (Choy *et al.*, 2002).

Les progrès récents dans le domaine des fragments d'AcM optimisés permettent la sélection de formats ayant des propriétés optimisées en fonction de l'application recherchée (Wu & Senter, 2005) (Fig. 3). Les AcM entiers radio-conjugués ne sont en effet pas le format le plus favorable pour effectuer de l'imagerie ou de la radio-immuno-thérapie (RIT) *in vivo*. Leur demie-vie sérique élevée entraîne des bruits de fond importants, réduisant le contraste des images ou induisant une trop longue exposition des organes et tissus normaux aux radio-éléments, en particulier la moelle osseuse. Des fragments d'AcM ont donc été optimisés pour obtenir une clairance *in vivo* plus rapide. Les scFv (28 kDa) et les dimères de scFv (56-58 kDa) ont une demie-vie sérique de quelques heures (Huhlov & Chester, 2004). Des fragments de plus grandes tailles comme les minibodies (80 kDa) ont une clairance intermédiaire (Yazaki *et al.*, 2001). Des fragments encore plus grands comme les scFv-Fc (scFv fusionnés à une région Fc entière) (110-120 kDa) ont des propriétés pharmacocinétiques similaires à celles des AcM entiers grâce à leur région Fc qui leur permet de fixer le RFcn. Kenanova et ses colla-

borateurs ont ainsi pu montrer que l'introduction de mutations dans la région de fixation au RFcn d'une région Fc d'un scFv-Fc anti-ACE (antigène carcino-embryonnaire) entraîne une réduction de la demi-vie sérique de la forme mutante chez la souris (Kenanova *et al.*, 2005).

CONCLUSION

Après des débuts difficiles et décevants liés à l'utilisation d'AcM de souris, les AcM ont désormais commencé à trouver une place de choix dans l'arsenal thérapeutique, se traduisant par un accroissement quasi exponentiel de leur nombre depuis une dizaine d'années, avec aujourd'hui 23 AcM thérapeutiques sur le marché et plus de 250 testés dans des essais cliniques. Différentes stratégies d'optimisation des propriétés effectrices, pharmacocinétiques et de bio-distribution des AcM sont actuellement explorées : ingénierie des domaines variables et de la région constante, couplage à différentes molécules, mise au point de cocktails d'AcM, utilisation de fragments d'anticorps pouvant s'exprimer sous forme intra-cellulaire... L'ère des AcM ou de leurs fragments dérivés n'en est qu'à ses premiers pas et réserve sûrement bien d'autres surprises dans l'avenir.

Remerciements. – Les auteurs remercient leurs collègues qui participent à leurs travaux sur les anticorps monoclonaux, en particulier Mlle Charlotte BOIX, Mme Emmanuelle BONNIN et Mr Riad ABÈS, ainsi que le Pr. W. H. FRIDMAN pour ses conseils scientifiques et son soutien. Mr Charles-Antoine Dutertre est soutenu financièrement par une Bourse CIFRE ANRT-LFB # 134/ 2004.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams G. P., Schier R., McCall A. M., Simmons H. H., Horak E. M., Alpaugh R. K., Marks J. D. & Weiner L. M., High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. *Cancer Res.*, 2001, 61, 4750-4755.
- Bird R. E., Hardman K. D., Jacobson J. W., Johnson S., Kaufman B. M., Lee S. M., Lee T., Pope S. H., Riordan G. S. & Whitlow M., Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 1988, 242, 423-426.
- Borvak J., Richardson J., Medesan C., Antohe F., Radu C., Simionescu M., Ghetie V. & Ward E. S., Functional expression of the MHC class I-related receptor, FcRn, in endothelial cells of mice. *Int. Immunol.*, 1998, 10, 1289-1298.
- Boulianne G. L., Hozumi N. & Shulman M. J., Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature*, 1984, 312, 643-646.
- Burmeister W. P., Gastinel L. N., Simister N. E., Blum M. L. & Bjorkman P. J., Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor. *Nature*, 1994, 372, 336-343.
- Cartron G., Dacheux L., Salles G., Solal-Celigny P., Bardos P., Colombat P. & Watier H., Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*, 2002, 99, 754-758.
- Chapman A. P., PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002, 54, 531-534.
- Choy E. H., Hazleman B., Smith M., Moss K., Lisi L., Scott D. G., Patel J., Sopwith M. & Isenberg D. A., Efficacy of a novel PEGylated humanized anti-TNF fragment (CDP870) in patients with rheumatoid arthritis: a phase II double-blinded, randomized, dose-escalating trial. *Rheumatology*, 2002, 41, 1133-1137.
- Clynes R., Takechi Y., Moroi Y., Houghton A. & Ravetch J. V., Fc receptors are required in passive and active immunity to melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 652-656.
- Clynes R., Towers T. L., Presta L. G. & Ravetch J. V., Inhibitory Fc receptors modulate *in vivo* cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* 2000, 6, 443-446.
- Colby D. W., Kellogg B. A., Graff C. P., Yeung Y. A., Swers J. S. & Wittrup K. D., Engineering antibody affinity by yeast surface display. *Methods Enzymol.*, 2004, 388, 348-58.
- Dall'Acqua W. F., Woods R. M., Ward E. S., Palaszynski S. R., Patel N. K., Brewah Y. A., Wu H., Kiener P. A. & Langermann S., Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor: biological consequences. *J. Immunol.*, 2002, 169, 5171-5180.
- Davies J., Jiang L., Pan L. Z., LaBarre M. J., Anderson D. & Reff M., Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FcγRIII. *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, 74, 288-294.
- de Kruif J., Bakker A. B., Marissen W. E., Kramer R. A., Throsby M., Rupprecht C. E. & Goudsmit J., A human monoclonal antibody cocktail as a novel component of rabies postexposure prophylaxis. *Annu. Rev. Med.*, 2006, sous presse.
- Eren R., Landstein D., Terkieltaub D., Nussbaum O., Zauberman A., Ben-Porath J., Gopher J., Buchnick R., Kovjazin R., Rosenthal-Galili Z., Aviel S., Ilan E., Shoshany Y., Neville L., Waisman T., Ben-Moshe O., Kischitsky A., Foug S. K., Keck Z. Y., Pappo O., Eid A., Jurim O., Zamir G., Galun E. & Dagan S., Preclinical evaluation of two neutralizing human monoclonal antibodies against hepatitis C virus (HCV): a potential treatment to prevent HCV reinfection in liver transplant patients. *J. Virol.*, 2006, 80, 2654-2664.
- Ferrara C., Brunker P., Suter T., Moser S., Puntener U. & Umans P., Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous β1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi α-mannosidase II. *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 93, 851-861.
- Green L. L., Hardy M. C., Maynard-Curie C. E., Tsuda H., Louie D. M., Mendez M. J., Abderrahim H., Noguchi M., Smith D. H., Zeng Y. *et al.*, Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat. Genet.*, 1994, 7, 13-21.
- Hinton P. R., Johlfs M. G., Xiong J. M., Hanestad K., Ong K. C., Bullock C., Keller S., Tang M. T., Tso J. Y., Vasquez M. & Tsurushita N., Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 6213-6216.
- Huhlov A. & Chester K. A., Engineered single chain antibody fragments for radioimmunotherapy. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2004, 48, 279-288.
- Huston J. S., Levinson D., Mudgett-Hunter M., Tai M. S., Novotny J., Margolies M. N., Ridge R. J., Brucoleri R. E., Haber E., Crea R. *et al.*, Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, 5879-5883.
- Jones P. T., Dear P. H., Foote J., Neuberger M. S. & Winter G., Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 1986, 321, 522-525.
- Kenanova V., Olafsen T., Crow D. M., Sundaresan G., Subbarayan M., Carter N. H., Ikle D. N., Yazaki P. J., Chat-

- zioannou A. F., Gambhir S. S., Williams L. E., Shively J. E., Colcher D., Raubitschek A. A. & Wu A. M., Tailoring the pharmacokinetics and positron emission tomography imaging properties of anti-carcinoembryonic antigen single-chain Fv-Fc antibody fragments. *Cancer Res.*, 2005, 65, 622-631.
- Köhler G. & Milstein C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256, 495-497.
- Lifely M. R., Hale C., Boyce S., Keen M. J. & Phillips J., Glycosylation and biological activity of CAMPATH-1H expressed in different cell lines and grown under different culture conditions. *Glycobiology*, 1995, 5, 813-822.
- Lonberg N., Taylor L. D., Harding F. A., Tronstine M., Higgins K. M., Schramm S. R., Kuo C. C., Mashayekh R., Wymore K., McCabe J. G. *et al.*, Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature*, 1994, 368, 856-859.
- McCafferty J., Griffiths A. D., Winter G. & Chiswell D. J., Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 1990, 348, 552-554.
- Miller R. A., Maloney D. G., Warnke R. & Levy R., Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotype antibody. *N. Engl. J. Med.*, 1982, 306, 517-522.
- 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.
- Nadler L. M., Stashenko P., Hardy R., Kaplan W. D., Button L. N., Kufe D. W., Antman K. H. & Schlossman S. F., Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen. *Cancer Res.*, 1980, 40, 3147-3154.
- Queen C., Schneider W. P., Selick H. E., Payne P. W., Landolfi N. F., Duncan J. F., Avdalovic N. M., Levitt M., Junghans R. P. & Waldmann T. A., A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 10029-10033.
- Nowakowski A., Wang C., Powers D. B., Amersdorfer P., Smith T. J., Montgomery V. A., Sheridan R., Blake R., Smith L. A. & Marks J. D., Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 11346-11350.
- Ober R. J., Martinez C., Vaccaro C., Zhou J. & Ward E. S., Visualizing the site and dynamics of IgG salvage by the MHC class I-related receptor, FcRn. *J. Immunol.*, 2004, 172, 2021-2029.
- 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.
- Schier R., McCall A., Adams G. P., Marshall K. W., Merritt H., Yim M., Crawford R. S., Weiner L. M., Marks C. & Marks J. D., Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J. Mol. Biol.*, 1996, 263, 551-67.
- Shields R. L., Namenuk A. K., Hong K., Meng Y. G., Rae J., Briggs J., Xie D., Lai J., Stadlen A., Li B., Fox J.A. & Presta L. G., High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fcγ RI, Fcγ RII, Fcγ RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fcγ R. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 6591-6604.
- Shinkawa T., Nakamura K., Yamane N., Shoji-Hosaka E., Kanda Y., Sakurada M., Uchida K., Anazawa H., Satoh M., Yamasaki M., Hanai N. & Shitara K., The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 3466-3473.
- Sibérel S., de Romeuf C., Bihoreau N., Fernandez N., Meterreux J. L., Regenman A., Nony E., Gaucher C., Glacet A., Jorieux S., Klein P., Hogarth M.P., Fridman W.H., Bourrel D., Beliard R. & Teillaud J. L., Selection of a human anti-RhD monoclonal antibody for therapeutic use: impact of IgG glycosylation on activating and inhibitory Fcγ R functions. *Clin. Immunol.*, 2006, 118, 170-179.
- Skerra A. & Plückthun A., Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science*, 1988, 240, 1038-1041.
- Smith G. P., Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, 228, 1315-1317.
- Takeda S., Naito T., Hama K., Noma T. & Honjo T., Construction of chimaeric processed immunoglobulin genes containing mouse variable and human constant region sequences. *Nature*, 1985, 314, 452-454.
- Teeling J. L., French R. R., Cragg M. S., van den Brakel J., Pluyter M., Huang H., Chan C., Parren P. W., Hack C. E., Dechant M., Valerius T., van de Winkel J.G. & Glennie M. J., Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood*, 2004, 104, 1793-1800.
- Tomizuka K., Shinohara T., Yoshida H., Uejima H., Ohguma A., Tanaka S., Sato K., Oshimura M. & Ishida I., Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and κ loci and expression of fully human antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 722-727.
- Umama P., Jean-Mairet J., Moudry R., Amstutz H. & Bailey J. E., Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat. Biotechnol.*, 1999, 17, 176-180.
- Vaccaro C., Zhou J., Ober R. J. & Ward E. S., Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate *in vivo* antibody levels. *Nat. Biotechnol.*, 2005, 23, 1283-1288.
- Wu A. M. & Senter P. D., Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat. Biotechnol.*, 2005, 23, 1137-1146.
- Yamane-Ohnuki N., Kinoshita S., Inoue-Urakubo M., Kusunoki M., Iida S., Nakano R., Wakitani M., Niwa R., Sakurada M., Uchida K., Shitara K. & Satoh M., Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, 87, 614-622.
- Yazaki P. J., Wu A. M., Tsai S. W., Williams L. E., Ikler D. N., Wong J. Y., Shively J. E. & Raubitschek A. A., Tumor targeting of radiometal labeled anti-CEA recombinant T84.66 diabody and t84.66 minibody: comparison to radioiodinated fragments. *Bioconjug. Chem.*, 2001, 12, 220-228.