

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences, Technologies

UMR CNRS 6239 GICC

Equipe « Immunogénomique et anticorps thérapeutiques »

THÈSE présentée par :

Charlotte MAGDELAINE-BEUZELIN

soutenue le 5 mars 2010

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**
Sciences de la Vie et de la Santé/Immunologie

**Facteurs immunologiques et génétiques impliqués
dans la variabilité de la pharmacocinétique des
anticorps thérapeutiques**

THÈSE dirigée par :

Monsieur WATIER Hervé

Professeur, Université François – Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

Madame BENE Marie-Christine
Monsieur BOUCRAUT José

Professeur, Université de Nançy 2
Maître de Conférence, HDR, Université de Marseille II

JURY :

Monsieur LEBRANCHU Yvon
Monsieur PAINAUD Gilles
Monsieur THULLIER Philippe
Madame BENE Marie-Christine
Monsieur BOUCRAUT José
Monsieur WATIER Hervé

Professeur, Université François - Rabelais de Tours
Professeur, Université François - Rabelais de Tours
Médecin, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées
Professeur, Université de Nançy 2
Maître de Conférence, HDR, Université de Marseille II
Professeur, Université François - Rabelais de Tours

A Benoit, Elliot et Thomas

Remerciements

Madame Béné, je vous remercie d'avoir accepté avec autant d'enthousiasme de juger ce travail.

Monsieur Boucraut, je vous remercie d'être rapporteur de ma thèse. Certains projets vous appellent sur Tours, je vous souhaite une collaboration enrichissante.

Monsieur Lebranchu, je vous remercie de participer à mon jury de thèse. Nous avons depuis le mois de janvier de cette année d'autres occasions de parler d'immunologie. Je suis très heureuse de découvrir avec le HLA et les greffes d'organe une autre facette de cette discipline.

Merci Gilles de juger mon travail. Je te prie de recevoir ici toute ma reconnaissance pour les travaux dans lesquels nous sommes associés, le CePiBAC, mais également POLYPHAR qui aura supporté ma dernière année de thèse.

Monsieur Thullier, je vous remercie de faire partie de mon jury de thèse. Vos centres d'intérêt scientifiques vous ont rapproché de l'équipe d'Hervé et du GDR « Anticorps et Ciblage Thérapeutique », je vous souhaite de bons partenariats.

Hervé, trouve ici le témoignage de ma reconnaissance pour ces années passées en Immunologie depuis l'internat jusqu'à l'aboutissement de cette thèse. Même si celle-ci ne sert pas les objectifs que nous nous étions initialement fixés, je suis contente d'avoir mené à bien ce travail et je te remercie de m'avoir encouragé dans cette voie. Je te suis reconnaissante également d'avoir respecté mes choix pour des travaux proches de la routine d'analyse médicale. Cependant, ma participation à des projets d'immunologie plus fondamentale, et en particulier à l'exploration de FcRn cette dernière année m'a permis de découvrir des techniques de biologie moléculaire et cellulaire qui me serviront très rapidement je pense. Sache qu'en tant qu'étudiante puis comme assistante, j'ai beaucoup apprécié (et envié) ta faculté à rendre limpide des concepts pointus d'immunologie, qualité que j'espère pouvoir moi-même continuer de travailler, même si l'enseignement n'est plus tout à fait une de mes missions. Je suis contente de trouver avec le HLA, une autre façon d'explorer l'immunologie. Nos projets respectifs nous amèneront peut-être à travailler ensemble.

Monsieur Bardos, vous m'avez accueillie dans votre laboratoire pour mes stages d'internes, mon DEA et vous m'avez confié un poste d'AHU, recevez ici le témoignage de ma reconnaissance.

Danielle, je vous remercie de votre soutien pendant les huit années que j'ai passé à vos côtés. J'ai beaucoup apprécié l'apprentissage de l'auto-immunité avec toute la rigueur que requiert cette discipline. A travers elle et avec vous, j'aurais appris la mise au point et la validation des méthodes de dosage « maison », les déceptions qui accompagnent les loupés, l'entêtement à comprendre ce qui n'a pas été et surtout la satisfaction du travail accompli. Je garde en mémoire notre virée en Suisse et le musée Tinguely, nos séances de FMC. Je vous suis très reconnaissante de la grande humanité que vous m'avez toujours témoignée.

Gilles, je ne souhaite pas réduire notre complicité à la liste exhaustive des sujets de conversation que nous avons abordés. Merci d'avoir partagé ces moments avec moi et de ton soutien maintes fois assuré.

Valérie, cette année, passée trop vite, fut très instructive et c'est en grande partie à toi que je le dois. Je te remercie beaucoup du temps que tu m'as consacré, de ta franchise, de ta patience, de ton humanité et de tout ce que tu m'as permis de partager avec toi, drôle ou pas. J'aurais aimé te connaître bien plus tôt.

Marc, je te remercie de ton aide dans les travaux qui nous associent, en particulier en biologie moléculaire bien sûr. Je retiendrai ces moments de doute existentiel sur la couleur la plus appropriée ou l'angle le plus adéquat pour représenter en trois dimensions les molécules des figures à publier. Tu as été patient et ma sensibilité artistique a pu pleinement s'exprimer ! Pour ma part, je vais tenter d'entretenir le souvenir de tes remarques quelquefois désarmantes sur ma garde-robe. Bonne chance pour la suite.

Patrick, merci infiniment de ta disponibilité et des réponses simples à mes questions de novice en PCR quantitative. Tu m'as été d'une aide très précieuse.

Audrey et Marie-Noëlle, vous ne m'en voudrez pas de vous remercier dans un même petit mot, vu que dans la vie de labo vous êtes tout autant complices ! Merci donc de votre motivation et de votre travail qui aura fait avancer le mien, je pense à PEPIT' bien sûr mais aussi aux analyses de routine hospitalière. Les ATI et les déboirs multiples et variés des anticorps induits pour l'une, *FCGRT* décliné à l'envi pour l'autre.

Babeth, Christiane, Isabelle, Céline, Clotilde, Michèle, Monique, Christine, Anne-Claire, Céline, Claude, Philippe et Jean-Michel, trouvez ici le témoignage de mon affection et de ma gratitude pour votre accueil il y a huit ans ainsi que votre soutien et votre convivialité constants pendant ces années. J'ai beaucoup apprécié travailler avec vous.

Elodie, Natacha, Ninie, David, Benoît, Alexis, Michelle, Raphaël, Emmanuel et Germain. Je ne sais pas, au moment où j'écris ces quelques lignes, où en sont vos paris sur notre dos, pauvres thésards, mais Julien et moi aurons tenu bon, c'est l'essentiel ! A votre contact, j'aurais appris de multiples choses vu les horizons très différents dont vous venez tous : en vrac Jay-Gould, Bershka, Be-quizz, la tarte à la framboise, mais aussi la culture cellulaire, et la culture linux, le tri de cellules, la biologie moléculaire, la PK.....Merci pour les bons moments passés avec vous. Bonne route !

A la mémoire de Mamita, Grand-Père Christian et Papy, j'aurais aimé vous garder encore un peu.

Papa, Maman et Edouard pour être toujours si attentifs.

Emilie, Jason and Nathan. Thank you for your help with my english...and all the other most important things.

Laurence, Dominique, Martin et Julie, Mathieu, Anna, Charles et Paul, Jean-Baptiste, merci d'être toujours là pour me soutenir. Clémentine, la thèse ce n'est qu'un (mauvais ?) moment à passer, courage !

Mamie, Simone et Grand-Père, Amatxi et Jacques, Anne et Ahe, merci de votre attention constante. Nicolas, nos chemins professionnels se ressemblent beaucoup : merci de tes conseils.

Mes très chers amis : Cendra et Christophe, Caro et Stéphan, Cathy, Céline et Médéric, Stéphanie, Anne-Sophie et Jean-Baptiste, Anne et Pierre, Géraldine et Florent, Bertille et Jeff, Sarah et Xavier, Romain et Claire, Virginie et Eric ... puissions-nous ne jamais nous perdre de vue.

Résumé

Facteurs immunologiques et génétiques impliqués dans la variabilité de la pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques

A l'instar des pionniers de la sérothérapie qui s'interrogeaient déjà sur la pharmacologie des anticorps, nous avons analysé les facteurs immunologiques susceptibles d'influencer la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux recombinants. Leurs séquences peptidiques et les gènes codant leurs domaines variables ont été précisément décrits afin d'évaluer leur divergence par rapport au répertoire germinale humain. En ce qui concerne les domaines constants, nous avons identifié les déterminants allotypiques qu'ils portent, et recherché si les allotypes G1m du patient pouvaient influencer la survenue d'anticorps induits, en prenant l'infliximab comme modèle d'étude. Même si cela ne semble pas être le cas pour cet anticorps chimérique, la mise au point des tests de détection des anticorps induits nous a permis de quantifier pour la première fois leurs effets sur la pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques. La survenue d'anticorps anti-infliximab provoque une diminution de moitié de la demi-vie d'élimination de cet anticorps ; des résultats analogues ont été obtenus avec l'adalimumab. Une autre piste de recherche serait d'explorer FcRn, le récepteur néonatal des IgG impliquait dans leur métabolisme et dont les polymorphismes pourraient influencer la pharmacocinétique.

Mots-clés : Anticorps monoclonaux recombinants – infliximab – antibodies to infliximab (ATI) – allotypes – pharmacocinétique – FcRn

Résumé en anglais

Immunologic and genetic factors involved in the variability of therapeutic antibody pharmacokinetics

As the pioneers of serotherapy who already wondered about antibody pharmacology, we have analysed the immunologic factors that may influence recombinant therapeutic antibody pharmacokinetics. Their peptidic sequences and the genes encoding their variable domains were precisely described in order to evaluate their divergence from the human germline repertoire. We also identified the allotypic determinants they carry and explored whether the patient G1m allotypes can influence the onset of induced antibody, taking infliximab as a model. Although it does not seem to be the case for this chimaeric antibody, the setting up of assays detecting induced antibodies allowed us to quantify for the first time their influence on therapeutic antibody pharmacokinetics. Antibodies against infliximab are associated with a half decrease in the elimination half life of infliximab; analogous results were obtained for adalimumab. Another interesting way of investigation would be to explore FcRn, the IgG neonatal Fc receptor which plays a role in IgG metabolism and whose genetic polymorphisms may influence IgG pharmacokinetics.

Keywords: recombinant monoclonal antibodies – infliximab – antibodies to infliximab (ATI) – allotypes – pharmacokinetics – FcRn

Table des matières

Remerciements.....	3
Résumé	7
Résumé en anglais.....	8
Table des matières.....	9
Liste des tableaux.....	12
Liste des figures	14
Liste des annexes.....	21
INTRODUCTION.....	22
GENERALITES.....	27
1- De la sérothérapie aux anticorps monoclonaux recombinants : structure, ingénierie et immunogénicité.....	28
1-1 Sérothérapie et immunoglobuline humaines polyclonales	28
1-2 Les anticorps monoclonaux murins.....	35
1-3 Les anticorps monoclonaux recombinants.....	40
1-3-1 Structure des anticorps monoclonaux recombinants.....	41
1-3-2 Degré d'humanisation	42
1-3-3 Format.....	43
1-4 Les anticorps monoclonaux recombinants chimériques.....	45
1-4-1 Ingénierie des anticorps chimériques	45
1-4-2 Choix de l'isotype de chaîne légère et de chaîne lourde	48
1-4-3 Glycosylation des anticorps thérapeutiques.....	54
1-5 Les anticorps monoclonaux recombinants humanisés et complètement humains.....	58
1-5-1 Ingénierie des anticorps humanisés.....	58
1-5-2 Ingénierie des anticorps complètement humains	60
1-5-3 Structure tridimensionnelle des domaines variables	64
1-5-4 Motifs d'agrégation	66
1-6 Immunogénicité des anticorps monoclonaux recombinants.....	67
1-6-1 Anticorps anti-anticorps	67
1-6-2 Méthodes de détection des HACA et HAHA	68
1-6-3 Immunogénicité comparée des anticorps thérapeutiques	74
2- Facteurs génétiques d'immunogénicité des anticorps monoclonaux recombinants	77
2-1 Allotypes.....	77

2-1-1 Système allotypique des IgG	78
2-1-2 Système allotypique Km.....	82
2-1-3 Allotypes portés par les anticorps thérapeutiques IgG1	83
2-2 Prédiction d'épitopes T.....	84
2-3 Influence d'autres caractéristiques individuelles des patients traités.....	86
2-4 Conclusion sur l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques.....	87
3- Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux recombinants et immunogénicité.....	89
3-1 FcRn, un récepteur d'IgG aux multiples facettes (article n°1)	90
3-2 Pharmacocinétique et biodistribution	95
3-2-1 Demi-vie et distribution.....	95
3-2-2 Concentration des anticorps.....	96
3-2-3 Immunogénicité et pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques anti-TNF- α	
RESULTATS	100
1- Présentation générale.....	101
2- Pharmacocinétique de l'adalimumab et de l'infliximab en gastro-entérologie : influence des anticorps induits	102
2-1 Introduction.....	102
2-2 Article n°2 : Influence of trough levels and immunogenicity on long-term outcome of adalimumab therapy in Crohn's disease	104
2-3 Article n°3 : Infliximab pharmacokinetics in inflammatory bowel disease patients ...	118
2-4 Discussion.....	126
3- Recherche de facteurs structuraux et génétiques impliqués dans l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques	130
3-1 Introduction.....	130
3-2 Evaluation de l'immunogénicité des domaines variables des anticorps thérapeutiques à partir de données structurales : exemples des anticorps anti-cancéreux et des anticorps anti-TNF- α	133
3-2-1 Article n°4 : Structure-functions relationships of the variable domains of monoclonal antibodies approved for cancer treatment.....	133
3-2-2 Analyse structurale des domaines variables des anticorps thérapeutiques ciblant le TNF- α	150
3-3 Analyse de facteurs génétiques candidats pouvant influencer l'immunogénicité de l'infliximab	159

3-3-1 Article n°5 : IgG1 heavy chain-coding gene polymorphism (G1m allotypes) and development of antibodies-to-infliximab.....	159
3-3-2 Résultats complémentaires : polymorphisme <i>FCGR3A-158V/F</i> et développement des ATI.....	165
3-4 Discussion.....	166
4- Pharmacocinétique et biodistribution des anticorps thérapeutiques : exemple de l'ophtalmologie	170
4-1 Introduction.....	170
4-2 Therapeutic antibodies in ophthalmology: old is new again (article n°6).....	171
4-3 Discussion.....	177
DISCUSSION	178
BIBLIOGRAPHIE	187
ANNEXES.....	220
Annexe 1	221
Annexe 2	225
Annexe 3	234
Résumé	241
Résumé en anglais.....	241

Liste des tableaux

Tableau I : Anticorps de souris et de rat approuvés pour usage thérapeutique	37
Tableau II: Anticorps chimériques approuvés pour un usage thérapeutique (Wang <i>et al.</i> , 2009 ; Jefferis & Lefranc, 2009 ; Beck <i>et al.</i> , 2009).	46
Tableau III: Caractéristiques fonctionnelles des quatre sous-classes d'IgG humaines (Alyanakian <i>et al.</i> , 2003 ; Salfeld, 2007 ; Jefferis, 2007 ; Bruhns <i>et al.</i> , 2009).	50
Tableau IV : Anticorps humanisés utilisés en médecine humaine (Wang <i>et al.</i> , 2009 ; Jefferis & Lefranc, 2009 ; Beck <i>et al.</i> , 2009).	59
Tableau V : Anticorps monoclonaux recombinants complètement humains (Lonberg, 2008 ; Wang <i>et al.</i> , 2009 ; Jefferis & Lefranc, 2009 ; Beck <i>et al.</i> , 2009).	63
Tableau VI : Résultats de l'étude bibliographique relative à l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques publiées en 2005 par Hwang et Foote	75
Tableau VII : Nomenclatures, localisations et nature des acides caractérisant le système allotypique G1m (De Lange, 1988 ; Grubb, 1995 ; Jefferis & Lefranc, 2009).	78
Tableau VIII : Haplotypes du système G1m et fréquence dans les grands groupes humains (De Lange, 1988).	79
Tableau IX : Système allotypique de la chaîne lourde $\gamma 3$ (De Lange, 1988 ; Jefferis & Lefranc, 2009). Les deux nomenclatures des allotypes G3m sont indiquées, la nomenclature alphabétique étant entre parenthèses.	81
Tableau X : Haplotypes des allotypes Gm (Lefranc G <i>et al.</i> , 1982 ; Jefferis & Lefranc, 2009).	82
Tableau XI : Système allotypique de la chaîne légère kappa (De Lange, 1988).	83
Tableau XII : Homologie des séquences des trois anticorps anti-TNF-α avec ou sans les régions CDR-IMGT	154

Tableau XIII : Gènes IMGT V, (D) et J impliqués dans la construction des anticorps thérapeutiques ciblant le TNF-α humain.....	155
Tableau XIV : Index de germinalité de l’infliximab, du certolizumab pegol et de l’adalimumab. Pour chaque anticorps et chacun de leur 8 FR-IMGT figurent le nombre d’acides aminés différents entre la séquence des FR-IMGT et les gènes V et J les plus proches dans le répertoire humain ainsi que le nombre total d’acides aminés par FR-IMGT (n/n’). L’index de germinalité correspond au rapport entre le nombre de résidus conservés pour les domaines VH et VL et le nombre total de résidus des 8 FR-IMGT, soit $\Sigma(n'-n)/\Sigma n'$	157
Tableau XV : Patients développant des ATI en fonction du génotype <i>FCGR3A</i>.	165

Liste des figures

Figure 1 : La sérothérapie. Le médicament utilisé est le sérum de l'animal lui-même. Les chevaux immunisés étaient régulièrement saignés : certains ont donné plus de 200 litres de sang en douze ans. Le sérum était ensuite titré (en unité de neutralisation), stérilisé, conditionné en ampoules et distribué. En Allemagne comme en France, l'origine équine du sérum marque les esprits comme en témoignent les cartes postales de l'époque (a) et cette caricature publiée dans le *Lustige Blätter* en 1894 (b). Documents gracieusement prêtés par le Pr Hervé Watier. Droits réservés ; documents issus du fonds Watier du Service Commun de Documentation de l'Université de Tours.....28

Figure 2 : Concept de von Pirquet à propos du développement de la maladie sérique chez l'homme (d'après AM Silverstein *A History of Immunology* (1989), figure modifiée à partir de l'original de von Pirquet). Les méthodes de dosage utilisées sont basées sur l'aptitude d'un sérum de lapin anti-sérum de cheval à précipiter l'antigène, i.e. le sérum de cheval et celle des anticorps humains induits (anti-sérum de cheval) à précipiter le sérum de cheval (Silverstein, 2000).....30

Figure 3 : Représentation semi-logarithmique de la radioactivité moyenne des protéines après injection à des lapins de γ -globulines bovines (trait plein) ou de γ -globulines de lapins (trait pointillé), marquées à l'iode 131 (d'après Talmage *et al.*, 1951). L'élimination des γ -globulines hétérologues est représentée par une courbe en trois phases, comparable à celle obtenue par Glenny et Hopkins, 1923. En revanche, les γ -globulines homologues ont une élimination en seulement deux phases.32

Figure 4 : Technique des hybridomes (d'après Chartrain & Chu, 2008). Les souris Balb/c sont exposées à l'antigène humain d'intérêt par voie sous-cutanée. Elles reçoivent plusieurs injections favorisant à la fois le gain d'affinité des anticorps pour l'antigène et la commutation de classe. L'immunisation est stimulée par l'utilisation d'adjuvants comme l'adjuvant de Freund. Les cellules B spléniques murines sont extraites après sacrifice des animaux. Ces cellules exprimant naturellement l'enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transférase (HGPRT) sont fusionnées en présence de polyéthylène glycol avec des cellules de myélome murin non sécrétant (cellules tumorales immortelles) déficientes en HGPRT. Quatre populations de cellules peuvent

être obtenues : des cellules spléniques et des cellules myélomateuses non fusionnées, des cellules hybrides immortelles qui possèdent HGPRT (hybridomes) et des hybridomes instables. Les cellules sont cultivées dans un milieu riche en hypoxanthine, aminoptérine et thymidine (HAT) permettant aux seules cellules à la fois immortelles et capables d'utiliser la voie HGPRT de persister dans le milieu. Puis chaque hybridome est isolé par dilution limitante. Les anticorps produits par chacun d'eux sont caractérisés du point de vue de leur structure, de leur spécificité antigénique et de leur affinité. Peut alors être sélectionné le clone producteur de l'anticorps murin le plus intéressant pour sa spécificité et ses propriétés neutralisantes.36

Figure 5 : Représentation tridimensionnelle d'une IgG1k humaine. Il s'agit de la représentation du squelette carboné de l'anticorps monoclonal b12 dirigé contre la glycoprotéine d'enveloppe gp210 du VIH, la première, et jusqu'à présent la seule, IgG1k humaine entière obtenue par cristallographie (Saphire *et al.*, 2001) (PDBand IMGT/3Dstructure-DB, <http://imgt.org> : 1hzh). La figure a été générée avec le logiciel VMD (Humphrey *et al.*, 1996). Les deux mêmes chaînes lourdes $\gamma 1$ figurent en gris alors que les deux chaînes légères sont en bleu liées entre elles par des ponts disulfure. Ces quatre chaînes sont repliées en domaines : un domaine variable VH et trois domaines constants CH1, CH2 et CH3 pour chaque chaîne lourde avec une région charnière se situant entre les domaines CH1 et CH2. Chaque chaîne légère κ est quant à elle composée d'un domaine variable VL et un domaine constant CL aussi appelés V-KAPPA et C-KAPPA (Lefranc & Lefranc, 2001). Les trois bras de l'anticorps correspondent aux deux bras Fab (*Fragment antigen binding*) et un Fc (*Fragment crystallised*). Chaque Fab porte un site de liaison à l'antigène ou paratope (les boucles CDR, *complementarity determining regions* figurent en rouge). Contrairement à la représentation schématique classique d'un anticorps sous la forme d'un Y figé et symétrique, la structure cristalline illustre parfaitement l'asymétrie de la molécule qui résulte de la grande flexibilité des trois bras autour des ponts disulfure de la région charnière.41

Figure 6 : Production des anticorps chimériques : exemple d'un anticorps anti-TNF- α

humain (d'après Bendtzen, 2006 (site de l'IIR)). ① Les souris sont immunisées avec l'antigène d'intérêt, ici du TNF- α humain recombinant. ② Les cellules B murines spléniques ou splénocytes sont utilisées pour préparer des hybridomes (Figure 4). Les clones obtenus produisant l'anticorps anti-TNF- α humain sont isolés. ③ Les séquences (soit d'ADN génomique réarrangé, soit d'ADN complémentaire) codant les domaines variables murins d'une part et les séquences codant les régions constantes humaines issues de plasmocytes ou de lymphocytes B humains d'autre part sont isolées, purifiées et ④ fusionnées pour coder ensemble un anticorps chimérique spécifique du TNF- α humain. ⑤ Ces séquences hybrides sont ensuite clonées dans des vecteurs d'expression qui sont à leur tour transfectés dans des cellules de mammifères (CHO, Sp2/0) afin de produire des anticorps chimériques correctement glycosylés (Knight *et al.*, 1993 ; Reff *et al.*, 1994).47

Figure 7 : Isoformes d'IgG2 humaines impliquant différentes conformations de ponts

disulfure inter-chaînes (d'après Wypych *et al.*, 2008). Noter que seule l'isoforme IgG2-A présente des ponts disulfure inter-chaînes strictement localisés dans la région charnière. Les isoformes IgG2-B et IgG2-A/B ont des liaisons disulfures stables impliquant des résidus cystéine de la charnière avec la cystéine en C-terminal du domaine constant (CL) de chaîne légère (blanc) d'une part, et une cystéine du premier domaine constant (CH1) de chaîne lourde (gris) d'autre part. L'isoforme pour lequel la charnière est associée aux deux bras Fab par des ponts disulfure est appelé IgG2-B, alors que l'isoforme avec un bras Fab indépendant de la charnière (comme pour IgG2-A) et un bras Fab connecté à la charnière (comme pour IgG2-B) est appelé IgG2-A/B.52

Figure 8 : Structure de l'éculizumab (Soliris®) (d'après Rother *et al.*, 2007). L'éculizumab

est un anticorps humanisé associant des régions déterminant la complémentarité d'origine murine et des régions charpentes humaines. Ses domaines constants combinent le CH1 et la charnière d'une IgG2 humaine avec le CH2 et le CH3 d'une IgG4 humaine n'activant pas la cascade du complément et ne recrutent pas les effecteurs cellulaires par cette portion Fc hybride.53

Figure 9 : Organisation des sucres associés aux IgG (modifié d'après Carter, 2006). Les IgG sont des protéines N-glycosylées au niveau du deuxième domaine constant de leurs chaînes lourdes (CH2), sur une asparagine conservée en position 297 (Asn297). Ces sucres forment un complexe bi-antenné comprenant un noyau (ou core) composé de sept résidus : 4 résidus N-acétylglucosaminyles et 3 mannosyles sur lesquels sont greffés d'autres résidus sucrés de nature variée : α -2,6-fucosyle, β -1,4-galactosyle, α -2,6-sialyle. Un résidu N-acétylglucosaminyle dit bisectaire ou intercalaire peut se situer entre les deux antennes.55

Figure 10 : Ingénierie des anticorps humanisés (d'après Marasco & Sui, 2007). Les régions déterminant la complémentarité d'un anticorps monoclonal murin (mCDR) sont greffées sur les régions charpentes d'un anticorps humain. Ces régions charpentes présentent une très grande homologie avec les régions correspondantes sur l'anticorps murin. VH, domaine variable de chaîne lourde ; VL, domaine variable de chaîne légère ; hFR, régions charpentes humaines.58

Figure 11 : Principe du *phage display* (d'après Nissim & Chernajovsky, 2008). A- En combinant les gènes codant les fragments d'anticorps (Fab ou bien scFv, comme sur cette figure) humains au gène codant une protéine d'enveloppe de bactériophages filamenteux, la séquence portant l'information génétique est liée à la fonction de la protéine produite puisque les fragments sont exprimés avec la protéine d'enveloppe à la surface des bactériophages (VH en rouge, VL en violet, protéine d'enveloppe en bleu). B- La banque ainsi constituée peut contenir des millions voire des milliards de phages exposant des fragments d'anticorps de spécificités différentes. C- Les phages exprimant à leur surface un fragment spécifique de l'antigène cible immobilisé sont sélectionnés, les autres sont éliminés par lavages. Les phages immobilisés sont élués, utilisés pour infecter *Escherichia coli* et ainsi amplifiés. Ils subissent à nouveau une étape de sélection, permettant ainsi D- l'enrichissement du phage d'intérêt. E- Le phage sélectionné est amplifié puis la séquence codant le fragment est isolée pour subir une maturation d'affinité par exemple et être intégrée dans un vecteur contenant les séquences codant les domaines constants d'un anticorps humain.61

Figure 12 : Production d'anticorps humains par souris transgéniques (d'après Marasco & Sui, 2007). Les gènes codant les immunoglobulines de la souris ont été invalidés et remplacés par leurs homologues humains. La souris transgénique obtenue est capable de produire des anticorps humains contre un antigène d'intérêt par lequel elle a été immunisée. Les cellules B spléniques murines sont récoltées et immortalisées par fusion avec des cellules d'une lignée de myélome selon la technique des hybridomes (Figure 4). Les hybridomes sont caractérisés et sélectionnés pour répondre aux exigences de spécificité, d'affinité et biochimiques attendues de l'anticorps humain à développer.62

Figure 13 : Représentation tridimensionnelle des domaines V-KAPPA et VH du bévacizumab. Le domaine V-KAPPA (V-J REGION) résulte du réarrangement d'un gène IGKV et d'un gène IGKJ tandis que le domaine VH (V-D-J REGION) résulte du réarrangement d'un gène IGHV, d'un gène IGHD et d'un gène IGHJ. Les gènes IGKV et IGHV codent la plus grande partie des domaines V-KAPPA et VH respectivement. Des six boucles CDR constituant le paratope trois sont localisées sur V-KAPPA et trois sur VH. La boucle CDR3 de V-KAPPA a la particularité d'être codée par l'extrémité 3' d'IGKV et l'extrémité 5' d'IGKJ et la boucle CDR3 de VH est codée par l'extrémité 3' d'IGHV, IGHD et l'extrémité 5' d'IGHJ. PDB : 1cz8, bévacizumab. La figure a été générée avec le logiciel VMD (Humphrey *et al.*, 1996).65

Figure 14 : ELISA en format « double antigène ». A- L'anticorps thérapeutique (noir), immobilisé sur la microplaque permet la capture des anticorps induits anti-anticorps (gris). Leur fixation est révélée par l'anticorps thérapeutique couplé à un marqueur enzymatique, radioactif ou luminescent (jaune). B- Cependant, les anticorps thérapeutiques circulants peuvent se complexer aux anticorps induits et gêner leur détection, conduisant à un résultat faussement négatif ou artificiellement bas. C- Les facteurs rhumatoïdes, le plus souvent des IgM anti-IgG (bleu) peuvent être présents dans le sérum des patients et se comporter comme les anticorps induits, donnant lieu à des résultats faussement positifs.70

Figure 15 : Principe de la technique SPEAD ELISA. ① L'anticorps thérapeutique (noir), cible des anticorps induits (gris) recherchés, est biotinylé (rond rouge). Il est ensuite incubé avec l'échantillon sérique pouvant contenir des anticorps induits, l'anticorps thérapeutique circulant libre ou des complexes associant les deux espèces. Les complexes formés, impliquant l'anticorps biotinylé, sont capturés par la streptavidine

sensibilisant une microplaque. En revanche, l'anticorps thérapeutique libre sont éliminés par lavages. ② Le traitement des puits par acide acétique permet de libérer les anticorps induits de l'anticorps thérapeutique biotinylé mais aussi de l'anticorps thérapeutique naturel. Les surnageants sont transférés dans une microplaque en présence de tampon Tris afin de neutraliser le pH. ③ La solution obtenue est utilisée pour sensibiliser une nouvelle microplaque. ④ Un ELISA direct employant l'anticorps thérapeutique marqué à la peroxydase (jaune) permet de détecter les anticorps induits.72

Figure 16 : Principe de la technique ACE : exemple du dosage des anticorps anti-rituximab (d'après Schmidt *et al.*, 2009). 1- Les fragments $F(ab')_2$ de rituximab ($F(ab')_2$ -RTX) qui sensibilisent les puits de la microplaque permettent de capturer les anticorps anti-rituximab (anti-RTX) libres ou complexés à du rituximab dans l'échantillon de sérum. 2- Le rituximab libre est éliminé lors des lavages. 3- Après incubation avec l'acide acétique, les anticorps anti-rituximab sont dissociés d'une part des complexes qu'ils formaient avec les $F(ab')_2$ de rituximab et d'autre part des complexes les associant au rituximab. 4- Les surnageants sont transférés dans une nouvelle microplaque préalablement remplie de tampon Tris-HCl afin de neutraliser le pH. 5- Après incubation et lavage, du rituximab biotinylé (Bio) est ajouté dans chaque puits et sa fixation révélée par l'apport de streptavidine couplée à la peroxydase (SA-HRP).73

Figure 17 : Alignements IMGT des séquences peptidiques des domaines variables de chaîne lourde (VH) et de chaîne légère (V-KAPPA) de trois anticorps thérapeutiques monoclonaux recombinants dirigés contre le $TNF-\alpha$ i.e, l'infliximab, le certolizumab pegol et l'adalimumab. Les séquences peptidiques sont issues de leurs brevets respectifs US6277969 (Le *et al.*, 2001), WO9729131 (Salfeld *et al.*, 1997) et US7012135 (Athwal *et al.*, 2003). Les régions FR-IMGT et CDR-IMGT ainsi que la position des délétions, représentées par des points, sont déterminées selon la nomenclature IMGT (IMGT unique numbering for V-DOMAIN (Lefranc *et al.*, 2003)). Les limites des FR-IMGT et des CDRIMGT sont mentionnées entre parenthèses. Les résidus conservés, ayant toujours la même position, figurent en rose pour les cystéines (positions 23 et 104) et en bleu pour les tryptophane (position 41) et les leucines (position 89). L'infliximab présente un site de N-glycosylation, figuré en vert, sur son domaine V-KAPPA. Le chiffre 1 dans le VH CDR3-IMGT correspond à une position

additionnelle 112.1(Lefranc et al., 2003). Les séquences doublement soulignées correspondent à motifs prédisposant les anticorps à l'agrégation (Wang *et al.*, 2009).

.....151

Figure 18 : Colliers de Perles IMGT des domaines VH et V-KAPPA de l'infliximab, du certolizumab pegol et de l'adalimumab. Les Colliers de Perles IMGT sont représentés en une (one layer) ou deux couches (two layers) et les acides aminés sont indiqués par leur code à une lettre. Les positions pour lesquelles des acides aminés hydrophobes (I, V, L, F, C, M, A) et le tryptophane (W) sont retrouvés dans plus de 50% des séquences analysées sont figurées en bleu. Toutes les prolines sont figurées en jaune. Les CDR1-IMGT (boucle BC), CDR2-IMGT (boucle C'C'') et CDR3-IMGT (boucle FG) sont limités par des positions d'ancrage, représentées par des perles carrées, appartenant aux FR-IMGT flanquants. Les flèches indiquent la direction des feuilletés bêta. Pour les domaines VH, les CDR1-IMGT sont en rouge, les CDR2-IMGT en orange et les CDR3-IMGT en violet. Pour les domaines V-KAPPA, les CDR1-IMGT sont en bleu, les CDR2-IMGT en vert et les CDR3-IMGT en vert émeraude (Ruiz *et al.*, 2002). Les Colliers de Perles IMGT en deux couches montrent au premier plan les feuilletés GFCC'C'' et au second les feuilletés ABED. Les perles hachurées représentent les positions manquantes selon la numérotation IMGT (Lefranc *et al.*, 03). Les points noirs marquent sur les représentations du domaine V-KAPPA de l'infliximab l'asparagine (N) du motif de N-glycosylation (voir aussi Figure 17). Les séquences encadrées en rouge sur les domaines V-KAPPA de l'infliximab et de l'adalimumab correspondent aux motifs d'agrégation (voir aussi Figure 17).152

Liste des annexes

Annexe 1 : Article n°7 : The homozygous FcγRIIIa-158V genotype is a risk factor for heparin-induced thrombocytopenia in patients with antibodies to heparin/platelet factor 4 complexes. Yves Gruel, Claire Pouplard, Dominique Lasne, <u>Charlotte Magdelaine-Beuzelin</u> , Chloé Charroing, Hervé Watier. <i>Blood</i> . 2004;104:2791-2793.	241
Annexe 2 : Article n°8 : Withdrawal of immunosuppression in Crohn's disease treated with scheduled infliximab maintenance: a randomized trial. Gert Van Assche, <u>Charlotte Magdelaine-Beuzelin</u> , Geert D'Haens, Filip Baert, Maja Noman, Séverine Vermeire, David Ternant, Hervé Watier, Gilles Paintaud, Paul Rutgeerts. <i>Gastroenterology</i> ., 2008, 134, 1861-1868.	246
Annexe 3 : Article n°9 : Infliximab concentration monitoring improves the control of disease activity in rheumatoid arthritis. Denis Mulleman, Jean-Camille Méric, Gilles Paintaud, Emilie Ducourau, <u>Charlotte Magdelaine-Beuzelin</u> , Jean-Pierre Valat, Philippe Goupille. <i>Arthritis Res Ther.</i> , 2009, sous presse.	255

INTRODUCTION

L'immunologie est plus que centenaire, mais les sujets qui passionnèrent les pionniers de la discipline ne sont pas si éloignés de nos préoccupations actuelles si l'on considère les anticorps thérapeutiques comme une forme contemporaine de sérothérapie ! L'avènement de l'immunologie est directement lié à l'avancée des connaissances en infectiologie à la fin du XIX^{ème} siècle et son évolution profite des progrès technologiques des XX^{ème} et XXI^{ème} siècles, permettant aux immunologistes une réactualisation permanente des données. Les anticorps, emblème de la discipline, sont un exemple de choix et d'une grande actualité pour illustrer les rebondissements incessants de cette science dynamique, plusieurs fois récompensée par de hautes distinctions et qui n'a (heureusement) pas encore livré tous ses secrets.

L'histoire des anticorps débute avec les travaux d'Emil von Behring et Shibasaburo Kitasato qui, en 1890, ont publié qu'une dose non létale de toxine diphtérique ou tétanique protège de l'administration ultérieure d'une dose létale et que l'état d'immunité peut être transféré par le sérum à des animaux naïfs (pour revue, Watier, 2009). L'application de cette observation, l'année suivante, au traitement d'enfants atteints de diphtérie, marqua le début de la sérothérapie et valut à Emil von Behring le premier Prix Nobel de Médecine ou Physiologie en 1901. Ce fut Paul Ehrlich, qui travailla avec Behring sur la production de sérums anti-diphtériques standardisés de bonne qualité qui développa, par la suite, les concepts d'immunité passive et d'immunité active (Winau & Winau, 2002). A cette époque, les facteurs biologiques impliqués dans l'immunité ne sont pas identifiés et deux écoles s'affrontent. En France, Ilya Metchnikoff et Louis Pasteur défendent la thèse cellulaire, tandis qu'en Allemagne les travaux d'Emil von Behring et Paul Ehrlich suggèrent une immunité humorale où des « anti-corps » permettent la neutralisation ou la destruction des toxines et des pathogènes utilisés *in vitro*. Ils démontrent la grande spécificité de ces anticorps et peuvent les quantifier. Bien que les deux camps soient récompensés de leurs recherches par un nouveau Prix Nobel en 1908, attribué conjointement à Paul Ehrlich et Ilya Metchnikoff, le sentiment général en ce début de XX^{ème} siècle est que les mécanismes de l'immunité sont intimement liés aux anticorps (Silverstein, 2003). A compter de ce moment, tous les efforts des immunologistes sont concentrés sur leur étude, faisant évoluer les connaissances sur leur structure et leurs fonctions ainsi que les théories à propos de la génération de leur diversité et l'implication de l'antigène.

Dans les années 1930, Elvin A. Kabat et Michael Heidelberger caractérisent biochimiquement les anticorps et démontrent leur appartenance aux gammaglobulines. Cependant, il faut attendre les années 1960 pour savoir que les anticorps sont constitués de deux types de chaînes, lourdes et légères, et que celles-ci sont réparties en différentes classes (Hood, 2008). Puis vient l'hypothèse de Dreyer et Bennett selon laquelle les chaînes polypeptidiques des anticorps seraient codées par deux types de gènes, l'un variable, l'autre constant amenant progressivement la question de la génération de la diversité des anticorps (Dreyer & Bennett, 1965). L'analyse des séquences d'acides aminés des chaînes légères tout d'abord, conduit Elvin A. Kabat à décrire l'ultrastructure des domaines variables et à identifier les régions déterminant la complémentarité (*CDR, complementarity determining regions*) des anticorps, *i.e.* le site de liaison de l'anticorps à l'antigène (Wu & Kabat, 1970). Ces avancées descriptives font aussi évoluer les théories relatives à la génération du répertoire des anticorps et peu à peu le concept de recombinaison génétique s'affine. De son côté, F. W. Rogers Brambell s'intéresse à la biodistribution des immunoglobulines et à leur demi-vie : il démontre le passage trans-placentaire des immunoglobulines G et caractérise, autant que les moyens de l'époque le permettent, le récepteur impliqué dans ce trafic maintenant appelé FcRn, *neonatal Fc receptor* (Brambell, 1969). Par ailleurs, un des succès dans le domaine de l'immunologie est la création d'hybridomes par Cesar Milstein et Georges Köhler en 1975, récompensée par un Prix Nobel en 1984. Cette avancée technologique est le point de départ de la préparation des anticorps monoclonaux utilisés initialement comme réactifs, puis comme molécules thérapeutiques. L'essor des biotechnologies à la fin du XX^{ème} siècle favorise l'humanisation de ces molécules initialement originaires de la souris ou du rat et destinées à l'usage médical, afin d'en diminuer l'immunogénicité et donc la toxicité pour les patients traités. La cristallographie et l'outil informatique contribuent également à préciser les interactions moléculaires impliquant les anticorps, soit avec leur antigène cible ou bien avec leurs récepteurs (FcγR, FcRn), mais aussi en permettant une analyse très fine de leur ultrastructure, en particulier celle de leurs paratopes. C'est le cas d'IMGT, *The international ImMunoGeneTics information system*[®] (Lefranc *et al.*, 2009) qui bouscule la nomenclature des domaines variables telle qu'elle avait été proposée par Elvin A. Kabat, en identifiant les CDR grâce à des résidus d'ancrage sur les séquences d'acides aminés et à la représentation 3D des immunoglobulines (Lefranc *et al.*, 2003).

L'émergence des anticorps monoclonaux recombinants thérapeutiques dans les années 1990, et leur utilisation en médecine humaine aiguisent l'intérêt de la communauté scientifique au sens large - non seulement les immunologistes mais aussi les cliniciens et les pharmaco-toxicologues - pour la famille des anticorps. En effet, ces médicaments constituent, en plus de leur rôle thérapeutique, des outils de suivi biologique car ils peuvent se prêter à des investigations de recherche clinique chez l'Homme et d'expérimentation animale dans la limite où ils sont dosables dans le sang et éventuellement traçables par imagerie. Il en résulte des données très précieuses relatives à leur pharmacocinétique, pharmacodynamie et immunogénicité ainsi que des analyses d'immunogénétique permettant d'évaluer les interactions des anticorps avec le reste du système immunitaire.

Bien que ces molécules innovantes aient une grande spécificité d'action, la réponse clinique qui leur est associée présente pour plusieurs d'entre elles, une variabilité inter-individuelle non négligeable (Ternant & Paintaud, 2005 ; Cartron *et al.*, 2007). En effet, il a été montré que des concentrations circulantes élevées de rituximab (MabThera®) (Berinstein *et al.*, 1998 ; Davis *et al.*, 1999), d'alemtuzumab (Campath®) (Hale *et al.*, 2004) et de cetuximab (Erbix®) (Fracasso *et al.*, 2007) sont associées à une meilleure réponse. Alors que tous les facteurs influençant cette variabilité ne sont pas identifiés, l'implication de la pharmacocinétique (PK) des anticorps est en revanche avérée. De telles données ont des conséquences en termes de prise en charge du patient et pourraient conduire à l'adaptation de la posologie en fonction des concentrations circulantes d'anticorps thérapeutique mesurées chez les patients traités. Cependant, les sources de variabilité PK inter- et intra-individuelle ne sont pas clairement identifiées, ralentissant pour les anticorps déjà sur le marché, l'évolution vers des traitements avec des doses ou des schémas thérapeutiques personnalisés et pour les anticorps en développement, la conception de molécules dont la PK serait améliorée.

C'est pourquoi l'objectif de notre travail est d'explorer certains facteurs pouvant influencer la PK des anticorps thérapeutiques. En retraçant l'évolution des biothérapies au cours du XX^{ème} siècle, depuis la sérothérapie jusqu'aux anticorps monoclonaux, nous rappelons la structure de ces molécules et l'ingénierie dont elles sont issues. Après avoir recensé les moyens techniques permettant d'objectiver leur immunogénicité, nous avons développé les facteurs génétiques susceptibles de l'influencer. Dans un dernier chapitre, nous avons mis en relation l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques et leur pharmacocinétique.

La première partie de nos résultats reprend deux études cliniques auxquelles nous avons participé en dosant les anticorps induits par les anticorps anti-TNF- α utilisés : elles montrent pour la première fois l'influence de l'immunogénicité des anti-TNF- α sur leur propre PK et confirment d'autre part la variabilité inter-individuelle de survenue de ces anticorps induits. Ce sont précisément ces deux observations que nous avons choisi d'explorer. En effet, devant la difficulté de comparer cliniquement l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques, nous avons utilisé une alternative plus théorique en analysant précisément leur structure et en évaluant la divergence de leurs séquences par rapport au répertoire humain des IgG. Par ailleurs, nous avons recherché des facteurs génétiques pouvant être associés à la variabilité inter-individuelle de survenue des anticorps induits par l'infliximab (Remicade®). Nous avons pour cela étudié l'implication des allotypes des immunoglobulines et du polymorphisme *FCGR3A*. Finalement, pour mieux comprendre la variabilité inter-individuelle de la PK rapportée pour plusieurs anticorps thérapeutiques, nous proposons l'étude de FcRn. Ce récepteur est en effet impliqué dans le métabolisme des immunoglobulines G (IgG), classe majoritaire des anticorps thérapeutiques.

GENERALITES

1- De la sérothérapie aux anticorps monoclonaux recombinaux : structure, ingénierie et immunogénicité

1-1 Sérothérapie et immunoglobulines humaines polyclonales

Les premières pathologies dont le traitement a bénéficié de l'emploi d'anticorps, sans qu'ils soient moléculairement définis à cette époque, sont des maladies d'origine infectieuse qui ont ravagé l'Europe à la fin du XIX^{ème} et au début du XX^{ème} siècle. La diphtérie et le tétanos ont donc été traités grâce à l'utilisation de sérums, d'où le nom de sérothérapie (Figure 1), issus d'animaux immunisés (chevaux, moutons) contre les toxines bactériennes ce qui notamment sauva la vie de nombreux soldats pendant la première guerre mondiale. Alors que la sérothérapie anti-diphtérique a disparu du fait de la vaccination et de l'antibiothérapie, la séroprophylaxie du tétanos a longtemps été utilisée (Watier, 2009).

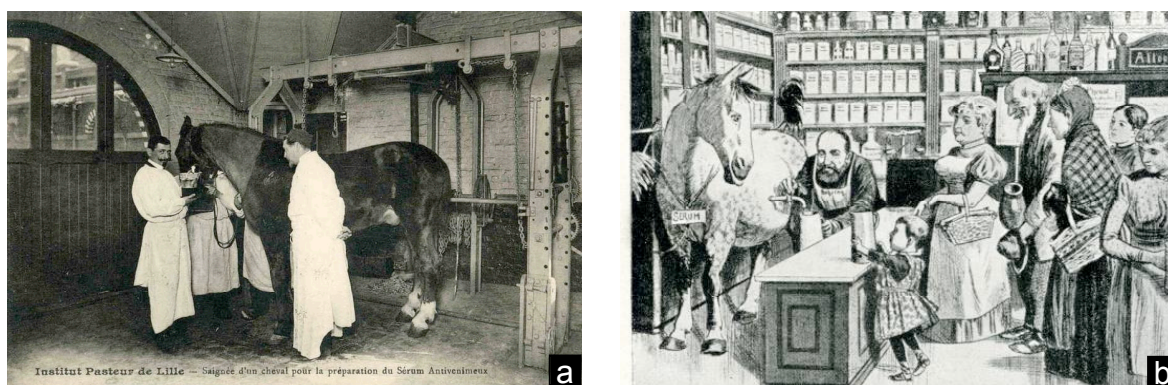


Figure 1 : La sérothérapie. Le médicament utilisé est le sérum de l'animal lui-même. Les chevaux immunisés étaient régulièrement saignés : certains ont donné plus de 200 litres de sang en douze ans. Le sérum était ensuite titré (en unité de neutralisation), stérilisé, conditionné en ampoules et distribué. En Allemagne comme en France, l'origine équine du sérum marque les esprits comme en témoignent les cartes postales de l'époque (a) et cette caricature publiée dans le *Lustige Blätter* en 1894 (b). Documents gracieusement prêtés par le Pr Hervé Watier. Droits réservés ; documents issus du fonds Watier du Service Commun de Documentation de l'Université de Tours.

Cependant, l'emploi d'immunoglobulines entières de cheval fut à l'origine de nombreuses réactions comme des maladies sériques, résultats de la sensibilisation des patients traités et non plus de leur immunisation, augmentant le risque de réaction à l'injection suivante (Nation *et al.*, 1963) : ces manifestations furent à l'époque, qualifiées d'anaphylactiques. La description de l'anaphylaxie revient à trois « couples » de médecins qui ont travaillé indépendamment sur le sujet entre 1902 et 1905 : Charles Richet et Paul Portier, Maurice Arthus et Nicholas Breton et enfin Clemens von Pirquet et Bela Schick.

Alors qu'ils s'intéressent à la toxicité des brûlures des filaments des physalies, une espèce de méduses, Charles Richet et Paul Portier publient en 1902 à la Société de biologie, leur travail intitulé « De l'action anaphylactique de certains venins » (Portier & Richet, 1902). Dépassant l'intérêt pour l'empoisonnement lui-même, ils centrent leurs recherches sur la réponse inattendue observée lors de l'injection du venin : « *Nous appelons anaphylactique (contraire à la phylaxie) la propriété dont est doué un venin de diminuer au lieu de renforcer l'immunité quand il est injecté à dose non mortelle. Il est possible que beaucoup de venins (ou de toxines) soient dans ce cas ; mais comme on s'est attaché surtout à leur action prophylactique ou vaccinnante, on a fort peu cherché encore à les étudier à ce point de vue.* » Ces observations ne soulèvent pas un grand enthousiasme jusqu'à ce que Maurice Arthus publie à la Société de biologie de Marseille (Arthus, 1903) le phénomène local qui porte son nom : lésions de nécrose par injections sous-cutanées itératives de sérum de cheval et mort si l'injection est intra-veineuse. Ces manifestations sont aussi bien observées chez le lapin que le cobaye et le rat. Maurice Arthus les associe à l'anaphylaxie décrite par Charles Richet au même titre que les accidents survenus en médecine humaine, lors de traitement par sérums de cheval anti-toxiques. Ces accidents survenant rapidement après la deuxième injection du sérum hétérologue ont été décrits sous le nom de maladie sérique par Clemens von Pirquet et Bela Schick en 1905. Ils associent à une fièvre un rash, mais également des atteintes rénales avec protéinurie, des adénopathies et des manifestations articulaires (von Pirquet & Schick, 1905).

Hamburger et Moro ont été les premiers à étudier la biologie de ces maladies sériques observées chez des enfants traités par sérum anti-diphtérique en mettant en évidence la présence d'anticorps induits appelés précipitines, précisément au cours des manifestations

cliniques. Ils observent aussi que la concentration de ces anticorps augmentent alors que celle du sérum de cheval diminue (Hamburger & Moro, 1903) comme s'accordent à le dire d'autres équipes (Longcope & Rackemann., 1918). Cependant, le rôle de ces anticorps dans la maladie sérique est sujet à controverse.

En effet, Clemens von Pirquet et Bela Schick tentent d'expliquer la physiopathologie de la maladie sérique en représentant l'évolution de la concentration du sérum hétérologue et des précipitines au cours du traitement (von Pirquet & Schick, 1905) (Figure 2). Sur ce graphique von Pirquet montre la dynamique des réponses suite à la première puis à la seconde injection de sérum hétérologue. Il montre qu'après la première injection, la concentration d'antigène circulant (sérum de cheval) diminue progressivement alors que la concentration d'anticorps induits augmente. Au maximum de cette concentration, l'antigène est indosable. Ce serait pendant cette phase que se formeraient ce que von Pirquet appelle les « *toxic bodies* » et qui sont en fait des dépôts de complexes antigène-anticorps. Von Pirquet note la diminution de la concentration du complément sérique, sans prendre toute la mesure de son observation. La seconde injection de sérum de cheval a pour conséquence des symptômes immédiats associés à une élimination très rapide de l'antigène, une diminution transitoire des anticorps et la formation de *toxic bodies*.

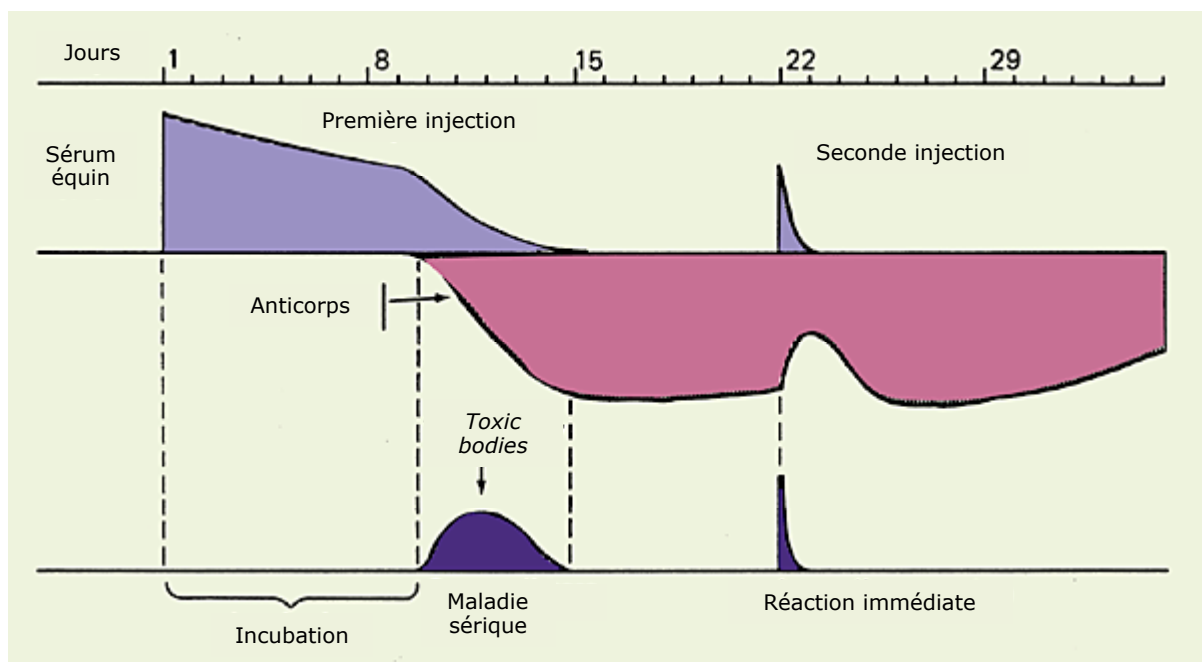


Figure 2 : Concept de von Pirquet à propos du développement de la maladie sérique chez l'homme (d'après AM Silverstein *A History of Immunology* (1989), figure modifiée à partir de l'original de von Pirquet). Les méthodes de dosage utilisées sont basées sur l'aptitude d'un sérum de lapin anti-sérum de cheval à précipiter l'antigène, i.e. le sérum de cheval et celle des anticorps humains induits (anti-sérum de cheval) à précipiter le sérum de cheval (Silverstein, 2000).

D'autres techniques ont été mises au point pour dépister les anticorps associés à la maladie sérique : certains auteurs ont mis en évidence la formation d'anaphylactines en transférant passivement la maladie sérique d'un homme atteint à un cobaye sain (Rosenau & Anderson, 1908). Cependant, Weil a montré que anaphylactines et précipitines ne sont qu'une seule et même substance bien que certaines anaphylactines ne soient pas toujours précipitantes (Weil, 1916). Enfin, d'autres équipes ont injecté du sérum de cheval en intra-dermique chez des patients atteints de maladie sérique et observé la survenue d'une réaction cutanée spécifique, interprétée comme le témoignage de la présence d'anti-substance dirigée contre le sérum de cheval. Cependant, ces réactions ne sont pas obtenues systématiquement et surviennent plutôt à la fin de l'épisode de maladie sérique (Michiels, 1913).

Ces trois techniques ont été mises en œuvre dans un travail mené par Longcope et Rackemann publié en 1918, dans lequel ils ont recherché si les anticorps induits par la sérothérapie sont impliqués dans la maladie sérique. Bien qu'ils n'aient pas pu disposer des résultats des trois tests pour les 25 patients suivis, ils ont observé que les anticorps ont été mis en évidence à la fin de l'épisode de maladie sérique mais qu'ils sont restés indétectables chez les patients ne présentant pas les symptômes. Comme d'autres, ils ont remarqué que la survenue de ces anticorps s'accompagne d'une diminution rapide de l'antigène. Les auteurs en concluent que ces anticorps (précipitines et/ou anaphylactines) constituent un mécanisme protecteur de l'organisme visant à détruire l'antigène, ici le sérum de cheval et ne sont pas à l'origine de la maladie (Longcope & Rackemann., 1918), contrairement à ce qu'a proposé von Pirquet.

Comme le soulignent Talmage et ses collaborateurs en 1951, la complexité de l'antigène et de la réponse anticorps induite, associée à la multiplicité des méthodes utilisées pour mettre en évidence cette réponse rend impossible une interprétation exacte de la relation qui associe l'élimination de l'antigène et la réponse anticorps, dans le contexte de la sérothérapie (Talmage *et al.*, 1951). Glenny et Hopkins en étudiant la durée de l'immunité passive conférée à des lapins par injection d'anti-toxine diphtérique équine, ont dosé itérativement la concentration d'anti-toxine circulante et analysé la fraction éliminée sans mesurer les précipitines anti-sérum de cheval (Glenny & Hopkins, 1923). Cette approche très peu utilisée, présente l'avantage de montrer les effets précoces de la production d'anticorps alors que leur dosage est précisément limité par un large excès d'antigène. La représentation des concentrations circulantes d'anti-toxine en fonction du temps montre que l'élimination de

l'anti-toxine se déroule en trois phases. La troisième phase, plus rapide, est considérée par les auteurs comme étant l'expression de la réponse anticorps. Bien qu'ils n'aient pas non plus été en mesure de doser les anticorps en présence d'un excès d'antigène, Talmage et collaborateurs ont reproduit les résultats de Glenny et Hopkins en injectant à des lapins des γ -globuline bovines (Talmage *et al.*, 1951) (Figure 3). Ils avancent également plusieurs arguments en faveur de cette réponse anticorps. Ils observent en effet que l'élimination rapide de l'antigène précède toujours l'apparition des anticorps et que cette réponse survient d'autant plus rapidement qu'il y a déjà eu contact avec le même antigène. Ils reproduisent l'élimination rapide de l'antigène en injectant aux lapins un anticorps spécifique anti- γ -globuline bovines.

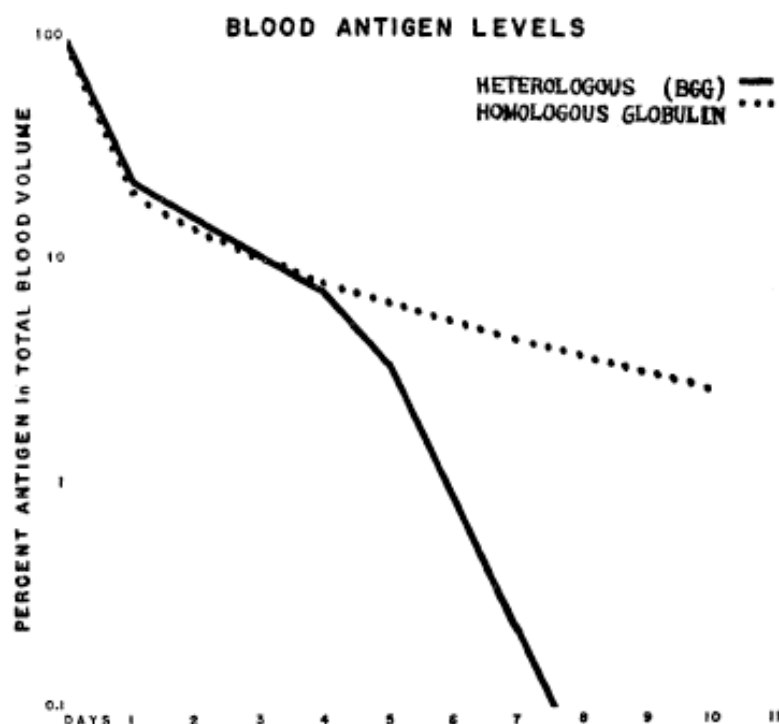


Figure 3 : Représentation semi-logarithmique de la radioactivité moyenne des protéines après injection à des lapins de γ -globulines bovines (trait plein) ou de γ -globulines de lapins (trait pointillé), marquées à l'iode 131 (d'après Talmage *et al.*, 1951). L'élimination des γ -globulines hétérologues est représentée par une courbe en trois phases, comparable à celle obtenue par Glenny et Hopkins, 1923. En revanche, les γ -globulines homologues ont une élimination en seulement deux phases.

Peu à peu les données issues de l'exploration biologique de la maladie sérique sont reprises à l'occasion de la publication de cas cliniques rapportant l'inefficacité de la sérothérapie. Littlewood et collaborateurs publient le cas d'un patient traité deux fois par anti-toxine tétanique équine à 6 mois d'intervalle et qui meurt du tétanos (Littlewood *et al.*, 1954). Kind injecte la toxine tétanique à des souris sensibilisées ou non à l'anti-toxine tétanique équine et vérifie l'hypothèse de Littlewood et de ses collaborateurs : le traitement est inefficace chez les souris sensibilisées aux anticorps de cheval, conséquence de l'état d'hypersensibilité et de l'accélération de l'élimination des anti-toxines tétaniques équines (Kind, 1957). L'auteur conclut en proposant d'administrer une dose presque dix fois plus importante lors de la deuxième injection afin que le traitement reste efficace même lorsque l'anti-toxine est éliminée rapidement. Smolens et collaborateurs commentent ces observations en disant que les anticorps de cheval sont considérés comme étrangers par le corps humain favorisant leur rapide élimination. Ils ajoutent que les anticorps hétérologues, i.e. d'origine animale, stimulent chez l'homme la production d'anticorps spécifiques qui neutralisent l'effet des anti-toxines (Smolens *et al.*, 1957). Les sérums équins anti-toxine tétanique administrés à des sujets sensibilisés sont à l'origine de concentrations circulantes d'antitoxine très variables et peuvent être détruits en 4 à 9 jours (Godfrey *et al.*, 1960). Smolens et collaborateurs ont montré que la demi-vie des anti-toxines de cheval est seulement de 7 à 14 jours chez des sujets non sensibilisés (Smolens *et al.*, 1961).

Les problèmes d'immunogénicité associés à une PK fluctuante des sérums animaux ont nécessité de trouver une alternative à ces préparations et ont conduit les scientifiques à envisager l'utilisation de sérums humains issus de sujets immunisés. Cette démarche a été facilitée par les programmes de vaccination systématique anti-tétanique et du développement du don du sang à partir des années 1960 (Watier, 2009). Administrées en intra-musculaire, les anti-toxines tétaniques humaines ne sont pas associées à des phénomènes d'hypersensibilité (Nation *et al.*, 1963). En 1962, Suri et Rubbo montrent que les concentrations circulantes protectrices obtenues avec des sérums dits homologues nécessitent des doses beaucoup plus faibles de sérums anti-tétaniques humains qu'équins (Rubbo & Suri, 1962) et persistent à un niveau élevé pendant plus longtemps avec les sérums humains dont la demi-vie est évaluée à 4 semaines (Smolens *et al.*, 1961). Malgré leur coût élevé, ces préparations humaines se sont imposées et sont encore utilisées aujourd'hui.

Actuellement, certains anticorps hétérologues sont encore utilisés en médecine humaine : ce sont d'une part les sérums équins anti-venins et antidotes issus du mouton, et d'autre part les sérums de chevaux anti-lymphocytaires supplantés par les sérums de lapin anti-thymocytes. Les sérums anti-venins sont utilisés depuis le début du XX^{ème} siècle pour traiter des envenimements très variés, tant au niveau des organismes qui en sont responsables que des venins proprement dits. Cependant, serpents, scorpions et araignées sont les êtres venimeux les plus étudiés (Espino-Solis *et al.*, 2009). Les premiers sérums utilisés ont été les sérums équins composés d'immunoglobulines (Ig) entières (Theakston *et al.*, 2003). Puis, à partir de 1939 et l'introduction de la digestion des Ig par la pepsine selon Pope (Pope, 1939) la majorité des équipes se sont mises à produire des fragments F(ab')₂ (León *et al.*, 1997) et certaines même des Fab (Theakston *et al.*, 2003). En effet, éliminer la portion Fc des Ig réduit leur immunogénicité (Porter, 1959) et la survenue des réactions anaphylactiques chez les patients traités (Theakston *et al.*, 2003 ; León *et al.*, 1997) : IgG (30%) > F(ab')₂ (10%) > Fab (0,8%).

La pharmacocinétique et la pharmacodynamie des trois formats sont différentes. Les IgG ont une demi-vie plus longue de l'ordre de 61 à 194 heures alors qu'elle n'est que de 14,3 à 25,4 heures pour les Fab. En revanche, la petite taille des Fab permettrait leur diffusion tissulaire plus rapide que les IgG et les F(ab')₂ pour lesquels ces caractéristiques sont comparables. Cependant, ces propriétés ne semblent pas apporter une meilleure efficacité, puisque IgG, F(ab')₂ et Fab sont aussi efficaces pour neutraliser localement les venins (Seifert & Boyer 2001).

Peut-être plus importante que la forme choisie, la méthode de production des antidotes est liée aux effets secondaires observés. En 2003, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) conclut, lors de son atelier dédié à la standardisation et au contrôle des anti-venins qu'il est certainement avantageux de retirer la portion Fc des IgG et que le procédé de production des fragments F(ab')₂ est plus facile à contrôler que celui des Fab (Theakston *et al.*, 2003). Cependant, il n'est pas question de trouver un format consensuel IgG, F(ab')₂ ou Fab pour tous les anti-venins, mais d'adapter au cas par cas.

Avec l'émergence des anticorps monoclonaux recombinants, il serait légitime de croire que la classe des anticorps anti-venins bénéficierait de ces avancées technologiques. Bien que certaines molécules soient brevetées : scFv (*single chain Fv*), diabody, nanobody, chimerique, aucun nouveau format n'est actuellement en essai clinique (Espino-Solis *et al.*, 2009).

Depuis 1967 (Starzl *et al.*, 1967) et avant l'utilisation de la ciclosporine, les sérums anti-lymphocytaires qui sont des IgG entières, ont significativement amélioré la survie des greffons et diminué l'incidence du rejet de greffe en transplantation d'organe (Launois *et al.*, 1977). Ils induisent cependant la production d'anticorps humains dirigés contre les anticorps de cheval ou de lapin (Prin Mathieu *et al.*, 1997) détectés chez 10 à 30% des patients traités (Tatum *et al.*, 1984). Ils sont également responsables de la formation de complexes immuns associés à une diminution de l'efficacité des sérums hétérologues. Enfin, ils sont à l'origine de réactions d'hypersensibilité (Niblack *et al.*, 1987) et de maladies sériques chez 7,1 à 27% des patients de transplantation rénale (Tanriover *et al.*, 2005). Trois anticorps monoclonaux ont été développés pour être administrés en prévention du rejet aigu de greffe rénale. Ceux-ci appartiennent à différentes générations d'anticorps thérapeutiques et ciblent deux types de molécules à la surface des lymphocytes T. Le muromonab (OKT3[®]) (Tableau I) est un anticorps murin dirigé contre le CD3 alors que le basiliximab (Simulect[®]) (Tableau II) et le daclizumab (Zenapax[®]) (Tableau IV) qui sont respectivement des anticorps chimérique et humanisé, ciblent tous deux le récepteur de l'IL-2 (CD25). Les sérums anti-thymocytes sont actuellement le traitement de première intention pour les patients présentant un risque de rejet de greffe élevé alors que les anticorps anti-récepteur de l'IL-2 sont préférés pour les autres patients (Nashan, 2005).

1-2 Les anticorps monoclonaux murins

Bien que les anticorps polyclonaux humains aient montré un réel gain d'efficacité par rapport aux anticorps animaux, ils ne sont utilisables qu'en prophylaxie ou en traitement des pathologies essentiellement infectieuses. En effet, les préparations d'Ig enrichies en anticorps ciblant un agent pathogène (virus de la varicelle, de l'hépatite A ou B), une toxine (tétanos) ou le Rhésus D résultent de l'histoire médicale naturelle des individus donnant leur sang ou bien des vaccinations dont ils ont bénéficié. Pourtant, il serait encore mieux de disposer d'anticorps humains avec des spécificités désirées (anti-microbiennes et autres), mais l'obtention de tels anticorps par immortalisation de cellules productrices d'anticorps humains s'est révélée inexploitable (Carson & Freimark, 1986). Il n'est pas plus envisageable, pour des

raisons éthiques mais aussi pratiques, d'utiliser des sérums humains naturels pour cibler une protéine humaine qui serait impliquée dans des processus pathogéniques. En effet, cette protéine, potentielle cible thérapeutique, appartient par définition au soi et se trouve donc théoriquement non immunogène dans l'espèce humaine.

La découverte en 1975 de la technique des hybridomes a permis, quelques années plus tard, l'avènement des premiers anticorps thérapeutiques monoclonaux d'origine murine (Figure 4). Ces anticorps présentent le double avantage d'avoir une même spécificité antigénique et donc de permettre un ciblage plus fin que les anticorps polyclonaux utilisés jusque là, mais aussi d'éviter d'immuniser des animaux en continu et d'avoir à standardiser les lots d'anticorps entre eux. Actuellement, six anticorps murins sont commercialisés (Tableau I) et indiqués pour la majorité d'entre eux dans le traitement des cancers.

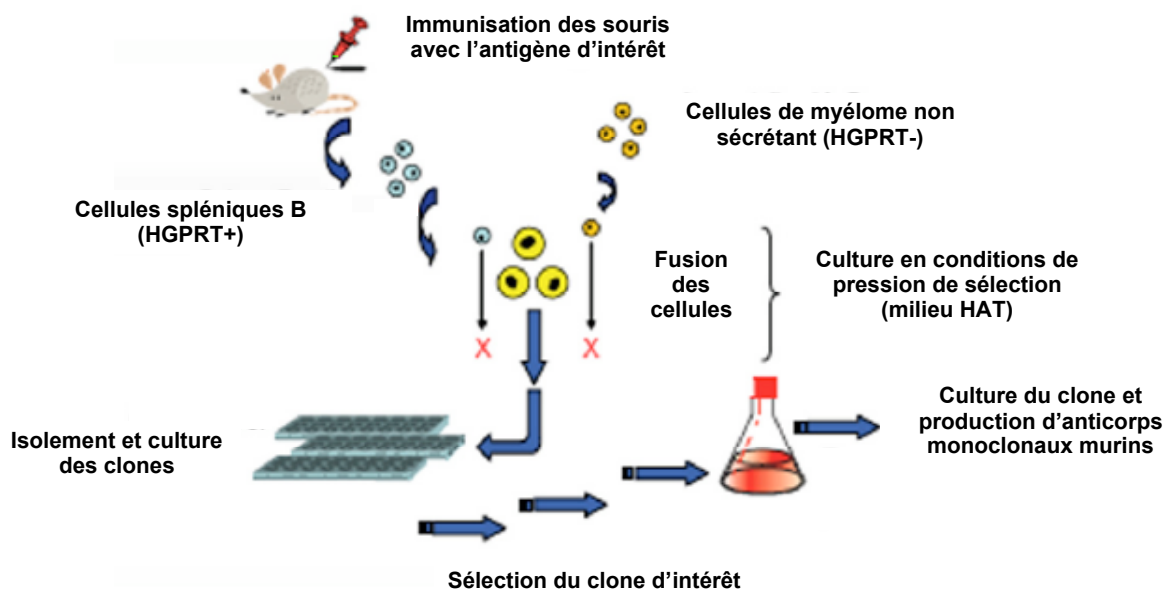


Figure 4 : Technique des hybridomes (d'après Chartrain & Chu, 2008). Les souris Balb/c sont exposées à l'antigène humain d'intérêt par voie sous-cutanée. Elles reçoivent plusieurs injections favorisant à la fois le gain d'affinité des anticorps pour l'antigène et la commutation de classe. L'immunisation est stimulée par l'utilisation d'adjuvants comme l'adjuvant de Freund. Les cellules B spléniques murines sont extraites après sacrifice des animaux. Ces cellules exprimant naturellement l'enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transférase (HGPRT) sont fusionnées en présence de polyéthylène glycol avec des cellules de myélome murin non sécrétant (cellules tumorales immortelles) déficientes en HGPRT. Quatre populations de cellules peuvent être obtenues : des cellules spléniques et des cellules myélomateuses non fusionnées, des cellules hybrides immortelles qui possèdent HGPRT (hybridomes) et des hybridomes instables. Les cellules sont cultivées dans un milieu riche en hypoxanthine, aminoptérine et thymidine (HAT) permettant aux seules cellules à la fois immortelles et capables d'utiliser la voie HGPRT de persister dans le milieu. Puis chaque hybridome est isolé par dilution limitante. Les anticorps produits par chacun d'eux sont caractérisés du point de vue de leur structure, de leur spécificité antigénique et de leur affinité. Peut alors être sélectionné le clone producteur de l'anticorps murin le plus intéressant pour sa spécificité et ses propriétés neutralisantes.

Tableau I : Anticorps de souris et de rat approuvés pour usage thérapeutique

Dénomination commune internationale de l'anticorps (spécialité)	AMM ^a	Origine	Isotype et format	Cible antigénique	Indications
muromonab (OKT3, Orthoclone [®])	1986	souris	IgG2ak	CD3	Rejet d'allo-greffe
edrecolomab (Panorex [®])	1995 uniquement en Allemagne	souris	IgG2ak	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i> (EpCAM)	Cancer colorectal
ibritumomab tiuxetan (Zevalin [®])	2002	souris	IgG2a couplée à ⁹⁰ Y	CD20	Lymphomes malins non hodgkiens à lymphocytes B folliculaires
tositumomab (Bexxar [®])	2003 uniquement aux Etats-Unis	souris	IgG2aλ couplé à ¹³¹ I	CD20	Lymphomes malins non hodgkiens
catumaxomab (Removab [®])	2009	hybride rat/souris	IgG2a de souris et IgG2b de rat	Bispécificité : CD3 et <i>Epithelial cell adhesion molecule</i> (EpCAM)	Ascite maligne

^aAMM, Autorisation de Mise sur le Marché : année du premier enregistrement FDA, *Food and Drugs Administration*, EMEA, *European Medicines Agency* ou SFDA, *China State Food and Drug Administration*.

Bien que ces anticorps soient très spécifiques de leur(s) cible(s) antigénique(s), ils restent des anticorps de souris (ou de rat) administrés à des hommes, ce qui fait d'eux des xénoantigènes et les rend potentiellement immunogènes pour les patients traités. Ils sont classiquement associés à l'induction d'une réponse humorale appelée *HAMA*, *human anti-mouse antibodies* (Carter *et al.*, 2001). Les techniques permettant la détection des HAMA sont très variées et manquent cruellement de standardisation. Certains centres développent leurs propres méthodes, utilisant des techniques radio-immunologiques, immuno-

enzymatiques (*ELISA*, *enzyme-linked immunosorbent assay*) ou même *HPLC*, *high-performance liquid chromatography* tandis que d'autres utilisent des trousse commerciales (Mirick *et al.*, 2004). Cependant, dans le cadre des traitements par anticorps monoclonaux murins, les techniques ELISA utilisant l'anticorps murin d'intérêt pour capturer les HAMA et un anticorps anti-Ig humaine couplé à une enzyme pour les révéler, sont couramment employées en raison de leur sensibilité (HAMA survey group, 1993). Utiliser précisément l'anticorps murin comme antigène de capture permet la détection des HAMA anti-idiotypiques et/ou anti-allotypiques et/ou anti-isotypiques (Mirick *et al.*, 2004) sans pour autant, et c'est là l'inconvénient, permettre de les distinguer.

Une étude bibliographique publiée en 2005 a recensé l'immunogénicité des grandes familles d'anticorps monoclonaux en tenant compte de l'incidence de la survenue d'anticorps anti-anticorps chez les patients traités (Hwang & Foote 2005). Les auteurs ont notamment analysé les résultats publiés sur la survenue des HAMA pour 44 anticorps murins commercialisés ou en développement. Ils ont classé ces réponses en « négligeable » lorsque moins de 2% des patients ont développé des anticorps (cette réponse correspond à une situation idéale), « tolérable » entre 2 et 15% et « marquée » supérieure à 15%, réponse associée à des accidents cliniques contre-indiquant probablement l'utilisation de la molécule. A la question « est ce que les anticorps murins sont immunogènes ? », l'étude confirme ce qui est communément admis (Carter, 2001) : 84% de ces anticorps sont responsables de réponses « marquées », 7% de réponses « tolérables » et 9% de réponses « négligeables ». Les auteurs ajoutent qu'il est très rare pour un anticorps murin de générer une immunogénicité négligeable et à l'inverse, très fréquent pour ce même type d'anticorps d'observer que 100% des patients développent des HAMA. On comprend dès lors aisément que les anticorps murins ne constituent pas le format d'anticorps idéal pour des injections répétées lors de traitements chroniques (Jakobovits *et al.*, 2007).

Cependant, ces résultats méritent d'être nuancés. Bien que l'immunogénicité des anticorps murins ait refroidi l'enthousiasme qui leur était réservé dans le traitement des cancers, des études cliniques (Khazaeli *et al.*, 1994 ; DeNardo *et al.*, 2003) ont montré que la survenue des HAMA n'est pas en soi un obstacle à l'utilisation des anticorps murins, dans le sens où les réactions d'hypersensibilité immédiate sont rares et ne mettent pas en jeu le pronostic vital. Il semble que le développement d'une réponse de type HAMA soit dépendant du type de cancer traité : globalement, elle est observée chez 40 à 80% des patients traités par anticorps murin pour une tumeur solide (Khazaeli *et al.*, 1994). A l'inverse, la majorité des

patients traités chroniquement pour hémopathies affectant la lignée B ne font pas d'HAMA : seulement 2-17% des patients traités par tositumomab (Bexxar®) et 2% par ibritumomab (Zevalin®) (McLaughlin *et al.*, 1998 ; Kaminski *et al.*, 2000). Ces résultats sont vraisemblablement dus à la fois à la déplétion en lymphocytes B sains et malins instaurée par le traitement anti-CD20, mais également à la tolérance induite par les fortes doses d'anticorps, nécessaires pour saturer l'antigène qui est exprimé en forte densité sur les cellules B (Mirick *et al.*, 2004). De plus, certains auteurs (Khazaeli *et al.*, 1994 ; Mirick *et al.*, 2004) ont montré que la survenue d'HAMA est associée, de façon tout à fait inattendue, à une survie prolongée des patients. Ils invoquent le développement d'un réseau anti-idiotypique où le paratope des HAMA, spécifiques de l'idiotype de l'anticorps murin, représenterait l'image en miroir de l'antigène tumoral et pourrait stimuler une réponse anti-anti-idiotypique possiblement à l'origine d'une réponse humorale naturelle du patient vis-à-vis de la tumeur ! Finalement, le problème essentiel associé aux HAMA est qu'ils altèrent la PK des anticorps murins en accélérant leur élimination et diminuant leur efficacité (Khazaeli *et al.*, 1994 ; DeNardo *et al.*, 2003), conduisant les développeurs à se tourner vers d'autres molécules thérapeutiques.

L'immunogénicité des anticorps murins n'est cependant pas leur seul point faible. En effet, ces anticorps interagissent assez mal avec les récepteurs humains pour la portion Fc des IgG (FcγR) et le système du complément (Clark, 1984), ne recrutant donc pas de façon optimale les effecteurs pouvant être nécessaires à une réponse immunitaire de type cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC, *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) ou cytotoxicité dépendante du complément (CDC, *complement-dependent cytotoxicity*). Par ailleurs, il est maintenant connu que le FcRn humain, récepteur néonatal des IgG impliqué dans leur catabolisme, lie les IgG murines avec une plus faible affinité que ne le fait le FcRn murin, ce qui explique que la demi-vie de ces anticorps soit assez courte, indépendamment de la présence d'HAMA (Ober *et al.*, 2001 ; Loisel *et al.*, 2007).

De fait, les interactions des anticorps murins avec le système immunitaire ainsi que leur PK relèvent de l'implication la portion Fc de ces IgG avec certains récepteurs. Il se trouve que cette même portion Fc pourrait être également très liée à l'immunogénicité de ces molécules. En effet, l'identification des structures des anticorps impliquées dans leur immunogénicité a été rendue possible par les expériences de digestion enzymatique des anticorps de lapin par la papaïne, publiées dès 1959 par Porter (Porter, 1959). L'auteur montre que les anticorps sont divisés en trois fragments appelés I, II et III. Les deux premiers très

semblables, situés à l'extrémité N-terminale de la molécule et capables de lier l'antigène sont nos actuels Fab, *fragment antigen binding*. Le troisième, de structure très différente des deux autres, en C-terminale qui cristallise facilement correspond au Fc, *crystallized fragment*. Pour Porter, c'est ce fragment III qui porte la majorité de l'antigénicité (et de l'immunogénicité) de la molécule originelle (Porter, 1959 ; Porter, 1967).

C'est pourquoi l'évolution de la conception des anticorps thérapeutiques s'est orientée, dès les années 1980, vers une humanisation privilégiée de la portion Fc des anticorps murins. La génération d'anticorps monoclonaux recombinants chimériques, associant des régions murines et humaines, a été possible grâce à l'essor conjoint des biotechnologies qui ont permis une humanisation des anticorps de plus en plus poussée, aboutissant à la production d'anticorps humanisés et même totalement humains.

1-3 Les anticorps monoclonaux recombinants

La première génération d'anticorps monoclonaux recombinants à visée thérapeutique à avoir été commercialisée sont les anticorps chimériques avec comme chef de file l'abciximab (RéoPro®) commercialisé en 1994. Cette nouvelle famille est le fruit des avancées technologiques mises en œuvre par une équipe américaine (Morrison *et al.*, 1984) : l'humanisation des domaines constants des anticorps murins ainsi obtenue a permis de réduire l'induction d'une réponse immunitaire, tout en possédant des propriétés effectrices et pharmacocinétiques typiques des IgG1 humaines (sous-classe majoritaire des anticorps monoclonaux recombinants), portées par leur portion Fc. La très nette amélioration des propriétés des anticorps chimériques par rapport aux anticorps murins aurait pu consacrer les premiers et arrêter net la quête de moindre immunogénicité de ces molécules. Heureusement ou pas, la course à la propriété industrielle rattrape cependant bien souvent les préoccupations des scientifiques, poussant ces derniers à imaginer de nouvelles stratégies pour contourner les brevets et, autant que possible, à les surpasser. De fait, l'histoire des anticorps thérapeutiques étroitement liée à celle des biotechnologies a vu l'élaboration des anticorps humanisés, plus humains que les chimériques, emmenés par l'alemtuzumab (MabCampath®), revendiquant d'être bien sûr, moins immunogènes que les chimériques (Riechmann *et al.*, 1988).

1-3-1 Structure des anticorps monoclonaux recombinants

Tous les anticorps monoclonaux recombinants actuellement sur le marché appartiennent aux IgG (Tableaux II, IV et V), classe d'immunoglobulines dont la structure, en un siècle de recherche sur les anticorps, est bien connue (Figure 5).

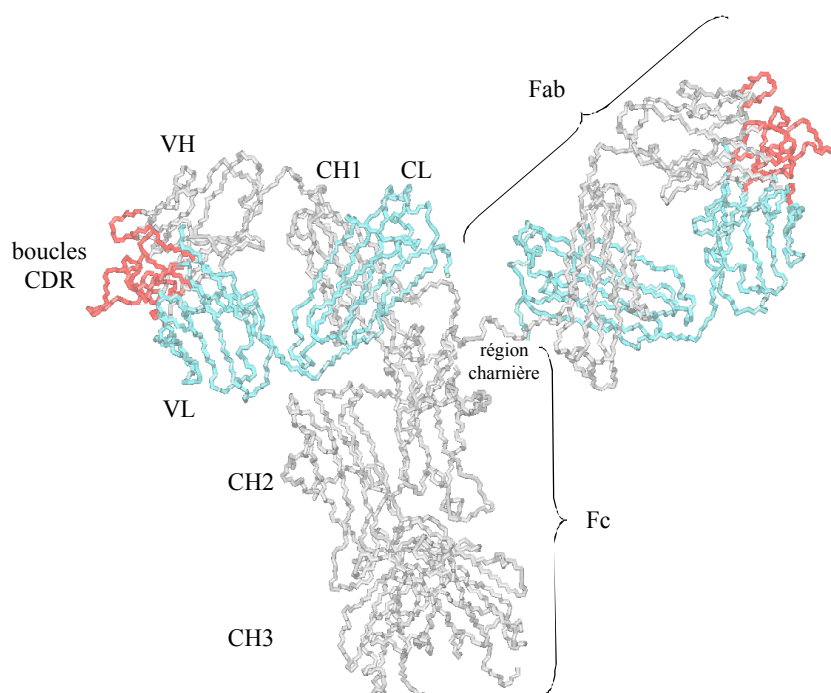


Figure 5 : Représentation tridimensionnelle d'une IgG1k humaine. Il s'agit de la représentation du squelette carboné de l'anticorps monoclonal b12 dirigé contre la glycoprotéine d'enveloppe gp210 du VIH, la première, et jusqu'à présent la seule, IgG1k humaine entière obtenue par cristallographie (Saphire *et al.*, 2001) (PDBand IMGT/3Dstructure-DB, <http://imgt.org> : 1hzh). La figure a été générée avec le logiciel VMD (Humphrey *et al.*, 1996). Les deux mêmes chaînes lourdes $\gamma 1$ figurent en gris alors que les deux chaînes légères sont en bleu liées entre elles par des ponts disulfure. Ces quatre chaînes sont repliées en domaines : un domaine variable VH et trois domaines constants CH1, CH2 et CH3 pour chaque chaîne lourde avec une région charnière se situant entre les domaines CH1 et CH2. Chaque chaîne légère κ est quant à elle composée d'un domaine variable VL et un domaine constant CL aussi appelés V-KAPPA et C-KAPPA (Lefranc & Lefranc, 2001). Les trois bras de l'anticorps correspondent aux deux bras Fab (*Fragment antigen binding*) et un Fc (*Fragment crystallised*). Chaque Fab porte un site de liaison à l'antigène ou paratope (les boucles CDR, *complementarity determining regions* figurent en rouge). Contrairement à la représentation schématique classique d'un anticorps sous la forme d'un Y figé et symétrique, la structure cristalline illustre parfaitement l'asymétrie de la molécule qui résulte de la grande flexibilité des trois bras autour des ponts disulfure de la région charnière.

En dehors de leur appartenance à la même classe d'immunoglobuline, ces anticorps thérapeutiques varient dans leur degré d'humanisation ce qui affecte les séquences peptidiques de leurs chaînes lourdes et légères ainsi que dans leur format, selon qu'il s'agit d'une molécule entière ou d'un fragment. D'une part, leurs domaines variables sont modifiés avec la possible combinaison de séquences d'origine murines et humaines, mais également leurs domaines constants, selon la ou les sous-classe(s) d'IgG choisie(s) ainsi que les éventuelles variations apportées à la séquence d'origine pour optimiser l'efficacité, la pharmacocinétique de la molécule ou diminuer son immunogénicité.

1-3-2 Degré d'humanisation

Les anticorps d'origine murine utilisés en médecine humaine sont généralement immunogènes. Cette réponse immunitaire est largement moindre vis-à-vis des chimériques et ne concerne pas tous les patients. Les efforts d'humanisation ultérieurs, centrés sur les domaines variables et aboutissant à la génération d'anticorps humanisés et complètement humains, semblent en réduire plus encore l'immunogénicité sans pour autant l'éliminer (Hwang & Foote, 2005).

L'isotypie n'est pas source d'immunogénicité dès lors que les anticorps sont chimériques, humanisés ou totalement humains. La plus grande avancée en ce qui concerne l'immunogénicité de ces molécules réside finalement dans le fait que la portion Fc d'anticorps de souris ait été remplacée par les domaines constants humains correspondant (Kuus-Reichel 1994 ; Hwang & Foote, 2005), faisant des anticorps chimériques la première génération d'anticorps tolérables et fonctionnels chez l'homme en traitement chronique. En ce qui concerne la fonctionnalité des anticorps entiers, l'origine humaine de la portion Fc est très importante pour créer des interactions optimales entre anticorps et cellules du système immunitaire et donc permettre une plus grande efficacité (Clark, 1984). Elle allonge également la demi-vie des IgG en favorisant leur prise en charge par le FcRn, récepteur impliqué dans le métabolisme des IgG.

En revanche, le paratope de l'anticorps, constitué par la combinaison des régions hypervariables des domaines variables de ses chaînes lourdes et légères (Figure 5), est le résultat de la configuration unique des acides aminés constituant le site de liaison à l'antigène. Il est également appelé idiotype lorsqu'il est fait référence aux sites antigéniques qu'il porte. Cet idiotype constitue donc un déterminant antigénique propre à chaque espèce d'anticorps

(De Lange, 1988) et susceptible d'induire une réponse anticorps anti-idiotypique. En effet, Benjamin et collaborateurs en 1986 précisent que cette réponse restera un problème constant des traitements par anticorps thérapeutiques que ceux-ci soient chimériques ou humanisés (Benjamin *et al.*, 1986).

1-3-3 Format

Parmi les 20 anticorps thérapeutiques nus commercialisés, trois d'entre eux seulement ne sont pas des IgG entières, mais des Fab. Il s'agit de l'abciximab (Reopro[®]), du ranibizumab (Lucentis[®]) et du certolizumab pegol (Cimzia[®]). La forme des anticorps thérapeutiques est importante puisqu'il semble que les fragments Fab soient moins immunogènes que les F(ab')₂ ou l'immunoglobuline entière (Kuus-Reichel *et al.*, 1994). Les études cliniques relatives à l'utilisation du ranibizumab ne rapportent pas la survenue d'anticorps ciblant ce médicament (Rosenfeld *et al.*, 2006). En revanche, le certolizumab pegol stimule une réponse immunitaire chez 9% des patients qui en reçoivent (Schreiber *et al.*, 2007). De la même façon, l'abciximab qui est un Fab chimérique anti-GPIIb/IIIa utilisé comme anti-agrégant plaquettaire, est tout de même à l'origine chez certains patients traités d'une réponse immune de type *HACA*, *human anti-chimeric antibodies* (Dery *et al.*, 2004). En effet, l'anticorps murin 7E3 à l'origine de l'abciximab a été utilisé sous forme de fragments Fab afin d'empêcher la phagocytose des plaquettes qui pourrait être médiée par la portion Fc des IgG les recouvrant, leur activation par le FcγRIIA plaquettaire mais aussi pour mieux contrôler la demi-vie de la molécule en raison du risque hémorragique qui lui est associé. Par la suite, le Fab 7E3 murin a été développé dans une version chimérique pour en réduire l'immunogénicité (Knight *et al.*, 1995). Effectivement, 45% des patients traités avec le Fab murin ont développé des anticorps alors qu'une réponse équivalente n'a été recensée que chez 5,8% des patients traités avec son homologue chimérique. De plus, les auteurs ont remarqué que pour 17% des patients traités avec le Fab murin, la réponse est entièrement dirigée contre ses domaines variables, alors que ceci n'est observé que chez 1% des patients traités avec le Fab chimérique (Knight *et al.*, 1995). L'hypothèse des auteurs est que les régions constantes CH1 et CL sont d'importants modulateurs de la réponse immunitaire dirigée contre les domaines variables (Khazaeli *et al.*, 1991 ; Del Val *et al.*, 1991 ; Knight *et al.*, 1995).

Les Fab d'anticorps représentent un format attractif car ils se distribuent rapidement dans les tissus, en revanche leur affinité pour l'antigène est plus faible que pour une IgG

entière homologue et leur demi-vie plus courte. C'est pourquoi, comme le ranibizumab (Gaudreault *et al.*, 2005), ces molécules peuvent être issues de variants dont l'affinité pour la cible antigénique est optimisée, ou peuvent être couplée, comme le certolizumab à des molécules de polyéthylène-glycol afin d'allonger leur demi-vie à 14 jours (Rodrigues *et al.*, 2009, Wong *et al.*, 2008).

La comparaison des propriétés effectrices de trois anticorps anti-TNF- α *i.e* infliximab, certolizumab pegol et adalimumab, permet d'illustrer l'influence de la structure des molécules sur leurs mécanismes d'action. Bien qu'aucune donnée ne soit actuellement publiée sur le mécanisme d'action du tout nouveau golimumab (Symponi[®]), dernier-né des anti-TNF- α , on peut imaginer qu'il se rapproche de celui de l'infliximab et l'adalimumab qui sont comme lui des IgG entières. En effet, ces deux biomédicaments sont capables de stimuler une cytotoxicité dépendante du complément (*CDC, complement-dependent cytotoxicity*), une cytotoxicité dépendante des anticorps (*ADCC, antibody- dependent cell-mediated cytotoxicity*), d'augmenter la proportion de cellules entrant en apoptose et la dégranulation des polynucléaires neutrophiles, ce dont n'est pas du tout capable le certolizumab pegol (Scallon *et al.*, 1995, Schen *et al.*, 2005, Fossati & Nesbitt, 2005, Nesbitt *et al.*, 2007). De plus, ces résultats suggèrent que ces mécanismes ne sont pas indispensables à l'efficacité des anti-TNF- α contrairement à l'inhibition de la production d'IL-1 β observée avec les trois molécules (Nesbitt *et al.*, 2007). Pour Wong et collaborateurs c'est précisément la potentielle toxicité liée aux propriétés effectrices du fragment Fc de l'infliximab et de l'adalimumab, capable de recruter le complément mais aussi des effecteurs cellulaires grâce aux récepteurs Fc γ R qui est à l'origine du développement du Fab certolizumab pegol (Wong *et al.*, 2008). Les travaux menés par notre équipe en collaboration avec des gastro-entérologues belges montrent en effet que la liaison aux Fc γ RIIIA pourrait tout de même intervenir dans l'efficacité des IgG1 entières anti-TNF- α puisqu'ils ont montré que le polymorphisme *FCGR3A-158V/F* qui affecte le Fc γ RIIIA est associé à la réponse biologique de l'infliximab dans la maladie de Crohn (Hanauer *et al.*, 2002 ; Louis *et al.*, 2004). Les auteurs ont proposé qu'à l'instar de ce qui est observé avec le rituximab, le recrutement des effecteurs cellulaires par l'interaction Fc-Fc γ RIIIA aboutissant à l'ADCC serait modulée par la concentration d'infliximab (Louis *et al.*, 2006, Willot *et al.*, 2006).

1-4 Les anticorps monoclonaux recombinants chimériques

1-4-1 Ingénierie des anticorps chimériques

Actuellement, six anticorps chimériques ont reçu l'AMM, autorisation de mise sur le marché. Il s'agit d'anticorps nus indiqués dans le traitement de maladies auto-immunes ou de cancers (Tableau II). D'un point de vue structural, ils associent des domaines variables murins et des domaines constants humains, le plus souvent issus de chaîne lourde $\gamma 1$ et chaîne légère κ (Figure 6). Cependant, certains anticorps chimériques actuellement en développement sont élaborés à partir de domaines variables de primates et plus particulièrement de macaque, une façon de se rapprocher un peu plus du répertoire humain des immunoglobulines : c'est le cas du lumiliximab et du galiximab ciblant respectivement CD23 et CD80 (Reichert, 2004 ; Castillo *et al.*, 2008). En effet, les séquences des anticorps de primates sont plus proches des séquences humaines que leurs homologues murins suggérant leur moindre immunogénicité pour l'homme (Laffly *et al.*, 2005) ce que confirment certaines études (Bugelski *et al.*, 2000 ; Gottlieb *et al.*, 2004).

Tableau II: Anticorps chimériques approuvés pour un usage thérapeutique (Wang *et al.*, 2009 ; Jefferis & Lefranc, 2009 ; Beck *et al.*, 2009)

Dénomination commune internationale (spécialité)	AMM ^a	Isotype ; format	Allotype G1m Km	Cible antigénique	Indications thérapeutiques
abciximab (Reopro [®])	1994	Fab d'IgG1	nd	GPIIb/IIIa	Anti-agrégant plaquettaire dans la prévention des complications cardiaques ischémiques
rituximab (MabThera [®] , Rituxan ^{®b})	1997	IgG1κ entière	G1m17,1 Km3	CD20	Lymphomes malins non-hodgkiniens
basiliximab (Simulect [®])	1998	IgG1κ entière	G1m3 Km3	CD25	Prévention du rejet aigu de greffe rénale
infliximab (Remicade [®])	1998	IgG1κ entière	G1m17,1 Km3	<i>TNF-α, tumor necrosis factor-α</i>	Polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante, maladie de Crohn de l'adulte et de l'enfant, rectocolite hémorragique, psoriasis, rhumatisme psoriasique
ch-TNT (Vivatuxin [®])	2003 uniquement en Chine	Couplé à ¹³¹ I	nd	nd	Cancer du poumon
cétuximab (Erbix [®])	2004	IgG1κ entière	G1m3 Km3	<i>EGFR, epidermal growth factor receptor (ERBB1)</i>	Cancer du colon métastatique
metuximab (Licartin [®])	2005 uniquement en Chine	F(ab') ₂ couplé à ¹³¹ I		CD147	Carcinome hépatique

^a AMM, Autorisation de Mise sur le Marché : année du premier enregistrement *FDA, Food and Drugs Administration, EMEA, European Medicines Agency* ou *SFDA, China State Food and Drug Administration*. ^b Le rituximab est commercialisé sous le nom de spécialité Rituxan[®] aux Etats-Unis, au Canada et au Japon et sous le nom de spécialité MabThera[®] dans le reste du monde. nd, non déterminés

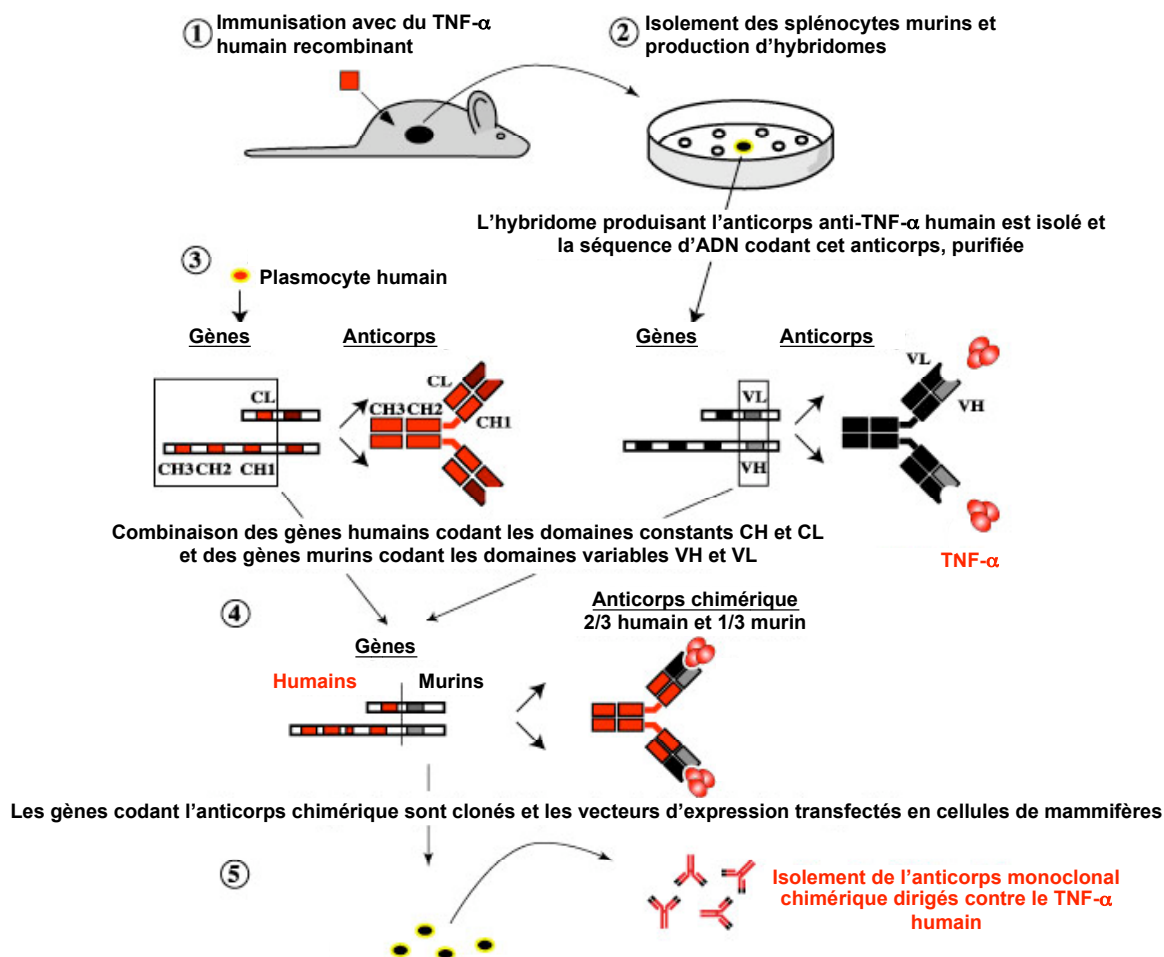


Figure 6 : Production des anticorps chimériques : exemple d'un anticorps anti-TNF- α humain (d'après Bendtzen, 2006 (site de l'IIR)). ① Les souris sont immunisées avec l'antigène d'intérêt, ici du TNF- α humain recombinant. ② Les cellules B murines spléniques ou splénocytes sont utilisées pour préparer des hybridomes (Figure 4). Les clones obtenus produisant l'anticorps anti-TNF- α humain sont isolés. ③ Les séquences (soit d'ADN génomique réarrangé, soit d'ADN complémentaire) codant les domaines variables murins d'une part et les séquences codant les régions constantes humaines issues de plasmocytes ou de lymphocytes B humains d'autre part sont isolées, purifiées et ④ fusionnées pour coder ensemble un anticorps chimérique spécifique du TNF- α humain. ⑤ Ces séquences hybrides sont ensuite clonées dans des vecteurs d'expression qui sont à leur tour transfectés dans des cellules de mammifères (CHO, Sp2/0) afin de produire des anticorps chimériques correctement glycosylés (Knight *et al.*, 1993 ; Reff *et al.*, 1994).

1-4-2 Choix de l'isotype de chaîne légère et de chaîne lourde

1-4-2-1 Les chaînes légères

La majorité des anticorps thérapeutiques portent des chaînes kappa (Tableaux I, II, IV et V), celles de l'abciximab n'ayant pas été rendues publiques (Wang *et al.*, 2009). Seul le tositumomab (Bexxar®) (Tableau I) est connu pour avoir des chaînes légères lambda. La raison de cette distribution semble venir du fait que chez les souris, modèle utilisé pour la préparation des anticorps chimériques et humanisés, 95% des chaînes légères sont kappa (Wang *et al.*, 2009 ; Almagro *et al.*, 1998).

1-4-2-2 Les chaînes lourdes

Les domaines constants des anticorps monoclonaux recombinants chimériques et des générations ultérieures d'anticorps qui ont été développées (humanisés et complètement humains) sont d'origine humaine. Pour les anticorps thérapeutiques qui sont des immunoglobulines entières, le choix de l'isotype de chaîne lourde conditionne à la fois l'immunogénicité de la molécule mais également ses fonctions. En effet, Reitan et Hannestad ont observé qu'un idiotype immunogène porté par une IgM monoclonale murine (sans adjuvant) devient tolérogène chez la souris lorsqu'il est porté par une IgG (IgG1, IgG2a et 2b, IgG3) ou une pIgA (IgA polymérique) et reste immunogène s'il est porté par une IgE, une IgA monomérique ou encore un fragment F(ab')₂ d'IgG1 (Reitan & Hannestad, 2002). La moindre immunogénicité des IgG et pIgA est probablement liée à leur demi-vie : les IgG induiraient une tolérance à forte dose (longue demi-vie) et les pIgA une tolérance à faible dose (courte demi-vie). Cependant, le travail de Yata et collaborateurs modère l'immunogénicité des fragments d'anticorps en montrant que la réponse immunitaire induite par le fragment Fab d'un anticorps chimérique a une intensité plus faible que l'anticorps entier correspondant (Yata *et al.*, 2003). Au total, la région Fc détermine l'immunogénicité ou l'induction de tolérance d'un idiotype, avec des résultats différents d'une étude à l'autre qui sont sans doute fonction de la spécificité antigénique et des conditions expérimentales. Ce rôle dévolu à la portion Fc souligne l'importance des interactions avec les FcγR et le système du complément dans ce phénomène.

Le rôle des FcγR dans la réponse immunitaire anti-anticorps thérapeutique a été évalué grâce aux travaux de Whitmer et collaborateurs. Ils ont étudié l'induction de tolérance vis-à-vis de γ-globulines humaines chez des souris déficientes en récepteurs FcγR activateurs (souris dont le gène codant FcR-γ a été invalidé) ou en récepteur FcγR inhibiteur, le FcγRII. Leurs résultats suggèrent que les FcγR activateurs ne contribuent pas à la réponse cellulaire T anti-anticorps, mais qu'en revanche l'immunogénicité des anticorps est augmentée en l'absence du récepteur inhibiteur FcγRII (Whitmer *et al.*, 1997).

Le mode d'action de certains anticorps thérapeutiques mobilise également le système du complément. Or il semble que les protéines qui le composent puissent influencer l'immunogénicité des anticorps sur lesquels elles se fixent. En effet, la recherche en matière de thérapie anti-cancéreuse s'oriente vers le développement de vaccins anti-tumoraux. Il s'agit d'anticorps dont l'idiotype mime un antigène tumoral : ceci permettrait de présenter l'antigène (l'idiotype) au système immunitaire, de rompre la tolérance et stimuler une réponse immunitaire efficace. Or utilisés seul, ces anticorps induisent une réponse anti-idiotypique trop faible pour être réellement efficace. De plus, les adjuvants disponibles, potentiellement toxiques, ne sont pas tous utilisables en thérapeutique humaine. C'est la raison pour laquelle Lou et collaborateurs ont travaillé sur l'utilisation de protéines du complément comme adjuvant. Les auteurs ont donc fixé le C3d sur les régions charpentes des domaines variables de l'anticorps anti-idiotypique mimant l'antigène carcino-embryonnaire, en s'assurant que cette liaison ne modifiait pas la reconnaissance de l'antigène et n'induisait pas la formation de complexes immuns. La fraction C3d se lie physiologiquement sur les lymphocytes B à son récepteur CR2, ce qui peut initier la réponse immunitaire B-T. De fait, ils ont ainsi pu observer une forte réponse anti-idiotypique (Lou & Kohler, 1998). Ces résultats suggèrent que le complément, en se liant aux anticorps peut modifier leur immunogénicité. En revanche, notre recherche bibliographique n'a recensé aucune étude de l'influence du recrutement du complément et du C3d en particulier, sur l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques commercialisés.

Les anticorps entiers nus utilisés en thérapeutique dérivent tous, pour leurs domaines constants de chaînes lourdes, d'une IgG et la majorité d'entre elles sont des IgG1 (Tableaux II, IV, V). Ce choix fut motivé par la meilleure connaissance que nous avons de cette classe et de cette sous-classe (les IgG1 représentent 60% des IgG humaines circulantes), leur grande spécificité antigénique en tant qu'acteurs de la réponse immunitaire secondaire et les

fonctions effectrices liées à leur Fc (Tableau III) contribuant possiblement à l'efficacité thérapeutique de l'anticorps (Burton & Wook., 1992 ; Jefferis, 2007 ; Jefferis, 2010). Le modèle que représentent les IgG fut non seulement appliqué aux premiers anticorps thérapeutiques élaborés, mais continu d'être employé pour les anticorps entiers actuellement en développement (Jefferis, 2010) : les IgA et les IgM sont d'un intérêt limité, et ce d'autant que les IgM sont très difficiles à préparer en raison de la complexité de leur structure et de leur poids, qui limite également leur passage à travers les barrières endothéliales pour atteindre leur antigène (Carter, 2006).

Tableau III: Caractéristiques fonctionnelles des quatre sous-classes d'IgG humaines (Alyanakian *et al.*, 2003 ; Salfeld, 2007 ; Jefferis, 2007 ; Bruhns *et al.*, 2009)

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Distribution au sein des IgG	60%	25%	10%	5%
Demi-vie (jours)	36,3 ± 9,2	37,1 ± 13,9	28,6 ± 10,4	15,6 ± 4,5
Liaison au FcRn	+	+	+	+
Liaison au C1q	++	-	+++	-
FcγRI	+++	-	+++	+++
FcγRIIA	++	+	++	+
FcγRIIB/C	+	+	+	+
FcγRIIIA	++	+	++	+
FcγRIIIB	+	-	++	-

1-4-2-3 Les IgG1

La sous-classe d'IgG choisie pour un anticorps thérapeutique dépend des fonctions et de la demi-vie souhaitées. En 1996, Isaacs et collaborateurs ont étudié le CAMPATH-1H, une IgG1 qui cible le CD52 sur les lymphocytes et les monocytes et provoque la lyse de ces cellules aussi bien chez les patients traités pour un lymphome qu'une maladie auto-immune. L'activité thérapeutique des anticorps ne justifie pas toujours d'avoir un effet cytolytique, très utile en thérapie anti-cancéreuse, et donc de posséder les domaines constants d'une IgG1

(Beenhouwer *et al.*, 2007). C'est pourquoi les auteurs ont analysé l'activité biologique du CAMPATH-1H portant les domaines constants d'une IgG4, connue pour ne pas être cytolytique. Ils montrent que le variant IgG4 a un pouvoir déplétant plus faible que l'IgG1 mais bien réel (Issacs *et al.*, 1996) expliqué par sa fixation sur FcγRI et FcγRIIA-158V (Tableau III). Cette fonction n'est pas si franche pour d'autres anticorps monoclonaux IgG4 de spécificités antigéniques différentes. En revanche, des travaux antérieurs ont rapporté que la version IgM ou IgG2a de rat du CAMPATH ne sont pas cytopénisants (Dyer *et al.*, 1989).

Le bévacizumab (Avastin®) est une IgG1κ qui agit en neutralisant le VEGF soluble afin que celui-ci ne se fixe pas sur ses récepteurs (Shih & Lindley, 2006) et les fonctions liées à sa portion Fc n'interviennent pas du tout dans son efficacité thérapeutique (Labrijn *et al.*, 2008). Finalement, le seul avantage d'être sous la forme d'une IgG entière pour les anticorps thérapeutiques strictement neutralisant comme le bévacizumab, est d'avoir une demi-vie longue (Shih & Lindley, 2006). Parmi les alternatives permettant de se libérer des fonctions associées au Fc des IgG1, a déjà été envisagée l'utilisation de fragment Fab (Labrijn *et al.*, 2008 ; § 1-3-3), mais il est également possible d'envisager une sous-classe différente d'IgG1 ou une portion Fc qui serait aglycosylée.

Quelques rares exceptions parmi les anticorps commercialisés ne sont pas des IgG1 mais des IgG2, des IgG4 ou des hybrides IgG2/IgG4 (Tableau IV). Jusqu'à présent les IgG3 ont été exclues en raison de leur trop longue charnière, de leur trop grande sensibilité à la protéolyse et de leurs trop nombreux allotypes (Carter, 2006 ; Salfeld *et al.*, 2007). Cependant, les récents travaux de Stapleton et collaborateurs pourraient faire évoluer l'opinion à ce sujet. En effet, ils ont montré que la courte demi-vie des IgG3 (7 jours) résulte d'une meilleure prise en charge des autres sous-classes d'IgG par le FcRn à la faveur d'une histidine commune en position 435 quand les IgG3 portent elles une arginine. La construction d'un variant d'IgG3 porteur d'une histidine en position 435 restaure une demi-vie comparable à celle des IgG1. Ces résultats suggèrent que les IgG3 aux propriétés effectrices remarquables (très bon recrutement du C1q, très bonne liaison au FcγRI et FcγRIII) pourraient être un très bon candidat pour le développement de futurs anticorps thérapeutiques (Stapleton *et al.*, 2009).

1-4-2-4 Les IgG2

Le choix d'une IgG2 se justifie par une activité effectrice plus limitée que les IgG1 (Canfield & Morrison, 1991 ; Jefferis, 2007), qui n'est en effet pas forcément indispensable, voire préjudiciable, au bon fonctionnement de l'anticorps. Des travaux récents ont montré que leur structure présente une certaine originalité : une organisation variable des ponts disulfure de leur région charnière serait à l'origine de 3 isoformes IgG2-A, -B et -A/B présents au sein d'une même population d'anticorps et dont la distribution est influencée par la chaîne légère qui leur est associée et leur micro-environnement en termes d'oxydo-réduction (Figure 7). Ces trois isoformes ont des conformations différentes influençant l'orientation des bras Fab et Fc ainsi que la flexibilité des molécules. Les auteurs ont mis en évidence leurs différences fonctionnelles en comparant l'action neutralisante d'une IgG1 κ et des isoformes d'une IgG2 κ monoclonales, de paratopes identiques et dirigées contre le récepteur R1 de l'IL-1 β . Leurs résultats montrent que l'IgG1 inhibe plus fortement les effets cellulaires de l'IL-1 β , i.e. la production d'IL-6 que les isoformes d'IgG2, mais aussi qu'il existe une nette différence entre IgG2-A et IgG2-B (IgG2-A>IgG2-B) (Wypych *et al.*, 2008 ; Dillon *et al.*, 2008).

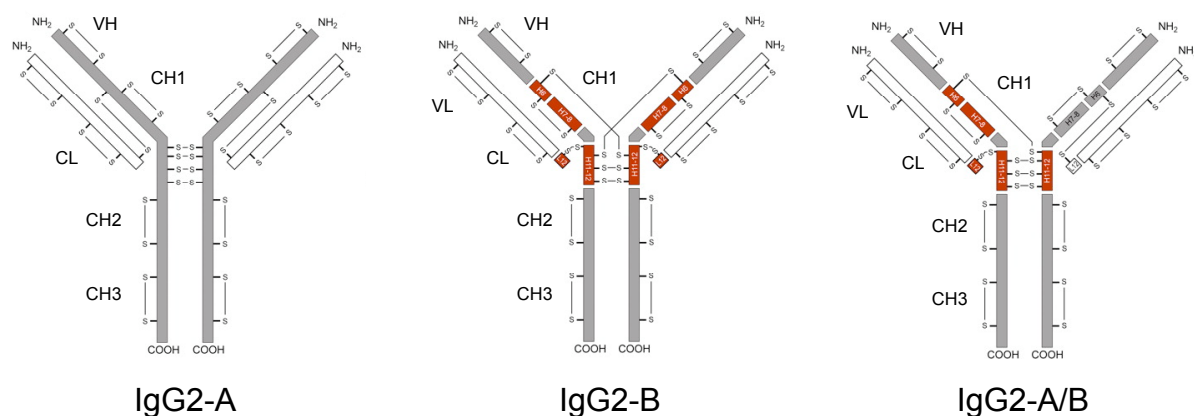


Figure 7 : Isoformes d'IgG2 humaines impliquant différentes conformations de ponts disulfure inter-chaînes (d'après Wypych *et al.*, 2008). Noter que seule l'isoforme IgG2-A présente des ponts disulfure inter-chaînes strictement localisés dans la région charnière. Les isoformes IgG2-B et IgG2-A/B ont des liaisons disulfures stables impliquant des résidus cystéine de la charnière avec la cystéine en C-terminal du domaine constant (CL) de chaîne légère (blanc) d'une part, et une cystéine du premier domaine constant (CH1) de chaîne lourde (gris) d'autre part. L'isoforme pour lequel la charnière est associée aux deux bras Fab par des ponts disulfure est appelé IgG2-B, alors que l'isoforme avec un bras Fab indépendant de la charnière (comme pour IgG2-A) et un bras Fab connecté à la charnière (comme pour IgG2-B) est appelé IgG2-A/B.

Bien que l'instabilité des ponts disulfure des IgG2 puisse limiter l'engouement pour développer des molécules thérapeutiques appartenant à cette sous-classe, plusieurs sont déjà utilisées en médecine (Tableau IV). C'est le cas particulier de l'éculizumab (Figure 8), un hybride IgG2/IgG4 où précisément les CH1 et la charnière sont issus d'une IgG2, et les domaines CH2 et CH3 d'une IgG4 (Thomas *et al.*, 1996 ; Wang *et al.*, 2009).

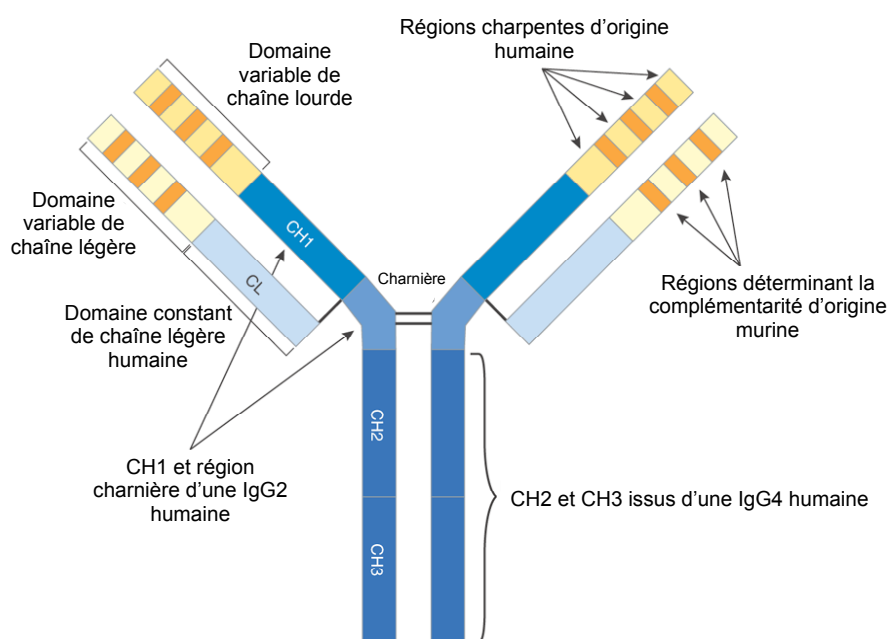


Figure 8 : Structure de l'éculizumab (Soliris®) (d'après Rother *et al.*, 2007). L'éculizumab est un anticorps humanisé associant des régions déterminant la complémentarité d'origine murine et des régions charpentes humaines. Ses domaines constants combinent le CH1 et la charnière d'une IgG2 humaine avec le CH2 et le CH3 d'une IgG4 humaine n'activant pas la cascade du complément et ne recrutent pas les effecteurs cellulaires par cette portion Fc hybride.

Ce choix étonnant avait été initialement fait pour élaborer un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VCAM, *vascular cell adhesion molecule* porcine afin de bloquer l'adhésion des cellules *natural killer*, des lymphocytes T et des monocytes humains sur les cellules endothéliales aortiques porcines en xénotransplantation (Mueller *et al.*, 1997). Dans ce contexte de rejet de greffe, stimuler l'activation du complément et les interactions avec les FcγR n'étant pas souhaitable, les auteurs ont imaginé associer artificiellement IgG4 et IgG2 en raison de leur inaptitude commune à activer la cascade du complément (Tao *et al.*, 1993 ; Smith *et al.*, 1995 ; Thomas *et al.*, 1996 ; Canfield & Morrison, 1991) et la faible interaction

des IgG2 avec les FcγR (Canfield & Morrison, 1991) impliquant par ailleurs la charnière (Duncan *et al.*, 1988). Cette alternative a été préférée à la modification de la séquence d'une chaîne lourde en vue d'invalider les sites de liaison du complément et des FcγR risquant de générer des sites immunogènes. Les travaux sur l'anticorps anti-VCAM porcin ont été menés par la firme (Alexion Pharmaceuticals) qui simultanément a mis au point l'éculizumab. Cette construction lui a sans doute été par la suite appliquée puisque l'éculizumab est un anticorps neutralisant la fraction C5 du complément.

1-4-2-5 Les IgG4

L'instabilité des ponts disulfure a également été rapportée pour les IgG4. Elle est due à la présence d'une sérine dans la charnière des IgG4 à une position où les IgG1 ont une proline ce qui influence les ponts disulfure inter et intra-chaînes des IgG4. Bien que la stabilité de la molécule soit assurée par des liaisons non covalentes au niveau de leurs domaines CH3, 25-75 % des IgG4 n'ont ainsi pas de liaison covalente associant leurs deux chaînes lourdes ce qui explique que dans certaines conditions les IgG4 soient capables d'échanger la moitié de leur molécule (une chaîne lourde associée à une chaîne légère ou hémi-anticorps). Ce mécanisme est appelé « *Fab-arm exchange* » et aboutit à la formation d'IgG4 bi-spécifiques (Aalberse & Schuurman, 2002) dont les conséquences pour le natalizumab (Tableau IV) viennent d'être évaluées. Labrijn et collaborateurs ont montré que le natalizumab est effectivement capable *in vivo* d'échanger la moitié de sa molécule avec des IgG4 endogènes, ce qui sous-tend que la charnière de cet anticorps n'a pas été modifiée dans le but de limiter le phénomène. Bien que ces résultats suggèrent que la PK et la pharmacodynamie du natalizumab puissent être altérées, aucun argument ne confirme cette hypothèse. Cependant, les auteurs prennent le parti du principe de précaution en conseillant d'introduire les mutations *ad hoc* lors de la conception de nouveaux anticorps thérapeutiques IgG4 (Labrijn *et al.*, 2009).

1-4-3 Glycosylation des anticorps thérapeutiques

Les IgG présentent sur leurs domaines CH2 un site de N-glycosylation en position 297 accueillant une chaîne oligosaccharidique impliquée dans la conformation des chaînes lourdes qui composent la portion Fc des IgG. Les sucres greffés sur les IgG humaines naturelles forment un complexe bi-antenné d'une formidable hétérogénéité centré sur une chaîne

conservée de sept sucres générant 128 glycoformes différents (Figure 9). Cette glycosylation est indispensable aux fonctions effectrices des IgG et leur efficacité varie d'une glycoforme à l'autre.

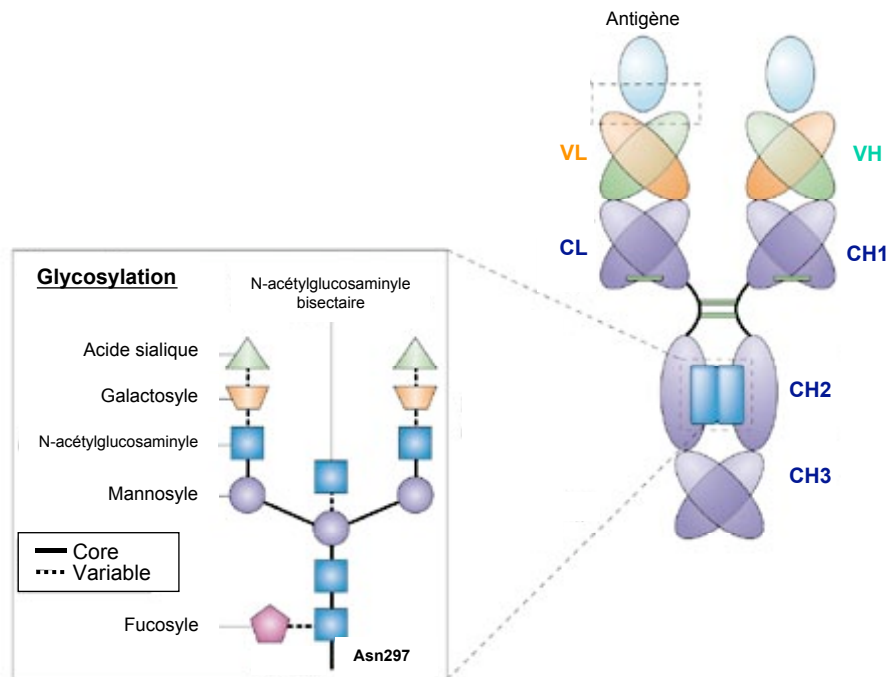


Figure 9 : Organisation des sucres associés aux IgG (modifié d'après Carter, 2006). Les IgG sont des protéines N-glycosylées au niveau du deuxième domaine constant de leurs chaînes lourdes (CH2), sur une asparagine conservée en position 297 (Asn297). Ces sucres forment un complexe bi-antenné comprenant un noyau (ou core) composé de sept résidus : 4 résidus N-acétylglucosaminyles et 3 mannoses sur lesquels sont greffés d'autres résidus sucres de nature variée : α -2,6-fucosyle, β -1,4-galactosyle, α -2,6-sialyle. Un résidu N-acétylglucosaminyle dit bisectaire ou intercalaire peut se situer entre les deux antennes.

Les anticorps thérapeutiques commercialisés sont produits en cellules de mammifères CHO, *Chinese Hamster Ovary*, NS0 ou Sp2/0 (myélomes murins) ce qui permet une glycosylation très proche de celle des IgG naturelles humaines et évite de générer une immunogénicité liée à ces sucres. En revanche, la glycosylation générée par ces cellules engendre une abondance des structures fucosylées et une faible galactosylation. Par ailleurs, ces lignées cellulaires n'expriment pas de β -1,4-N-acétylglucosaminyle transférase III (GnTIII), responsable de la greffe du résidu intercalaire (Figure 9). Bien que ces anticorps

soient fonctionnels, il a été montré qu'il est possible de moduler leurs propriétés effectrices en jouant sur la composition de leurs résidus sucrés (Jefferis, 2009).

En effet, l'étude d'IgG dont les résidus sucrés ont été tronqués a montré qu'ils conditionnent la conformation des IgG, altérant l'intégrité de leur structure et leur liaison au FcγR. Cette dernière est même totalement nulle lorsque les résidus se réduisent au seul N-acétylglucosaminyle lié à l'asparagine (Krapp *et al.*, 2003 ; Matsumiya *et al.*, 2007), ce qui pourrait être une solution pour invalider les propriétés effectrices des anticorps lorsque seule une fonction bloquante est souhaitée. En effet, Friend et collaborateurs ont développé un anticorps de rat humanisé dirigé contre le CD3, avec l'objectif de l'utiliser dans le traitement du rejet aigu de greffe d'organe. Ils ont substitué l'asparagine 297 de l'anticorps afin d'empêcher sa glycosylation et donc le recrutement d'effecteurs cellulaires et du complément. Les auteurs ont rapporté qu'aucun des neuf patients n'a manifesté de signes cliniques liés à la toxicité de la molécule ouvrant la voie de l'utilisation de molécules non glycosylées en médecine humaine (Friend *et al.*, 1999). La première molécule de ce genre est le romiplostim (Nplate®), un *peptibody*, c'est-à-dire une protéine de fusion, produite en *E. coli*, associant de façon covalente à la portion Fc d'une IgG1 humaine un peptide, composé de deux domaines de liaison au récepteur de la thrombopoïétine, le c-Mpl et stimulant la production de plaquettes (Cersosimo, 2009).

Il est maintenant clairement établi que l'ADCC et la CDC sont des mécanismes dépendant d'une glycosylation appropriée des anticorps monoclonaux recombinants (Nimmerjahn & Ravetch, 2007). Une activité ADCC particulièrement augmentée *in vitro* a été rapportée pour le variant afucosylé du rituximab laissant espérer une même efficacité *in vivo* (Niwa *et al.*, 2005). Kaneko et collaborateurs ont montré que la sialylation de la portion Fc des IgG est déterminante : les IgG fortement sialylées se lient moins bien aux FcγR que les IgG faiblement sialylées. De plus, ces auteurs ont identifié la fraction des IVIg riche en acide sialique comme étant leur principe actif suggérant leur rôle dans l'effet anti-inflammatoire de cette préparation (Kaneko *et al.*, 2006). Les firmes pharmaceutiques utilisent des lignées cellulaires conçues pour leur mode de glycosylation des IgG afin d'en optimiser les propriétés effectrices (Jefferis, 2009).

En ce qui concerne la glycosylation des anticorps monoclonaux recombinants actuellement sur le marché, le cas du cétuximab (Erbix[®]) mérite d'être rapporté puisqu'il est le seul anticorps à être glycosylé sur ses domaines variables d'origine murine. En effet, le cétuximab présente trois sites de N-glycosylation dont deux seulement sont occupés par des sucres : l'un se situe sur son domaine variable de chaîne lourde, le second sur son domaine CH2 (Qian *et al.*, 2007). Les travaux de O'Neil et collaborateurs rapportent que dans certains états américains 22% des patients traités par cétuximab ont développé de sévères réactions d'hypersensibilité survenant dans les minutes qui suivent leur toute première injection de l'anticorps (O'Neil *et al.*, 2007). Les auteurs ont avancé l'hypothèse qu'il s'agisse de réactions d'anaphylaxie dues à des IgE pré-existantes. En effet, Chung et collaborateurs ont montré que ces IgE sont bien présentes avant le début du traitement avec une plus forte prévalence dans les états d'Amérique où les réactions d'anaphylaxie ont été observées. Ces IgE sont spécifiques d'un oligosaccharide, le galactose- α -1,3-galactose présent sur le fragment Fab du cétuximab ainsi que sur les glycoprotéines et glycolipides de nombreux mammifères non primates et de nombreuses bactéries et micro-organismes de l'environnement (Chung *et al.*, 2008).

1-5 Les anticorps monoclonaux recombinants humanisés et complètement humains

1-5-1 Ingénierie des anticorps humanisés

Les anticorps humanisés (Tableau IV) constituent la seconde génération d'anticorps monoclonaux recombinants pour lesquels seules les CDR sont d'origine murine (Figure 10).

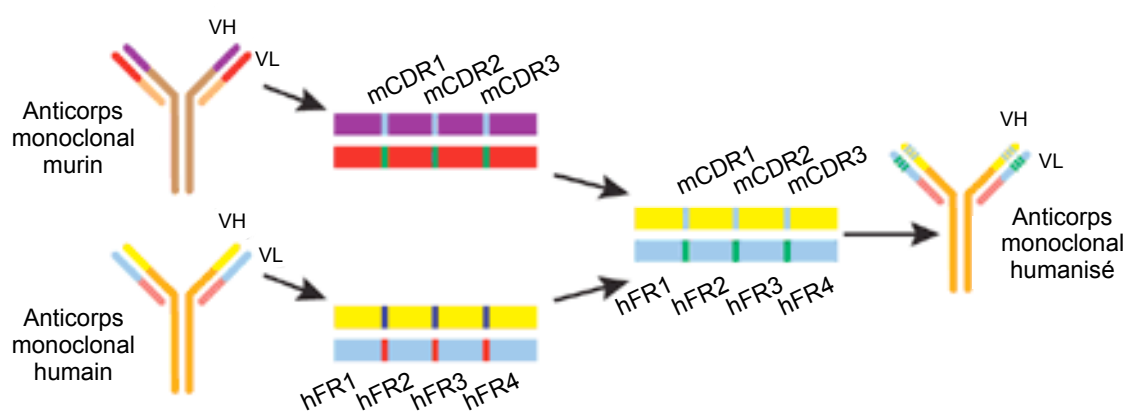


Figure 10 : Ingénierie des anticorps humanisés (d'après Marasco & Sui, 2007). Les régions déterminant la complémentarité d'un anticorps monoclonal murin (mCDR) sont greffées sur les régions charpentes d'un anticorps humain. Ces régions charpentes présentent une très grande homologie avec les régions correspondantes sur l'anticorps murin. VH, domaine variable de chaîne lourde ; VL, domaine variable de chaîne légère ; hFR, régions charpentes humaines.

Comme pour les chimériques, un anticorps monoclonal murin est tout d'abord produit et sélectionné après immunisation d'une souris (Figure 4). Les CDR murines sont alors identifiées par séquençage puis introduites dans les régions charpentes humaines, préalablement choisies dans les diverses bases de données de séquences pour leur maximum d'homologie avec les régions charpentes de l'anticorps murin dont dérive la spécificité antigénique. Il faut également déterminer les résidus situés hors des CDR qui jouent un rôle essentiel dans le maintien de la conformation du site anticorps. Cela peut se faire en comparant et en analysant les modèles obtenus grâce à la bioinformatique (Morea *et al.*, 2000).

Tableau IV : Anticorps humanisés utilisés en médecine humaine (Wang *et al.*, 2009 ; Jefferis & Lefranc, 2009 ; Beck *et al.*, 2009)

Dénomination commune internationale (spécialité)	AMM ^a	Isotype Format	Allotype G1m Km	Cible antigénique	Indications thérapeutiques
daclizumab (Zenapax [®])	1997	IgG1κ	G1m17,1 Km3	CD25	Prévention du rejet aigu de greffe rénale
palivizumab (Synagis [®])	1998	IgG1κ	G1m3 Km3	Protéine de fusion du virus respiratoire syncytial	Prévention des infections par le virus respiratoire syncytial chez les enfants à risque
trastuzumab (Herceptin [®])	1998	IgG1κ	G1m17 Km3	<i>EGFR, epidermal growth factor receptor</i> (ERBB2 ou NEU/HER2)	Cancers du sein métastatiques exprimant HER-2
gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg [®])	2000 uniquement aux Etats-Unis	IgG4κ	na pour γ4 et nd pour κ	CD33	Leucémie aiguë lymphoblastique
alemtuzumab (MabCampath [®])	2001	IgG1κ entière	G1m17,1 Km3	CD52	Leucémie lymphoïde chronique
omalizumab (Xolair [®])	2003	IgG1κ	G1m17 Km3	IgE	Asthme sévère
bévacizumab (Avastin [®])	2004	IgG1κ entière	nd	<i>VEGF, vascular endothelial growth factor</i>	Cancers colo-rectaux métastatiques
natalizumab (Tysabri [®])	2004	IgG4κ	na	Intégrine α4β1	Sclérose en plaques
nimotuzumab (TheraCIM [®])	2005	IgG1κ	nd	<i>EGFR, epidermal growth factor receptor</i>	Cancer tête et cou
ranibizumab (Lucentis [®])	2006	Fab IgG1κ	nd	<i>VEGF, vascular endothelial growth factor</i>	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
éculizumab (Soliris [®])	2007	IgG2/IgG4κ	na	C5	Hémoglobininurie paroxystique nocturne

Dénomination commune internationale (spécialité)	AMM ^a	Isotype Format	Allotype G1m Km	Cible antigénique	Indications thérapeutiques
certolizumab pegol (Cimzia [®])	2008	Fab d'IgG1	nd	<i>TNF-α, tumor necrosis factor-α</i>	Maladie de Crohn, polyarthrite rhumatoïde (2009)
tocilizumab (Roactemra [®])	2009	IgG1 κ	nd	Récepteur de l'IL-6	Maladie de Castelman, polyarthrite rhumatoïde

^a AMM, Autorisation de Mise sur le Marché : année du premier enregistrement *FDA, Food and Drugs Administration, EMEA, European Medicines Agency* ou *SFDA, China State Food and Drug Administration*. na, ne s'applique pas ; nd, non déterminé.

1-5-2 Ingénierie des anticorps complètement humains

Les anticorps intégralement humains ou *fully human* sont une troisième catégorie d'anticorps d'origine humaine à 100% (Tableau V). Ils peuvent être préparés selon différentes techniques. Certains anticorps humains dérivent de banques de phages c'est-à-dire qu'il est possible de sélectionner des anticorps se liant à un antigène d'intérêt en utilisant des banques combinatoires de régions VH et VL humaines exprimées à la surface de phages filamenteux (Figure 11). Pour obtenir de telles banques, l'ARNm isolé de lymphocytes B est transcrit en ADNc. Les séquences codant les régions VH et VL sont amplifiées et assemblées de part et d'autre d'une séquence de liaison ou *linker*. Le fragment Fv, fragment variable simple chaîne (scFv) obtenu est alors cloné dans un phagémide de manière à être exposé à la surface de l'enveloppe du phage. Les bactériophages exprimant les fragments scFv dirigés contre l'antigène d'intérêt sont alors sélectionnés par des cycles répétés d'adsorption et d'élution (Hoogenboom & Chames, 2000). L'adalimumab (Humira[®]) est un anticorps totalement humain produit de cette façon.

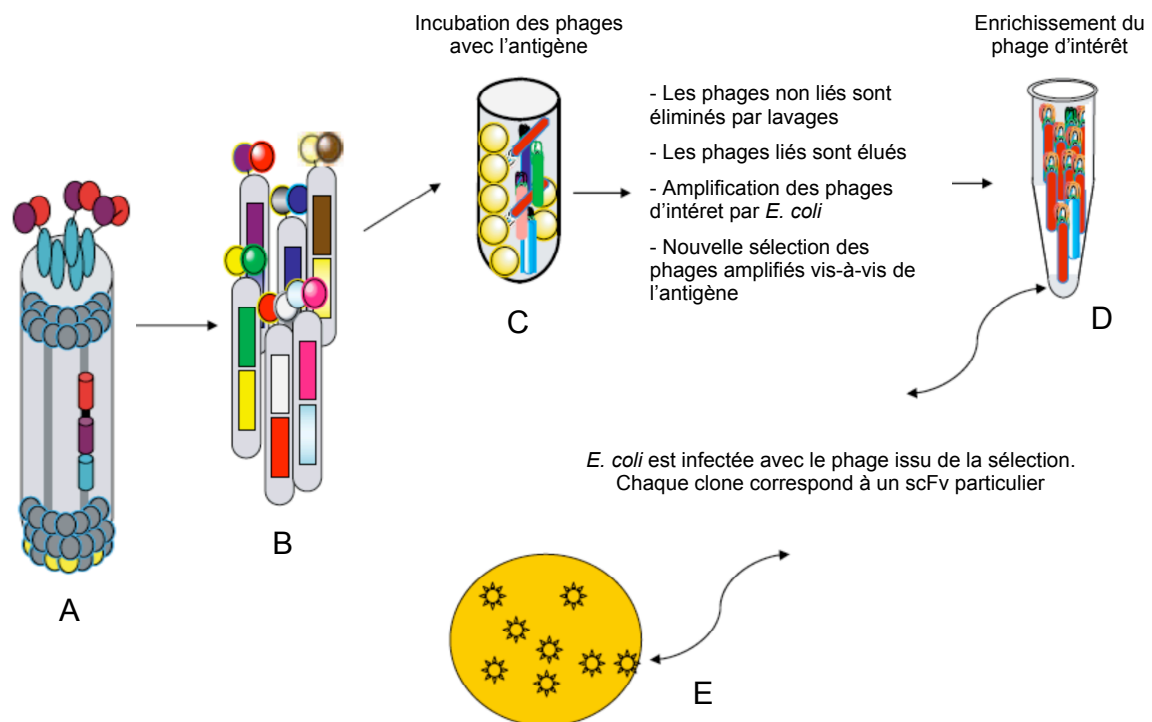


Figure 11 : Principe du *phage display* (d'après Nissim & Chernajovsky, 2008). A- En combinant les gènes codant les fragments d'anticorps (Fab ou bien scFv, comme sur cette figure) humains au gène codant une protéine d'enveloppe de bactériophages filamenteux, la séquence portant l'information génétique est liée à la fonction de la protéine produite puisque les fragments sont exprimés avec la protéine d'enveloppe à la surface des bactériophages (VH en rouge, VL en violet, protéine d'enveloppe en bleu). B- La banque ainsi constituée peut contenir des millions voire des milliards de phages exposant des fragments d'anticorps de spécificités différentes. C- Les phages exprimant à leur surface un fragment spécifique de l'antigène cible immobilisé sont sélectionnés, les autres sont éliminés par lavages. Les phages immobilisés sont élués, utilisés pour infecter *Escherichia coli* et ainsi amplifiés. Ils subissent à nouveau une étape de sélection, permettant ainsi D- l'enrichissement du phage d'intérêt. E- Le phage sélectionné est amplifié puis la séquence codant le fragment est isolée pour subir une maturation d'affinité par exemple et être intégrée dans un vecteur contenant les séquences codant les domaines constants d'un anticorps humain.

Les anticorps humains peuvent aussi être issus de souris transgéniques (Figure 12, Tableau V) : des gènes *IGK* et *IGH* humains sont introduits à la place des gènes correspondants de souris. Ces souris sont croisées avec des souris génétiquement déficientes en immunoglobulines. Ces hybrides peuvent ainsi produire, après immunisation, des anticorps complètement humains dirigés contre des protéines humaines. Le panitumumab (Vectibix®) est le premier anticorps complètement humain produit par souris transgéniques XenoMouse (Jakobovits *et al.*, 2007) ; le golimumab (Simponi®) est également produit selon cette méthode (Pappas *et al.*, 2009).

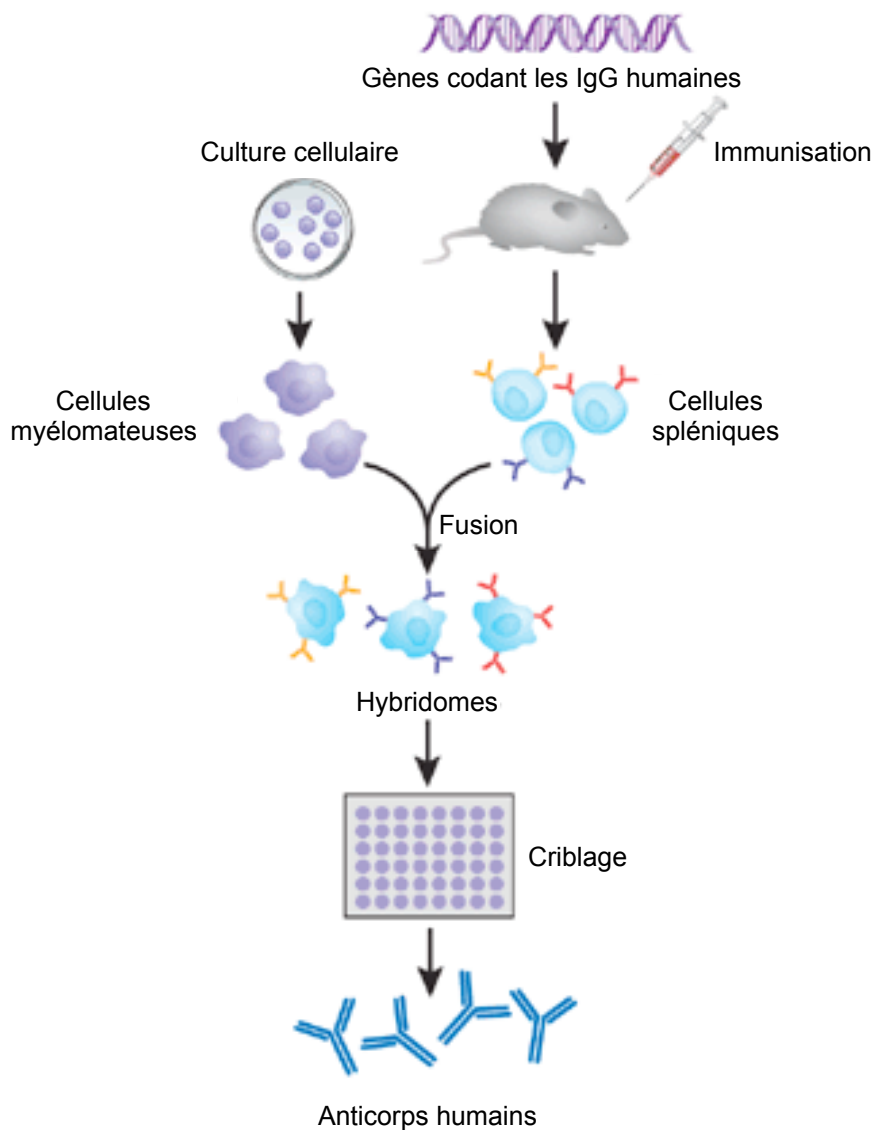


Figure 12 : Production d'anticorps humains par souris transgéniques (d'après Marasco & Sui, 2007). Les gènes codant les immunoglobulines de la souris ont été invalidés et remplacés par leurs homologues humains. La souris transgénique obtenue est capable de produire des anticorps humains contre un antigène d'intérêt par lequel elle a été immunisée. Les cellules B spléniques murines sont récoltées et immortalisées par fusion avec des cellules d'une lignée de myélome selon la technique des hybridomes (Figure 4). Les hybridomes sont caractérisés et sélectionnés pour répondre aux exigences de spécificité, d'affinité et biochimiques attendues de l'anticorps humain à développer.

Tableau V : Anticorps monoclonaux recombinants complètement humains (Lonberg, 2008 ; Wang *et al.*, 2009 ; Jefferis & Lefranc, 2009 ; Beck *et al.*, 2009)

Dénomination commune internationale (spécialité)	Méthode de production	AMM ^a	Isotype ; format	Allotype G1m Km	Cible antigénique	Indications thérapeutiques
votumumab (Huma-SPECT [®] -Tc)		1998	IgG3κ couplé au ^{99m} Tc	nd	<i>CAA, carcinoma associated antigen</i>	Cancers colorectaux
adalimumab (Humira [®])	<i>Phage display</i>	2002	IgG1κ	G1m17,1 Km3	<i>TNF-α, tumor necrosis factor-α</i>	Polyarthrite rhumatoïde et maladie de Crohn
panitumumab (Vectibix [®])	Souris transgénique	2006	IgG2κ	nd	<i>EGFR, epidermal growth factor receptor</i>	Cancers colorectaux métastatiques exprimant EGFR
canakinumab (Ilaris [®])		2009	IgG1κ	nd	Il-1β	Syndromes périodiques associés à la cryopyrine
golimumab (Simponi [®])	Souris transgénique	2009	IgG1κ	nd	<i>TNF-α, tumor necrosis factor-α</i>	Polyarthrite rhumatoïde, rhumatisme psoriasique, spondylarthrite ankylosante
ofatumumab (Arzerra [®])	Souris transgénique	2009	IgG1κ	nd	CD20	Leucémies lymphoïdes chroniques
ustekinumab (Stelara [®])	Souris transgénique	2009	IgG1κ	nd	IL-12/IL-23	Psoriasis

^a AMM, Autorisation de Mise sur le Marché : année du premier enregistrement *FDA, Food and Drugs Administration, EMEA, European Medicines Agency* ou *SFDA, China State Food and Drug Administration*. nd, non déterminé.

1-5-3 Structure tridimensionnelle des domaines variables

La description de l'ultrastructure des domaines variables des anticorps revient à Elvin A. Kabat et Tai Te Wu (Wu & Kabat, 1970 ; Hood, 2008) qui en 1970, ont mis au point un système de mesure de la variabilité des acides aminés pour chacune des 107 positions des domaines variables des chaînes légères. La distribution de la variabilité des acides aminés leur a permis d'identifier deux zones hypervariables (positions 24-34 et 89-97) et une troisième de plus modeste variabilité (positions 50-56) mais tout autant impliquée que les deux premières dans le site de liaison à l'antigène c'est-à-dire le paratope, comme cela fut vérifié plus tard par analyse tridimensionnelle. Le paratope de l'anticorps est constitué par la combinaison de ces régions hypervariables des domaines variables de ses chaînes lourdes et légères. Il est le résultat de la configuration unique des acides aminés constituant le site de liaison à l'antigène. Il est également appelé idiotype lorsqu'il est fait référence aux sites antigéniques qu'il porte. Cet idiotype constitue donc un déterminant antigénique propre à chaque espèce d'anticorps (De Lange, 1988).

Ces régions hypervariables appelées régions déterminant la complémentarité (CDR, *complementarity determining regions*) furent par la suite identifiées sur les domaines variables des chaînes lourdes : CDR1, CDR2 et CDR3 aux positions 31-35, 50-65 et 95-102, respectivement. Par extension, les séquences des domaines variables de chaînes lourde ou légère qui ne sont pas identifiées comme des CDR, furent baptisées « régions charpentes » (FR, *framework regions*) numérotées FR1, FR2, FR3 et FR4 et correspondant aux séquences flanquant les trois CDR (Kabat *et al.*, 1978). C'est encore cette nomenclature des domaines variables qui prévaut aujourd'hui et que l'on rencontre aussi bien dans les publications scientifiques que dans les brevets de développement d'anticorps.

Cependant, d'autres nomenclatures ont depuis été élaborées et représentent des outils tout à fait intéressants pour l'analyse des séquences des domaines variables des immunoglobulines, en particulier. IMGT®, The international ImMunoGeneTics information system® (Lefranc *et al.*, 2009) est une base de données informatique comprenant tous les gènes constants des immunoglobulines (IGHC, IGKC et IGLC codant les domaines constants des chaînes lourdes, légères κ et λ , respectivement) ainsi que les gènes V, dits « variable » (IGHV, IGKV et IGLV), D appelés « diversité » (IGHD) et J, « jonction » (IGHJ, IGKJ et IGLJ) codant leurs domaines variables (Figure 13).

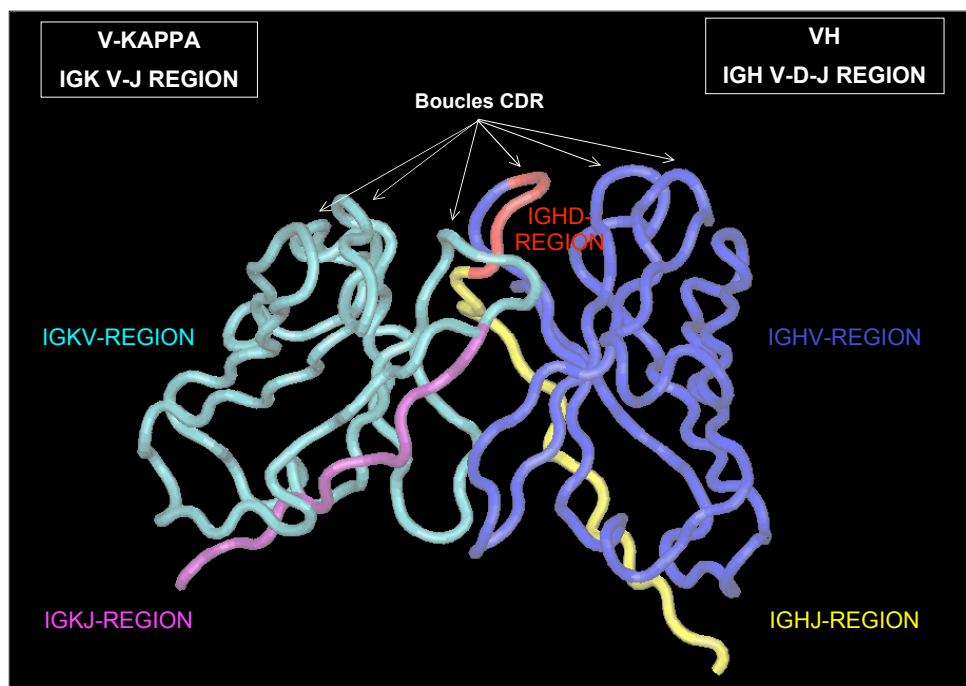


Figure 13 : Représentation tridimensionnelle des domaines V-KAPPA et VH du bévaccizumab. Le domaine V-KAPPA (V-J REGION) résulte du réarrangement d'un gène IGKV et d'un gène IGKJ tandis que le domaine VH (V-D-J REGION) résulte du réarrangement d'un gène IGHV, d'un gène IGHD et d'un gène IGHJ. Les gènes IGKV et IGHV codent la plus grande partie des domaines V-KAPPA et VH respectivement. Des six boucles CDR constituant le paratope trois sont localisées sur V-KAPPA et trois sur VH. La boucle CDR3 de V-KAPPA a la particularité d'être codée par l'extrémité 3' d'IGKV et l'extrémité 5' d'IGKJ et la boucle CDR3 de VH est codée par l'extrémité 3' d'IGHV, IGHD et l'extrémité 5' d'IGHJ. PDB : 1cz8, bévaccizumab. La figure a été générée avec le logiciel VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

La nomenclature de ces domaines, propre à IMGT®, a été élaborée à partir de l'alignement de plus de 5 000 séquences d'anticorps. Elle s'appuie sur la définition classique des FR, des CDR mais également des données structurales de cristallographie et la caractérisation des boucles hypervariables (Lefranc *et al.*, 2003). Elle permet de redéfinir les limites des régions FR et CDR dont la longueur est importante pour savoir à quels groupes, sous-groupes de gènes ou gènes codant les régions variables, appartient la séquence étudiée. De ce fait, les CDR définis dans ce système (CDR-IMGT) diffèrent des CDR classiques (CDR1-IMGT : 27-38 ; CDR2-IMGT : 56-65 ; CDR3-IMGT : 105-117). Les outils mis à disposition des scientifiques par IMGT® permettent donc d'exploiter cette base de données et d'analyser des séquences d'intérêt.

Le réarrangement des gènes pour faire deux exons fonctionnels, l'un codant VH et l'autre VL correspond au rapprochement des gènes VDJ et VJ, respectivement. Leurs

jonctions, une fois traduites, se situent dans le CDR3, qu'il s'agisse de VH ou de VL, faisant de cette région un site de plus grande variabilité que CDR1 et CDR2. En effet, ces deux dernières régions sont codées par le gène V alors que les CDR3 sont codés par l'extrémité 3' du gène V, le gène D pour VH et l'extrémité 5' du gène J (Figure 13).

1-5-4 Motifs d'agrégation

Parmi les facteurs pouvant influençant l'immunogénicité des protéines, et en particulier les protéines utilisées en thérapeutique comme les anticorps, figurent les paramètres liés à leur formulation et à leur conservation : contaminants, impuretés, dégradation chimique, oxydation, glycosylation, agrégation pouvant aboutir à des changements de conformation de ces protéines (Maas *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2009). Maas et collaborateurs ont montré par des expérimentations animales que ces changements de conformation augmentent leur immunogénicité. L'agrégation des protéines est un des mécanismes les moins bien compris. Elle correspond à l'auto-association d'un certain nombre de ces molécules entre elles, pouvant conduire à la formation de particules visibles ou non, à des précipités ou des fibrilles (Wang *et al.*, 2009). Cette agrégation concerne tout particulièrement les biomédicaments et avec eux, les anticorps. En effet, les problèmes de formulation des biomédicaments sont directement liés au pouvoir agrégeant des anticorps, exacerbé lorsqu'ils sont en solution fortement concentrée et destinée à la voie sous-cutanée (Shire *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2009). Wang et collaborateurs proposent que la stabilité des anticorps thérapeutiques soit gouvernée par une relation séquence-structure-fonction les conduisant à chercher dans les séquences des motifs prédisposant ces molécules à l'agrégation. Ces motifs riches en résidus glutamine et asparagine ou en résidus hydrophobes ou aromatiques ont été préalablement identifiés sur des protéines s'agréant facilement impliquées dans certaines maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson). A partir de ces données, des outils informatiques ont été élaborés permettant l'analyse des séquences peptidiques et le repérage des motifs d'agrégation. Les auteurs ont analysé les séquences entières (chaînes lourdes et légères) de plusieurs anticorps thérapeutiques commercialisés et recensé des motifs d'intérêt.

Bien que des motifs soient classiquement retrouvés sur les domaines constants des anticorps, les séquences prédisposant à l'agrégation situées sur les domaines variables sont plus remarquables car ils sont positionnées sur des sites hautement fonctionnels que représentent les CDR. Cependant, les auteurs rapportent qu'actuellement aucun argument ne permet de dire si certains motifs sont cruciaux pour l'agrégation des anticorps, ni même si le nombre de ces motifs est corrélé à leur degré d'agrégation. En tout cas, le degré d'humanisation des anticorps ne semble pas lié à un plus petit nombre de motifs (Wang *et al.*, 2009).

1-6 Immunogénicité des anticorps monoclonaux recombinants

1-6-1 Anticorps anti-anticorps

Bien que les anticorps chimériques n'aient conservé des anticorps murins d'origine que les domaines variables et aient acquis une portion Fc humaine, leur immunogénicité est objectivée par la production d'*HACA*, *human anti-chimaeric antibodies* est avérée (Hwang & Foote, 2005). Ces HACA sont dépistés par exemple, chez certains patients lors du traitement par infliximab (Remicade®) ou par rituximab (MabThera®) pour maladies auto-immunes (Baert *et al.*, 2003 ; Thurlings *et al.*, 2009). Ils sont potentiellement dirigés vers trois sites encore immunogènes des anticorps chimériques : leur idiotype, leurs régions charpentes murines et leurs allotypes. Cependant, le développement de réponse anti-anticorps n'est pas réservé aux seuls chimériques. Bien que les défenseurs des anticorps humanisés aient longtemps accusé les chimériques d'être responsables d'une réponse anti-anticorps bien plus importante que les humanisés (Riechmann *et al.*, 1988), justifiant au passage de préférer l'humanisation à la « chimérisation », il n'en demeure pas moins que les anticorps humanisés et complètement humains stimulent également chez certains patients la production d'*HAHA*, *human anti-human antibodies*. Ceux-ci ont été décrits par exemple, lors de traitement par le natalizumab (Tysabri®) (Calabresi *et al.*, 2007) et par l'adalimumab (Humira®) (Emi Aikawa *et al.*, 2009). L'humanisation poussée de la structure de ces anticorps limite leur immunogénicité à l'idiotype et aux allotypes sans pour autant l'éliminer. Nul ne sait d'ailleurs

si les régions charpentes des anticorps chimériques contribuent réellement à la réponse HACA et si la réponse HAHA est vraiment différente de la réponse HACA.

1-6-2 Méthodes de détection des HACA et HAHA

L'EMEA, *European Medicines Agency* a publié en avril 2008 un rapport intitulé « *Guideline on immunogenicity assesment of biotechnology-derived therapeutic proteins* » (*Committee for medicinal products for human use*). Il s'agit de recommandations adressées aux firmes pharmaceutiques développant des protéines issues des biotechnologies, et relatives aux techniques à mettre en œuvre pour évaluer leur immunogénicité, exigence réglementaire participant à la démonstration de l'innocuité de ces molécules (Smith *et al.*, 2007). Cette démarche nécessite d'associer des techniques de détection et de caractérisation des anticorps dirigés contre ces protéines thérapeutiques en estimant, en particulier, leurs propriétés neutralisantes. En revanche, seules les méthodes de dépistage de ces anticorps induits sont mises en œuvre dans la plupart des publications d'études cliniques de suivi de patients traités par anticorps thérapeutiques : c'est pourquoi nous avons choisi de les développer.

Le vaste groupe de protéines thérapeutiques comprenant aussi bien des cytokines, des facteurs de coagulation que les anticorps monoclonaux recombinants, les méthodes de dépistage recensées dans ces recommandations sont assez variées : techniques immunologiques, radio-immunoprécipitation et résonance plasmonique de surface. Dans tous les cas, il s'agit de techniques utilisant l'interaction spécifique d'un anticorps vis-à-vis de son antigène, afin de déterminer la concentration en anticorps induits anti-biomédicaments. En ce qui concerne les anticorps thérapeutiques, l'emploi de formats directs où le biomédicament sert à capturer les anticorps induits dont la détection est réalisée par un anticorps secondaire marqué (dirigé contre le Fc des IgG, par exemple), est limité à la recherche d'anticorps induits par des Fab d'IgG. Dans le contexte du dépistage d'anticorps humains dirigés contre des anticorps thérapeutiques entiers, eux-mêmes humains ou chimériques, l'utilisation d'un tel format conduirait à des résultats faussement positifs dus à la fixation de l'anticorps anti-Fcγ sur l'anticorps thérapeutique de capture. Cependant, Svenson et collaborateurs ont développé une méthode très proche permettant la détection des anticorps anti-infliximab à l'aide d'un anticorps anti-chaîne légère λ (Svenson *et al.*, 2007).

La revue de la littérature montre que, dans le cadre du dépistage des HACA et HAHA, les techniques immunologiques (dont la radio-immunoprécipitation) sont plus volontiers utilisées : il existe autant de variantes que d'équipes qui les publient (Emi Aikawa *et al.*, 2009). En effet, l'EMA préconise un large panel de formats de techniques immunologiques et de méthodes de détection laissant aux scientifiques qui les mettent au point une certaine créativité. Certains auteurs utilisent des techniques où les HACA ou HAHA sériques sont détectés par capture, grâce à l'anticorps thérapeutique d'intérêt marqué, le plus souvent radioactivement. La radioactivité est détectée après radio-immunoprécipitation (Wolbink *et al.*, 2006) ou après une deuxième phase de capture sur colonne par exemple (Bendtzen *et al.*, 2006). La radio-immunoprécipitation a en général une bonne sensibilité, cependant elle présente les inconvénients liés à l'utilisation de composés radio-actifs : agréments, demi-vie de la radio-activité, stabilité et effet du marquage sur la structure de l'anticorps (épitope masqué, protéine altérée) (Mire-Sluis *et al.*, 2004).

D'autres auteurs utilisent des formats techniques dits en « double antigène » (*bridging format*) où l'anticorps thérapeutique immobilisé sert à capturer les anticorps anti-anticorps et à en révéler la fixation dans une forme couplée à un marqueur radioactif (LoBuglio *et al.*, 1989), enzymatique (Calabresi *et al.*, 2007), électrochimiluminescent (Moxness *et al.*, 2005). Un système de révélation où l'anticorps thérapeutique secondaire est couplé à une biotine et détecté par amplification PCR d'une sonde localisée sur un anticorps anti-biotine a récemment été publié (Spengler *et al.*, 2009). Les formats en « double antigène » ont été déclinés dans plusieurs versions utilisant pour fixer l'anticorps thérapeutique, des billes (LoBuglio *et al.*, 1989) ou une microplaque (Figure 14) (Baert *et al.*, 2003). Ils ont l'avantage de faire preuve d'une bonne spécificité et de permettre la détection de tous les isotypes d'HACA ou d'HAHA. En revanche, leur sensibilité, associée à l'orientation des anticorps thérapeutiques plus ou moins optimale sur le support et la détection limitée des anticorps anti-anticorps de faible affinité, en raison des nombreux cycles de lavages intercalés entre chaque étape d'incubation, les desservent. C'est également un format qui est très sensible à l'interférence due aux anticorps thérapeutiques sériques circulant résiduels. Quel que soit le mode de détection utilisé, le couplage de l'anticorps thérapeutique d'intérêt avec le marqueur peut affecter la stabilité ou masquer des épitopes de l'anticorps d'origine, de la même façon que l'immobilisation de l'anticorps sur la surface sensibilisée choisie (Wadhwa *et al.*, 2005 ; Mire-Sluis *et al.*, 2004).

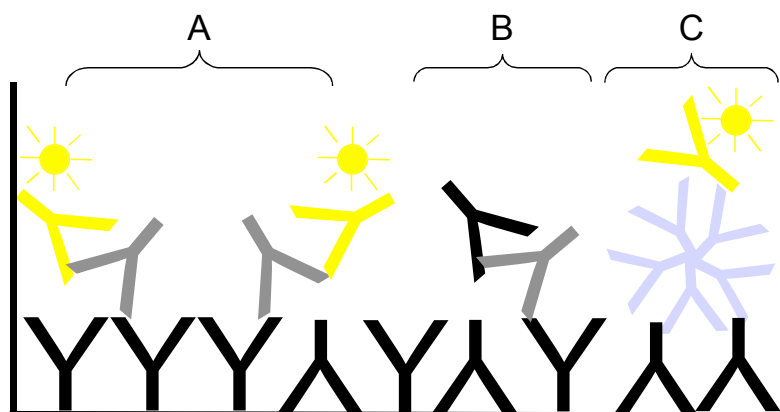


Figure 14 : ELISA en format « double antigène ». A- L'anticorps thérapeutique (noir), immobilisé sur la microplaque permet la capture des anticorps induits anti-anticorps (gris). Leur fixation est révélée par l'anticorps thérapeutique couplé à un marqueur enzymatique, radioactif ou luminescent (jaune). B- Cependant, les anticorps thérapeutiques circulants peuvent se complexer aux anticorps induits et gêner leur détection, conduisant à un résultat faussement négatif ou artificiellement bas. C- Les facteurs rhumatoïdes, le plus souvent des IgM anti-IgG (bleu) peuvent être présents dans le sérum des patients et se comporter comme les anticorps induits, donnant lieu à des résultats faussement positifs.

La résonance plasmonique de surface offre une alternative intéressante à ces méthodes immunologiques traditionnelles (Klakamp *et al.*, 2007 ; Sickert *et al.*, 2008). En effet, alors que l'anticorps thérapeutique est immobilisé sur une puce de verre recouverte d'un film d'or et d'une couche de carboxyméthyl-dextran, l'interaction avec les HACA ou HAHA est mesurée directement, sans qu'aucun réactif secondaire ne soit nécessaire. Pour Wadhwa et collaborateurs, le couplage covalent au dextran n'est pas en soi un problème puisque les effets sur la conformation de la molécule immobilisée sont plus facilement prévisibles que leur adsorption aléatoire sur les microplaques ELISA, par exemple. En revanche, les phases de régénération des puces peuvent l'altérer ou modifier les molécules immobilisées (Wadhwa *et al.*, 2005). Elle permet la détection des anticorps anti-anticorps quelque soient leur isotype et leur affinité qu'il est d'ailleurs possible d'évaluer (Mire-Sluis *et al.*, 2004). Les performances de la résonance plasmonique de surface et de l'ELISA ont été comparées pour la détection des

anticorps anti-panitumumab. Les résultats montrent que l'ELISA est plus sensible pour la détection des anticorps de forte affinité en présence de concentrations élevées de panitumumab. A l'inverse, la résonance plasmonique de surface est plus sensible que l'ELISA pour détecter les anticorps anti-panitumumab de faible affinité en présence de faibles concentration du médicament (Lofgren *et al.*, 2007).

Un des problèmes propres au dépistage des HACA et HAHA (Baert *et al.*, 2003 ; Lofgren *et al.*, 2006 ; Sickert *et al.*, 2008) est justement l'interférence due à la présence de fortes concentrations d'anticorps thérapeutiques circulants résiduels sériques. Ce phénomène n'est pas observé avec d'autres protéines thérapeutiques comme l'insuline ou l'érythropoïétine car leurs concentrations circulantes sont assez faibles pour ne pas perturber le dépistage des anticorps induits (Lofgren *et al.*, 2006). En revanche, les anticorps thérapeutiques circulants résiduels agissent par inhibition compétitive ou formation de complexes immuns avec les HACA et HAHA (Nygren *et al.*, 1985) et peuvent conduire à des résultats faussement négatifs (Figure 14B). Afin de se libérer de cette contrainte, des techniques visant à dissocier ces complexes ont été mises au point permettant la détection d'HACA et HAHA en présence de grandes concentrations d'anticorps thérapeutiques et répondant ainsi aux exigences réglementaires (Mire-Sluis *et al.*, 2004). Elles associent une étape de dissociation acide avec un système de capture soit des anticorps à doser soit des molécules thérapeutiques à éliminer et sont couplées le plus souvent à des techniques ELISA de dépistage des anticorps induits.

Lofgren et collaborateurs éliminent la protéine thérapeutique en associant à une étape de dissociation acide l'utilisation de billes sensibilisées avec une molécule, comme un anticorps monoclonal anti-protéine thérapeutique, permettant son adsorption (Lofgren *et al.*, 2006). Patton et collaborateurs déposent les sérums acidifiés à analyser dans les puits de la microplaque préalablement tamponnée et sensibilisée avec l'anticorps thérapeutique, arguant que les HACA ou HAHA libérés des complexes ont une affinité plus grande pour leur cible en phase solide qu'en phase liquide (Patton *et al.*, 2005).

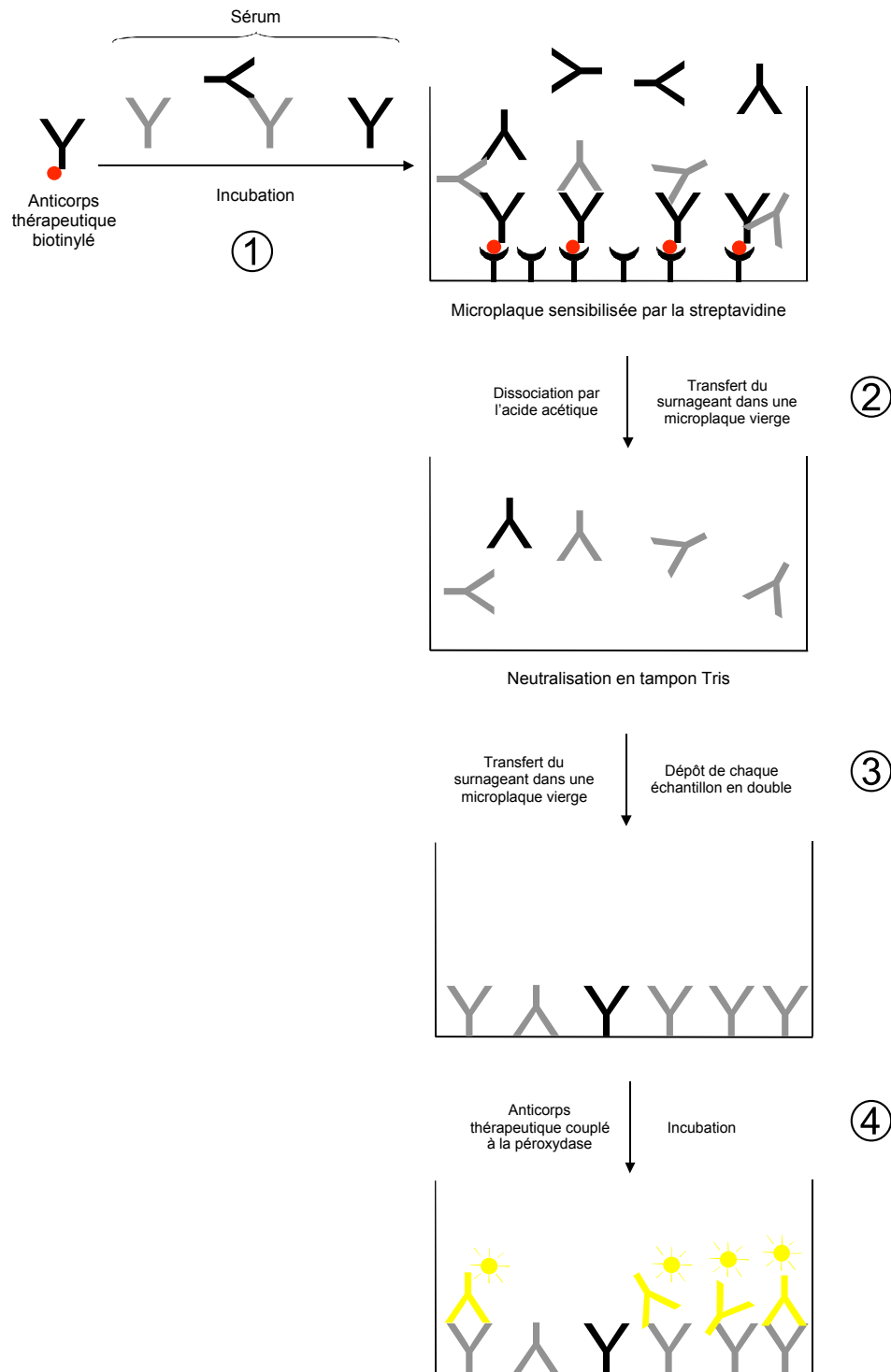


Figure 15 : Principe de la technique *SPEAD* ELISA. ① L'anticorps thérapeutique (noir), cible des anticorps induits (gris) recherchés, est biotinylé (rond rouge). Il est ensuite incubé avec l'échantillon sérique pouvant contenir des anticorps induits, l'anticorps thérapeutique circulant libre ou des complexes associant les deux espèces. Les complexes formés, impliquant l'anticorps biotinylé, sont capturés par la streptavidine sensibilisant une microplaque. En revanche, l'anticorps thérapeutique libre sont éliminés par lavages. ② Le traitement des puits par acide acétique permet de libérer les anticorps induits de l'anticorps thérapeutique biotinylé mais aussi de l'anticorps thérapeutique naturel. Les surnageants sont transférés dans une microplaque en présence de tampon Tris afin de neutraliser le pH. ③ La solution obtenue est utilisée pour sensibiliser une nouvelle microplaque. ④ Un ELISA direct employant l'anticorps thérapeutique marqué à la peroxydase (jaune) permet de détecter les anticorps induits.

Une troisième alternative est la technique *SPEAD, solid-phase extraction with acid dissociation* qui se déroule en microplaque et est associée à une technique de détection des anticorps induits par ELISA (Figure 15). Les auteurs concluent que leur technique présente une tolérance de 80 µg/mL, soit une amélioration de 10 à 100 fois du dépistage des anticorps induits en présence de la protéine thérapeutique circulante (Smith *et al.*, 2007).

Schmidt et collaborateurs ont proposé pour le dosage des anticorps anti-rituximab l'utilisation d'une méthode *ACE, affinity capture elution* ELISA (Figure 16) où des F(ab')₂ de rituximab sensibilisant une microplaque servent à capturer les anticorps anti-rituximab complexés ou non avec du rituximab. Les complexes sont dissociés par traitement acide et la solution, pouvant contenir à la fois des anticorps anti-rituximab et du rituximab libre, est utilisée pour sensibiliser une nouvelle microplaque. Les anticorps anti-rituximab sont détectés par du rituximab biotinylé (Schmidt *et al.*, 2009). Cependant, le recrutement des anticorps anti-rituximab par les fragments F(ab')₂ est certainement limité aux anticorps anti-idiotype, anti-régions charpentes murines et anti-allotypes du domaine CH1, négligeant les anti-allotypes des domaines CH3.

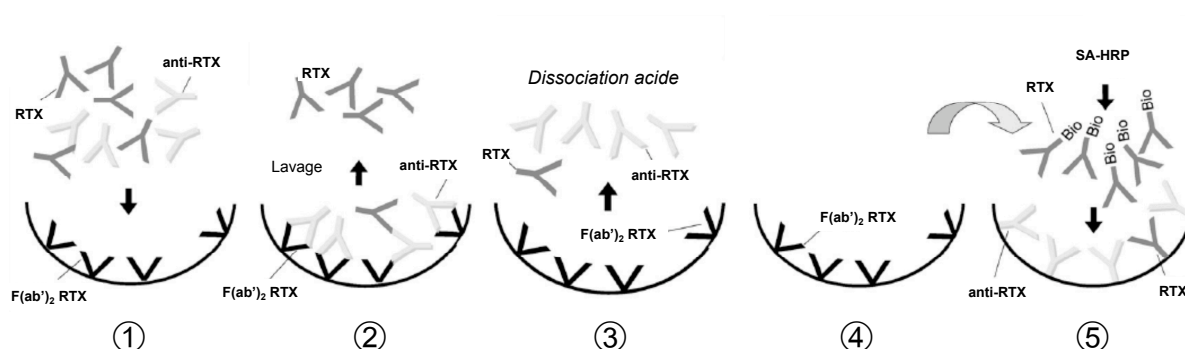


Figure 16 : Principe de la technique ACE : exemple du dosage des anticorps anti-rituximab (d'après Schmidt *et al.*, 2009). 1- Les fragments F(ab')₂ de rituximab (F(ab')₂-RTX) qui sensibilisent les puits de la microplaque permettent de capturer les anticorps anti-rituximab (anti-RTX) libres ou complexés à du rituximab dans l'échantillon de sérum. 2- Le rituximab libre est éliminé lors des lavages. 3- Après incubation avec l'acide acétique, les anticorps anti-rituximab sont dissociés d'une part des complexes qu'ils formaient avec les F(ab')₂ de rituximab et d'autre part des complexes les associant au rituximab. 4- Les surnageants sont transférés dans une nouvelle microplaque préalablement remplie de tampon Tris-HCl afin de neutraliser le pH. 5- Après incubation et lavage, du rituximab biotinylé (Bio) est ajouté dans chaque puits et sa fixation révélée par l'apport de streptavidine couplée à la peroxydase (SA-HRP).

Il a récemment été montré que la dissociation acide est applicable à la résonance plasmonique de surface, permettant de disposer d'une technique de dépistage des HACA ou HAHA très tolérante vis-à-vis de larges excès (10 à 200 fois) d'anticorps thérapeutique (Sickert *et al.*, 2008).

L'hétérogénéité des méthodes de dépistage des anticorps induits anti-biomédicaments illustre parfaitement leur manque de standardisation. C'est pourquoi des recommandations relatives à la conception et à l'optimisation de ces techniques (Mire-Sluis *et al.*, 2004) mais aussi à leur validation biologique (Shankar *et al.*, 2008) ont été publiées. Elles sont fondées sur l'expérience de leurs auteurs et n'ont pas pour vocation de remplacer les directives issues des agences réglementaires (Committee for medicinal products for human use ; U.S. Department of Health and Human Services). La diversité des anticorps thérapeutiques (chimériques, humanisés et complètement humains), des techniques de dépistage des HACA et HAHA ainsi que des maladies traitées et des terrains propres à chaque patient rend périlleuse la comparaison de l'immunogénicité de ces molécules et de répondre à la question : les anticorps humanisés et complètement humains sont-ils moins immunogènes que les chimériques ?

1-6-3 Immunogénicité comparée des anticorps thérapeutiques

L'analyse bibliographique menée par Hwang et Foote que nous avons partiellement rapporté plus haut (§ 1-2), a tenté de comparer l'immunogénicité des anticorps murins, chimériques et humanisés. Afin de s'affranchir des biais techniques et en particulier de l'impossibilité de comparer directement les résultats des HAMA, HACA et HAHA, les auteurs ont évalué l'incidence de la survenue de ces anticorps chez les patients traités (Tableau VI) (Hwang & Foote, 2005). Les résultats (Tableau VI), classés en réponse « marquée », « tolérable » et « négligeable » sont pour les chimériques 40%, 27% et 33%, respectivement et 9%, 36% et 55% pour les humanisés. A la question « est ce que les anticorps humanisés sont moins immunogènes que les chimériques? », ces résultats apportent deux éléments de réponse : la chimérisation a largement contribué à réduire l'immunogénicité des anticorps et la faible immunogénicité des anticorps humanisés ne peut être affirmée. En effet, bien que les réponses « marquées » soient nettement plus faibles pour ces derniers, les réponses « négligeables » et « tolérables » sont comparables aux résultats recensés avec les chimériques ce qui modère l'enthousiasme pour les anticorps humanisés (Hwang & Foote 2005).

Tableau VI : Résultats de l'étude bibliographique relative à l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques publiées en 2005 par Hwang et Foote

Anticorps	Incidence des anticorps anti-anticorps (pourcentage de patients ayant développé des anticorps anti-anticorps)		
	Immunogénicité négligeable (<2%)	Immunogénicité tolérable (2-15%)	Immunogénicité marquée (>15%)
Anticorps murins (HAMA)	9%	7%	84%
Anticorps chimériques (HACA)	33%	27%	40%
Anticorps humanisés (HAHA)	55%	36%	9%

Le gain, en termes d'immunogénicité d'un anticorps humanisé sur un anticorps chimérique de même cible antigénique n'est pas à l'heure actuelle, prouvé. Il faudrait pour cela pouvoir administrer ces deux anticorps par la même voie, à la même dose, selon la même posologie à des patients strictement comparables (Clark, 2000 ; Hwang & Foote, 2005). Tous ces paramètres sont autant de facteurs influençant l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques (Stein, 2002 ; Wagner *et al.*, 2003). Puisque cette approche clinique n'est pas réalisable, ne pourrait-on pas, dans une analyse plus théorique, étudier les séquences peptidiques des domaines variables puis des domaines constants d'anticorps chimériques, humanisés et complètement humains commercialisés, afin d'évaluer leur divergence respective par rapport au répertoire des IgG humaines ?

Des outils comme ceux mis à disposition par IMGT® permettent une analyse fine des séquences peptidique et nucléotidique des domaines variables des immunoglobulines. Ceci nécessite tout d'abord de rechercher les articles scientifiques et surtout les brevets dans lesquels ces séquences ont été publiées, puis de minutieusement les décortiquer afin de trouver le variant qui a été utilisé pour fabriquer l'anticorps. Il est ensuite possible d'identifier sur la séquence peptidique, grâce à l'outil IMGT/DomainGapAlign (Ehrenmann *et al.*, 2010), les régions CDR et les régions FR, de connaître leur longueur et d'en construire une représentation appelée « Collier de Perles » (Ruiz & Lefranc, 2002 ; Kaas & Lefranc, 2007), correspondant au repliement de la chaîne en deux dimensions. Celle-ci donne une bonne idée du positionnement dans l'espace des CDR et des FR, les uns par rapport aux autres. Les

séquences nucléotidiques peuvent quant à elles être comparées à la base de données contenant les séquences des gènes V, D et J de plusieurs répertoires ou espèces dont l'homme et la souris, et ainsi d'identifier par homologie de séquences, les gènes ayant le plus sûrement contribué à leur élaboration (IMGT/V-QUEST, Brochet *et al.*, 2008). Cet outil permet également la localisation et l'identification des mutations survenues sur les gènes V lors de la maturation d'affinité. D'une certaine façon, la comparaison des séquences des domaines variables des anticorps thérapeutiques avec les répertoires des gènes des immunoglobulines murines et humaines permet de documenter leur potentielle immunogénicité en évaluant la divergence qui les sépare des gènes qui composent la lignée germinale, même si cette approche reste très théorique. En revanche, un certain nombre de facteurs d'immunogénicité des anticorps thérapeutiques, autres que leur xénoantigénicité, peuvent être relevés affectant aussi bien leurs domaines variables que leurs domaines constants.

2- Facteurs génétiques d'immunogénicité des anticorps monoclonaux recombinants

2-1 Allotypes

L'observation chez l'homme et l'animal que certaines immunoglobulines sont immunogènes pour d'autres membres de la même espèce ont conduit à identifier des polymorphismes pour une classe ou une sous-classe donnée d'immunoglobuline (Loveslati *et al.*, 2001). Ces épitopes polymorphes de transmission mendélienne sont appelés allotypes : ce sont des variants alléliques des gènes codant les domaines constants des chaînes lourdes ou légères des immunoglobulines. La plupart des allotypes sont issus de la substitution de un ou de quelques nucléotides, ce qui se traduit par une différence chez l'homme de un voire deux acides aminés. De tels déterminants allotypiques ont été mis en évidence sur les régions constantes des IgG1, 2 et 3, des IgA2 et des IgE, ainsi que sur les chaînes légères κ . Pour ces allotypes, il existe des différences inter et intra-ethniques qualitatives (allotypes différents) ou quantitatives (fréquence des allotypes) (Pandey, 2001).

Pour les anticorps recombinants thérapeutiques, qu'ils soient chimériques, humanisés ou complètement humains, l'immunogénicité associée aux domaines constants de chaîne lourde et de chaîne légère se limite finalement à l'allotypie. Ces anticorps étant des IgG associées à des chaînes κ , nous allons développer les systèmes allotypiques des chaînes lourdes γ et de la chaîne légère κ . Cependant, aucun allotype d'IgG4 n'a été mis en évidence (Jefferis & Lefranc 09).

2-1-1 Système allotypique des IgG

2-1-1-1 Système allotypique G1m

Le système allotypique des chaînes $\gamma 1$ est appelé G1m (*gamma-1 markers*) et recense 4 allotypes : G1m1, G1m2, G1m3 et G1m17, correspondant à des variants alléliques du gène *IGHG1*, codant les domaines constants de la chaîne lourde $\gamma 1$ et localisé sur le chromosome 14. G1m1 correspond à une asparagine en position 356 (position 12 IMGT) et une leucine en position 358 (position 14 IMGT) localisées sur le domaine CH3. G1m2 est associé à une glycine en 431 (position 110 IMGT). G1m3, et G1m17 son complémentaire, se situent sur le domaine CH1 en position 214 (position 120 IMGT) associé à une arginine et une lysine respectivement (Tableau VII).

Tableau VII : Nomenclatures, localisations et nature des acides caractérisant le système allotypique G1m (De Lange, 1988 ; Grubb, 1995 ; Jefferis & Lefranc, 2009)

Nomenclature alpha-numérique	Nomenclature alphabétique	Localisation	Acides aminés (Eu/IMGT)
G1m1	G1m(a)	Domaine CH3	Asp _{356/12} - Leu _{358/14}
G1m2	G1m(x)	Domaine CH3	Gly _{431/110}
G1m3	G1m(f)	Domaine CH1	Arg _{214/120}
G1m17	G1m(z)	Domaine CH1	Lys _{214/120}

Sur une même chaîne $\gamma 1$, trois de ces allotypes au maximum peuvent être co-exprimés, puisque G1m3 et G1m17 sont mutuellement exclusifs. Il existe quatre combinaisons alléliques possibles, ou haplotypes, c'est-à-dire que le déséquilibre de liaison qui unit les différents allotypes assure leur transmission en bloc : G1m17,1, G1m17,1,2, G1m3 et G1m1,3 (Tableau VIII).

Tableau VIII : Haplotypes du système G1m et fréquence dans les grands groupes humains (De Lange, 1988)

Haplotypes	Allèle IGHG1	Localisation (position de l'acide aminé Eu/IMGT)				Fréquence
		Domaine CH1	Domaine CH3			
		214/120	356/12	358/14	431/110	
G1m17,1	IGHG1*01	Lys	Asp	Leu	Ala	Toute
	IGHG1*02					ethnie
G1m3	IGHG1*03	Arg	Glu	Met	Ala	Caucasiens
						+++
G1m17,1,2		Lys	Asp	Leu	Gly	Assez rare
G1m3,1		Arg	Asp	Leu	Ala	Asiatiques
						+++

Ces haplotypes sont retrouvés avec des fréquences variables d'un groupe ethnique à l'autre et il en résulte que l'allotype G1m1 est exprimé chez 35-85% de la population caucasienne. Dans les autres groupes ethniques, ce déterminant n'est pas polymorphique et la majorité des individus sont G1m1. Quand G1m1 n'est pas exprimé, c'est son complémentaire, parfois appelé G1m (-1) qui l'est : on ne parle pas d'allotype pour celui-ci mais d'iso-allotype. En effet, les trois autres sous-classes d'IgG portent de façon constitutive les résidus caractéristiques de G1m (-1) qui ne peut donc être source d'immunogénicité. De la même façon, l'allotype G1m2 (Tableau VIII) correspondant à une glycine en position 431 (IMGT 110), situé sur le domaine CH3 a un allotype complémentaire, une alanine sur la même position retrouvée sur toutes les autres sous-classes d'IgG. En revanche, cet allotype alternatif n'est pas considéré comme un iso-allotype, puisqu'il n'existe pas d'anticorps reconnaissant cette spécificité et permettant de la caractériser (Jefferis & Lefranc, 2009). Les marqueurs G1m1 et G1m2 sont en complet déséquilibre de liaison : G1m2 s'exprime si et seulement si G1m1 aussi, en revanche tous les sujets G1m1 positifs ne portent pas G1m2. Comme G1m3, G1m2 est rencontré de façon variable dans les populations d'Europe et d'Asie, mais les Noirs ne l'expriment pas. En revanche, G1m17, allotype complémentaire de G1m3 est retrouvé dans tous les groupes ethniques, chez tous les Noirs mais peu chez les Caucasiens et Asiatiques du nord (De Lange, 1988). Malgré la description phénotypique de 4 haplotypes G1m, seuls trois

allèles du gène *IGHG1*, support des allotypes G1m ont été décrits à ce jour. En effet, il n'y a pas de séquence génomique pour les chaînes qui portent les allotypes G1m3,1 et G1m17,1,2 (<http://www.imgt.org>). De plus, il a été montré que les individus dont les IgG1 portent l'allotype G1m1,2 ont des concentrations d'IgG1 circulantes élevées contrairement aux individus ayant l'allotype G1m3, ceux-ci présentant des concentrations d'IgG1 basses (Grubb, 1995).

2-1-1-2 Système allotypique G2m

Les chaînes lourdes des IgG2 peuvent exprimer l'allotype G2m23 encore appelé G2m(n). Celui-ci correspond à la présence d'une thréonine en 189 (IMGT 92) sur le CH1 et d'une méthionine en position 282 (IMGT 45.1) sur le CH2. L'allotype complémentaire (G2m(n-) ou G2m(..)) associe une proline en 189 et une valine en 282 et est retrouvé sur les autres sous-classes d'IgG (Jefferis & Lefranc, 2009). Cependant comme l'allotype G1m2, il ne peut être considéré comme un iso-allotype puisqu'il n'existe pas d'antisérum permettant de le caractériser par des techniques conventionnelles de phénotypage (De Lange, 1988) ce qui suggère que ces acides aminés ne sont pas immunogènes (Jefferis & Lefranc 09). L'allotype G2m23 est totalement absent sur les IgG2 des Noirs, mais présent chez 30 à 100% des Asiatiques et 50 à 100% des Caucasiens (De Lange 88). Les sujets homozygotes pour l'allotype G2m23 ont des concentrations élevées d'IgG2 tandis que les sujets hétérozygotes ont des concentrations intermédiaires d'IgG2 (Grubb, 1995 ; Jefferis & Lefranc 09).

2-1-1-3 Système allotypique G3m

Le système allotypique G3m est très complexe (Tableau IX) à plusieurs niveaux : il comporte de nombreux allotypes différents sans compter que certains d'entre eux présentent plusieurs séquences alléliques. L'immunogénicité de certains de ces allotypes n'est à l'heure actuelle pas objectivée, faute de réactifs pour la mettre en évidence (Jefferis & Lefranc, 2009).

Tableau IX : Système allotypique de la chaîne lourde $\gamma 3$ (De Lange, 1988 ; Jefferis & Lefranc, 2009). Les deux nomenclatures des allotypes G3m sont indiquées, la nomenclature alphabétique étant entre parenthèses.

	Changements d'acides aminés selon les haplotypes G3m sur les chaînes lourdes $\gamma 3$										Fréquence
	CH2		CH3								
Numérotation IMGT	82	83	39	44	84	88	98	101	115	116	Très fréquent chez les Noirs et les Caucasiens
Numérotation Eu	291	292	379	384	397	409	419	422	435	436	
$\gamma 1$	Pro	Arg	Val	Asn	Val	Lys	Gln	Val	His	Tyr	
$\gamma 2$	-	-	-	-	Met	-	-	-	-	-	
$\gamma 4$	-	-	-	-	-	Arg	Glu	-	-	-	
G3m5,10,11,13,14,26,27 (G3mb1,b5,b0,b3,b4,u,v)	-	-	-	Ser	Met	-	-	Ile	Arg	Phe	
G3m5,6,10,11,14,26,27 (G3mb1,c3, b5,b0,b4,u,v)	-	-	-	Ser	Met	-	Glu	Ile	Arg	Phe	
G3m5,6,11,24,26 (G3mb1,c3,b0,c5,u)	-	-	-	Ser	-	Arg	Glu	-	Arg	Phe	Typiques des Noirs
G3m10,11,13,15,27 (G3mb5,b0,b3,s,v)	-	-	Met	Ser	-	-	-	Ile	-	-	
G3m10,11,13,15,16,27 (G3mb5,b0,b3,s,t,v)	-	Trp	Met	Ser	-	-	-	Ile	-	-	Typiques des Asiatiques
G3m21,26,27,28 (G3mg1,u,v,g5)	Leu	-	-	-	Met	-	-	Ile	Arg	-	Très fréquent chez les Caucasiens

2-1-1-4 Haplotypes Gm

Les allotypes des IgG sont organisés et transmis à la descendance sous forme d'haplotypes qui sont des combinaisons figées d'allotypes G3m, G1m et G2m, dans cet ordre (Tableau X). Ces haplotypes se rencontrent avec une plus grande fréquence dans certains groupes ethniques et peuvent permettre de les caractériser (Lefranc *et al.*, 1982 ; Jefferis & Lefranc, 2009).

Tableau X : Haplotypes des allotypes Gm (Lefranc G *et al.*, 1982 ; Jefferis & Lefranc, 2009)

Populations	Haplotypes Gm (G3m;G1m;G2m)
Asiatiques	Gm 10,11,13,15,16,27;1,17 ;..
	Gm 5,10,11,13,14,26,27;1,3;..
	Gm 5,10,11,13,14,26,27;1,3;23
Asiatiques et Caucasiens	Gm 21,26,27,28;1,17 ;..
	Gm 21,26,27,28;1,2,17 ;..
Caucasiens	Gm 5,10,11,13,14,26,27;3;..
	Gm 5,10,11,13,14,26,27 ;3;23
Noirs	Gm 5,10,11,13,14,26,27 ;1,17;..
	Gm 5,6,11,24,26 ;1,17 ;..
	Gm 5,6,10,11,14,26,27 ;1,17 ;..
	Gm 10,11,13,15,27 ;1,17 ;..

2-1-2 Système allotypique Km

Le système Km comprend trois allotypes Km (1), Km (2) et Km (3) qui correspondent à des variants du gène *IGKC* codant le domaine constant des chaînes légères κ , porté par le chromosome 2. Il existe trois haplotypes Km1, 2, Km1 et Km3 et quatre allèles ont été décrits. *IGKC**01, *02 et *03 portent les allotypes Km (1) et Km (2) tandis que *IGKC**04 porte Km (3) (<http://www.imgt.org>). Aucun allèle portant Km (1) n'a pour l'instant été rapporté. En effet, la plupart du temps les allotypes Km (1) et Km (2) sont co-exprimés puisque Km1 est très rare. En revanche, Km1, 2 et Km3 sont fréquentes, Km3 étant la plus représentée dans pratiquement toutes les populations (Tableau XI).

Tableau XI : Système allotypique de la chaîne légère kappa (De Lange, 1988)

Haplotypes	Allotypes	Acides aminés Eu/IMGT		Fréquence allotypique
		153/45.1	191/101	
Km1	Km1	Val	Leu	Très rare
Km1,2	Km1 et Km2	Ala	Leu	10-20% Caucasiens 40-60% Africains 30-60% Asiatiques
Km3	Km3	Ala	Val	Très fréquent dans toutes les populations

2-1-3 Allotypes portés par les anticorps thérapeutiques IgG1

La technique classique de détermination des allotypes est une méthode sérologique d'inhibition de l'hémagglutination utilisant des hématies humaines sensibilisées par des immunoglobulines d'allotype donné et des anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiques d'un allotype. Le sérum à tester est incubé avec le panel d'anti-allotypes puis avec les hématies correspondantes et il n'inhibe l'hémagglutination que si les IgG qu'il contient partagent le même allotype que celui qui a servi à sensibiliser les hématies. Dans le cas contraire l'anti-allotype ne reconnaît pas l'allotype du patient, il est donc disponible pour agglutiner les hématies-test (De Lange, 1988).

Cette méthode a été utilisée pour déterminer les allotypes portés par différents anticorps thérapeutiques (Tableaux II, IV et V) (Jefferis & Lefranc, 2009). Tous les anticorps pour lesquels les allotypes ont pu être déterminés portent les mêmes déterminants de chaîne légère Km3, en revanche, ils diffèrent par leurs allotypes de chaîne lourde et s'organisent en trois groupes. Les anticorps G1m3 sont le basiliximab, le cetuximab et le palivizumab ; les anticorps G1m17 sont l'omalizumab et le trastuzumab et enfin les anticorps G1m17,1 sont le rituximab, l'inflximab, l'alemtuzumab, le daclizumab et l'adalimumab. Or, comme cela a déjà été décrit plus haut, G1m1 est très polymorphe dans la population caucasienne alors que G1m17 y est peu représenté. L'haplotype G1m17,1 qui est prédominant dans la population japonaise, est moins commun chez les Européens, où G1m3 est plus fréquent (Gorman & Clark, 1990 ; Kameda *et al.*, 1998 ; Oxelius *et al.*, 1999) de même que Km3. Ainsi, la

majorité des anticorps recombinants utilisés en thérapeutique portent sur leurs chaînes lourdes les allotypes G1m17,1 qui peuvent être considérés comme une source potentielle d'alloimmunisation pour des patients qui ne partageraient pas les mêmes allotypes G1m qu'eux. Le trastuzumab fait figure d'exception puisqu'il a été modifié pour porter sur son domaine CH3 l'isoallotype complémentaire de G1m1 (Carter *et al.*, 1992). Ceci montre bien que les allotypes sont considérés par certaines firmes pharmaceutiques, comme un facteur d'immunogénicité potentiel de l'anticorps à prendre en compte dans la conception de ces médicaments. En règle générale, cependant, ces firmes communiquent très peu sur le sujet et ne justifient donc pas le choix pour tel ou tel allotype (Jefferis & Lefranc, 2009).

La part d'anticorps anti-anticorps qui cibleraient les déterminants allotypiques du médicament n'est pour l'heure pas encore évaluée et ce en raison des performances des techniques de dosage de ces anticorps induits. Cependant, les allotypes de chaînes lourdes $\gamma 1$, variants alléliques du gène *IGHG1* représentent un facteur génétique qui pourrait être impliqué dans la survenue des anticorps anti-anticorps chez les patients traités. Ils pourraient en effet expliquer que pour un même anticorps thérapeutique, administré pour le traitement de la même maladie, certains patients développent une réponse humorale et d'autres non. Actuellement, le manque de preuve du rôle des allotypes dans l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques conduit aussi bien les scientifiques convaincus de leur implication que les firmes pharmaceutiques prudentes, à adapter les molécules. Les premiers prônent la création de molécules thérapeutiques « personnalisées » où les patients recevraient un anticorps de même allotypes que leurs propres IgG1 ; les seconds dans une démarche encore timide favorisent une ingénierie des anticorps, à l'image du trastuzumab, privilégiant un allotype qui serait moins immunogène (Carter *et al.*, 1992 ; Hwang & Foote, 2005 ; Jefferis & Lefranc, 2009).

2-2 Prédiction d'épitopes T

Les agences réglementaires préconisent l'utilisation d'études non cliniques permettant d'évaluer l'immunogénicité potentielle d'une protéine pour l'homme, avant son utilisation clinique. Les méthodes employées sont essentiellement des techniques *in silico* à la recherche d'épitopes T sur la protéine d'intérêt, pouvant lier les molécules HLA, *human leucocyte antigen* ou molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). En effet,

contrairement aux lymphocytes B qui reconnaissent des épitopes conformationnels, les lymphocytes T reconnaissent des épitopes linéaires issus de l'apprêtement des protéines par les cellules présentatrices d'antigène, via les molécules du HLA. Un très grand nombre de peptides sont générés par protéolyse dans ces cellules, mais seuls 2% d'entre eux pourront effectivement se lier aux molécules du HLA et être présentés à la surface cellulaire.

Les algorithmes informatiques permettant d'évaluer la possible immunogénicité de protéines d'intérêt sont fondés sur le découpage des séquences en fragments chevauchants de 9 acides aminés et l'évaluation de la liaison de ces séquences à 8 allotypes correspondant à l'essentiel du répertoire HLA de classe II humain. La cartographie de ces épitopes permet ensuite d'adapter la séquence et d'en réduire l'immunogénicité (Weber *et al.*, 2009). Cependant, l'analyse des séquences révèle aussi bien les épitopes activant les lymphocytes T effecteurs, que ceux activant les lymphocytes T régulateurs. En effet, l'analyse d'anticorps humains montre que 7 épitopes conservés ont été identifiés dans la région Fc et les régions charpentes des anticorps suggérant leur rôle immunologique plutôt tolérogène qu'immunogène, comme l'on montrées les expériences *in vitro* menées par la suite (Weber *et al.*, 2009). Pour les auteurs, ces résultats sont corrélés avec la moindre immunogénicité des anticorps humanisés. Ils remarquent par ailleurs que les anticorps thérapeutiques contenant peu d'épitopes T ou bien seulement des épitopes « régulateurs », comme le palivizumab (Synagis®) induisent moins de réponses immunitaires médiées par les lymphocytes T que les anticorps avec un grand nombre d'épitopes « effecteurs » ou un faible nombre d'épitopes « régulateurs », comme le rituximab (MabThera®). Ces résultats sont corrélés à la structure de l'anticorps : un anticorps humanisé versus un chimérique. L'adalimumab (Humira®) contiendrait un grand nombre d'épitopes « régulateurs » et « effecteurs » : les premiers annuleraient l'immunogénicité de la molécule associée aux seconds. Ces outils de cartographie des anticorps thérapeutiques améliorent la connaissance de leur immunogénicité et facilitent en amont la gestion de ce problème, bien avant que ces molécules soient évaluées cliniquement, même si ces étapes ultérieures restent bien évidemment indispensables.

2-3 Influence d'autres caractéristiques individuelles des patients traités

Les facteurs participant à l'immunogénicité d'un anticorps thérapeutique ne relèvent pas seulement de la molécule en elle-même, mais également du terrain particulier que représente le patient auquel il est administré. Le statut immunitaire du patient est fondamental puisqu'il conditionne son aptitude à élaborer une réponse immunitaire dirigée contre ces anticorps. Les patients atteints de maladie auto-immune auraient une plus grande aptitude à élaborer une réponse immunitaire vis-à-vis d'un anticorps recombinant (Stein, 2002). L'exemple du rituximab illustre très bien ce propos, puisque cet anticorps initialement indiqué dans le traitement de certains lymphomes B non-hodgkiniens, n'induit pratiquement pas de réponse de type anticorps anti-rituximab dans cette pathologie (McLaughlin *et al.*, 1998) alors que ceux-ci sont décrits chez un tiers des patients traité pour un lupus systémique (Albert *et al.*, 2008). Par ailleurs, dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, la présence dans le sérum des patients d'IgM anti-IgG, appelées facteurs rhumatoïdes pourrait être à l'origine de réaction entre ces auto-anticorps et un anticorps recombinant, conduisant peut-être à la neutralisation de ces derniers (Stein, 2002). Enfin, certains traitements adjuvants comme les chimiothérapies et les immunosuppresseurs réduisent l'aptitude des patients à élaborer une réponse immune anti-anticorps thérapeutique. En effet, la plupart des protocoles étudient des cohortes de patients sous traitement immunosuppresseur ou plus ou moins immunodéprimés en raison de la nature et de l'activité de leur maladie (Kuus-Reichel *et al.*, 1994).

D'autre part, il ne faut pas négliger la contribution du terrain génétique du patient dans la réponse au traitement. De nombreux gènes candidats peuvent être étudiés et certains appartiennent au CMH. Le grand polymorphisme de ces gènes est à l'origine d'autant de variations inter-individuelles dans la structure de ces molécules : il en résulte que chaque individu aura une façon particulière d'apprêter et de présenter les peptides antigéniques, via les molécules du CMH et ceci conditionne en partie l'immunogénicité de ces peptides. C'est ce qu'a montré M. Brüggeman et collaborateurs chez la souris. Les auteurs ont donc évalué la réponse anti-allotypique chez deux types de souris C57BL/6 et BALB/c à qui ils ont administré un anticorps entièrement murin. Contrairement aux souris C57BL/6, les BALB/c ont développé une réponse intense dirigée contre des domaines variables et constants de l'anticorps. Les auteurs ont conclu que les gènes de la réponse immunitaire et en particulier le

système H-2 murin devait être à l'origine des différences observées (Brüggeman *et al.*, 1989). On peut donc penser que certains haplotypes du CMH codent des molécules avec une conformation particulièrement adaptée, ou au contraire ne permettant pas la présentation de ces peptides antigéniques issus des anticorps, favorisant ou non la réponse immunitaire.

Un autre marqueur génétique potentiel est le *FCGR3A*, gène codant le FcγRIIIa. En effet, il a déjà été identifié dans sa forme homozygote *FCGR3A*-158V, comme étant associé à une meilleure réponse clinique au rituximab dans les lymphomes folliculaires (Cartron *et al.*, 2002) et à une meilleure réponse biologique à l'infliximab dans la maladie de Crohn (Louis *et al.*, 2004). Dans l'exemple de l'infliximab, l'étude des polymorphismes portés par les gènes codant les récepteurs pour la portion Fc des IgG est supportée par l'idée que le mécanisme d'action de l'infliximab fait intervenir des processus d'ADCC (Scallon *et al.*, 1995). L'ADCC mobilise des effecteurs cellulaires qui expriment de tels récepteurs permettant l'interaction de ces effecteurs avec l'infliximab et la lyse des cellules cibles. Les FcγRIIIa peuvent également être exprimés par les cellules présentatrices d'antigènes et intervenir dans la capture d'antigènes : on est en droit de penser que leur polymorphisme pourrait influencer la réponse ATI et donc la réponse au traitement mais rien n'est connu à ce jour.

2-4 Conclusion sur l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques

Les travaux de R. Benjamin et collaborateurs sur des souris rendues tolérantes vis-à-vis des régions constantes d'un anticorps de rat dirigé contre des antigènes cellulaires murins, montrent que celles-ci ont développé une réponse anti-idiotypique majeure (Benjamin *et al.*, 1986). J. Isaacs et collaborateurs en travaillant sur l'alemtuzumab (MabCampath®) ont pu conclure que l'humanisation de la molécule diminuait son immunogénicité, malgré la persistance d'une réponse anti-idiotypique après des injections répétées de l'anticorps ; cette réponse était observée même si le patient partageait le même allotype que l'anticorps thérapeutique (Isaacs *et al.*, 1992). Ces résultats suggèrent que l'élaboration d'anticorps thérapeutiques chimériques ou humanisés, dans lesquels les domaines constants sont d'origine humaine, n'est pas suffisante pour éliminer la réponse anti-anticorps qui reste à la fois anti-idiotypique et possiblement anti-allotypique. De ce fait, tout anticorps intégralement humain est par nature immunogène. En humanisant de plus en plus les domaines variables de ces

anticorps, la réponse de type HAMA que l'on tente de réduire se trouve remplacée par une réponse humorale "humaine anti-humaine" HAHA qui correspond essentiellement à une réponse anti-idiotypique (Clark, 2000). La contribution des nouvelles technologies au succès des anticorps recombinants ne se situe probablement pas tant au niveau de la minimisation de l'immunogénicité des anticorps murins qu'à l'amélioration concomitante des propriétés effectrices et pharmacocinétiques des anticorps monoclonaux du fait de l'acquisition de domaines constants humains (région Fc notamment). Le fait que leur région Fc soit humaine allonge leur demi-vie, favorise leur prise en charge par des récepteurs à l'origine de leur recyclage comme le FcRn (Ghetie *et al.*, 1996).

3- Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux recombinants et immunogénicité

Dans les années 1960, la relation structure-fonction des IgG a été minutieusement décortiquée comme en témoignent les travaux de Porter (Porter, 1959) mais l'avancée des connaissances à cette époque concerne aussi leur métabolisme. Fahey et Robinson publient en 1963 qu'il existe un mécanisme d'homéostasie contrôlant la fraction d'IgG catabolisée. Ils remarquent que l'augmentation de la synthèse d'IgG provoque l'augmentation de la concentration des IgG circulantes, ce qui a pour conséquence d'en accélérer le catabolisme. Ce mécanisme est décrit comme spécifique et sélectif, puisque l'augmentation de la concentration d'autres classes d'Ig n'accélère pas le catabolisme des IgG, pas plus que la concentration circulante d'albumine. Leur analyse va jusqu'à identifier la portion Fc comme étant le site impliqué dans ce mécanisme (Fahey & Robinson, 1963). Ce résultat a ensuite été confirmé par d'autres équipes qui ont montré que l'élimination de fragments Fc obtenus par digestion à la papaïne est aussi lente que celle des IgG entières correspondantes. Les auteurs ajoutent que ces portions Fc ont été très peu retrouvées dans les urines contrairement aux fragments Fab et F(ab')₂ (Spiegelberg & Weigle, 1965).

Ces données sont d'autant plus intéressantes que l'on sait à partir de 1964 que les IgG sont une classe hétérogène d'Ig comprenant 4 sous-classes : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4, différenciées les unes des autres par l'antigénicité de leurs chaînes lourdes (Grey & Kunkel, 1964) et représentant respectivement 65%, 23%, 8% et 4% des IgG totales (Yount *et al.*, 1967). De plus, ces sous-classes diffèrent dans leur aptitude à recruter le complément (Ishizaka *et al.*, 1967). La description des différences structurales antigéniques de ces quatre chaînes lourdes en particulier au niveau de leur Fc, suggère que leur métabolisme puisse également varier d'une sous-classe à l'autre. En effet, Spiegelberg et collaborateurs ont montré que les IgG3 sont plus rapidement catabolisées que les IgG1, G2 et G4 dont les demi-vies sont comparables aux IgG totales (Spiegelberg *et al.*, 1968 ; Spiegelberg & Grey, 1968), soit 23 jours (Cohen & Freeman, 1960). En l'absence d'arguments plus pertinents, la responsabilité du catabolisme plus rapide des IgG3 a été imputée à sa structure, et en

particulier à sa portion Fc (Spiegelberg *et al.*, 1968 ; Morell *et al.*, 1970). Ajoutant un élément dans la relation concentration-catabolisme des IgG, Morell et collaborateurs ont montré en 1970 que l'augmentation de la concentration circulante d'une sous-classe augmentait le catabolisme des autres (Morell *et al.*, 1970). Bien qu'à cette époque le mécanisme régissant le catabolisme des IgG ne soit pas connu, les travaux de Brambell offrent une hypothèse plutôt séduisante qui retient l'attention de plusieurs auteurs (Spiegelberg *et al.*, 1968 ; Morell *et al.*, 1970). En effet, Brambell travaille sur le transfert d'immunité de la mère à son petit. Il propose un mécanisme impliquant un récepteur baptisé plus tard FcRn, *neonatal Fc receptor* et présentant des points communs avec les premiers éléments connus du catabolisme des IgG qui ne peuvent laisser insensible.

3-1 FcRn, un récepteur d'IgG aux multiples facettes (article n°1)

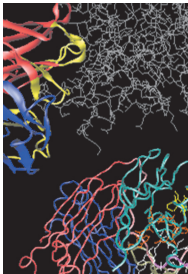
Charlotte Magdelaine-Beuzelin, Marc Ohresser, Hervé Watier. *Médecine Sciences*, 2009, 25, 1053-1056.



► En 1969, Brambell, s'intéressant à la longue demi-vie sérique des IgG et à leur aptitude à traverser la barrière materno-fœtale, les attribue à un récepteur spécifique de la portion Fc, appelé plus tard FcRn, *neonatal Fc receptor*. La résolution de sa structure a permis de l'identifier comme une molécule apparentée au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, capable de prendre en charge les IgG et l'albumine grâce à des liaisons dépendantes du pH. Le FcRn assure à la fois des fonctions de recyclage permettant aux IgG et à l'albumine d'échapper au catabolisme endothélial, de transcytose favorisant la biodistribution des IgG dans l'organisme et sans doute de coopération lors de la phagocytose. Le FcRn est donc étroitement associé à la pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques, ce qui ouvre de séduisantes perspectives en termes d'optimisation de l'utilisation de ces biomolécules. ◀

FcRn, un récepteur d'IgG aux multiples facettes

Charlotte Magdelaine-Beuzelin,
Marc Ohresser, Hervé Watier



C. Magdelaine-Beuzelin,
H. Watier, M. Ohresser : Université
François Rabelais de Tours ;
CNRS, UMR 6239,
équipe Immunogénomique
et anticorps thérapeutiques ;
CHRU de Tours,
Laboratoire d'immunologie,
10, boulevard Tonnellé,
37032 Tours Cedex 1, France.
watier@med.univ-tours.fr

mystérieux récepteur prit définitivement le nom de FcRn, *neonatal Fc receptor*, lorsqu'il fut identifié chez le rat [4]. FcRn est maintenant parfaitement caractérisé du point de vue de sa structure et de sa très vaste distribution dans les organismes, du fœtus à l'adulte, et son rôle clé dans la protection des IgG vis-à-vis du catabolisme des protéines plasmatiques en fait un acteur incontournable de la pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques.

Structure du FcRn et interaction avec les IgG

La première surprise fut de découvrir qu'à la différence des autres FcγR, FcRn appartenait à la famille des molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I [4] (Figure 1). La cocrystallisation de l'ectodomaine du FcRn avec une portion Fc d'IgG montre cette dernière « tête en bas », prise en tenaille entre deux molécules de FcRn (Figures 1 et 2). Sur l'IgG, la région de liaison au FcRn chevauche les domaines CH2 et CH3 (Figure 1) et implique notamment les résidus His310 du domaine CH2 et His435 du domaine CH3 (remplacée par une arginine sur les IgG3) [5]. Ces deux histidines sont chargées positivement à pH inférieur à 6,5, formant des ponts salins avec les résidus correspondants sur le FcRn, ce qu'un pH supérieur à 7,0 fait disparaître [5]. Les séquences du FcRn de l'homme et de la souris ne sont homologues qu'à 65 % [6], l'une des différences

REVUES



SYNTHÈSE

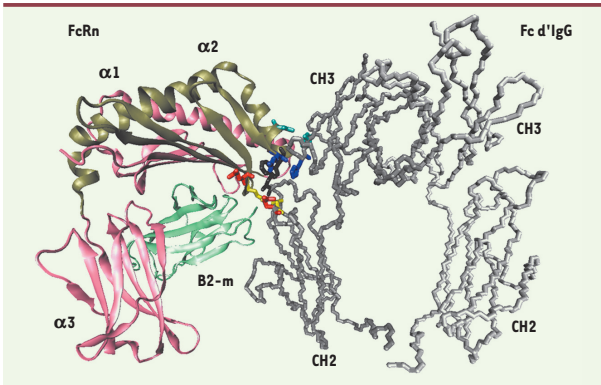


Figure 1. Représentation tridimensionnelle de l'interaction entre FcRn et IgG. Le FcRn est un hétérodimère composé de la β 2-microglobuline (β 2-m en vert) associée de façon non covalente à une chaîne lourde α transmembranaire (45 kDa) repliée en trois domaines extracellulaires : α 1 (rose), α 2 (bronze) et α 3 (rose) seuls ici représentés. Bien que le FcRn soit apparenté aux molécules de classe I du CMH, la cavité localisée entre les domaines α 1 et α 2 est trop étroite pour accueillir un peptide et exercer une fonction de présentation d'antigène. Le site de fixation des IgG sur FcRn est différent de celui de l'albumine et la fixation des IgG n'influence pas celle de l'albumine [7]. Le FcRn se lie au Fc de l'IgG (gris) à l'interface

entre les domaines constants CH2 et CH3, c'est-à-dire un site distinct de celui impliqué dans la liaison au Clq et aux Fc γ R. L'interaction est centrée sur des résidus hydrophobes associant le Trp133 du FcRn et l'Ile253 du Fc (résidus noirs), renforcée par des ponts salins impliquant sur FcRn Glu117, Glu118, Asp132 et sur Fc His310, Gln311 et His435 respectivement [5]. Les acides aminés impliqués dans ces liaisons sont respectivement figurés en jaune, rouge, bleu et cyan. La figure a été obtenue à partir du cocrystal FcRn-Fc d'IgG de rat (*protein data bank* (PDB) 1frt). La portion Fc du cocrystal a été remplacée par son équivalent humain (PDB 1e4k) en superposant les deux Fc afin de donner à la portion humaine une bonne orientation vis-à-vis du FcRn.

notables étant que le FcRn murin présente un site de N-glycosylation (Asn128) absent du FcRn humain et que ce glycanne semble influencer l'affinité de la liaison [5].

Fonctions du FcRn

L'une des fonctions majeures du FcRn est connue sous le nom de recyclage. Elle consiste à extraire les IgG de la voie du catabolisme endothélial des protéines plasmatiques pour les restituer intactes dans la circulation (Figure 2, fléchage bleu). Les IgG partagent cette propriété en exclusivité avec l'albumine qui se lie aussi à FcRn et bénéficie du recyclage [7]. Chez la souris, on a pu calculer que FcRn protège de la dégradation la moitié des molécules d'albumine internalisées et quatre cinquièmes des IgG, ce qui pourrait être un mécanisme énergétiquement plus économique pour l'organisme que la synthèse *de novo* de ces molécules [7]. Ce recyclage explique leur demi-vie longue (trois semaines pour les IgG), tout en permettant le maintien de concentrations plasmatiques élevées puisqu'IgG et albumine représentent 70 % des protéines plasmatiques. Le catabolisme des IgG et de l'albumine augmente lorsque leurs concentrations sanguines sont trop élevées, suite à la saturation du FcRn qui ne peut en recycler davantage [2]. La transcytose des IgG d'un pôle à l'autre des épithéliums ou des endothéliums est la deuxième fonction majeure du FcRn permettant d'assurer leur biodistribution dans l'organisme (Figure 2, fléchage orange). Comme pour le recyclage, FcRn se trouve ainsi étroitement associé au trafic vésiculaire et aux variations de pH qui l'accompagnent. À pH neutre (compartiment extracellulaire),

la liaison des IgG au FcRn est négligeable mais la protonation des résidus histidine de l'IgG à pH légèrement acide permet de créer la liaison à FcRn.

Certains résidus de la portion intracytoplasmique de FcRn interviennent dans sa localisation vésiculaire, et il semble que ce soit la phosphorylation d'un résidu sérine qui permette d'orienter FcRn vers un mécanisme de transcytose plutôt que de recyclage [8]. La fonction de transcytose intervient pour favoriser le passage des IgG au travers des endothéliums et des barrières fœtoplacentaire, intestinale, biliaire ou glomérulaire, ou à l'inverse probablement pour refouler les IgG ayant franchi la barrière hémato-méningée ou hématorétinienne [9]. Enfin, une troisième grande fonction du FcRn serait de coopérer avec les Fc γ R classiques dans les fonctions de phagocytose et de présentation des complexes immuns, en prenant peut-être le relais des Fc γ R pour la liaison aux IgG dans les compartiments endosomiaux acides. Cette fonction encore mal connue de FcRn explique sans doute qu'il soit exprimé dans les cellules présentatrices d'antigène [9] et les polynucléaires neutrophiles [6].

FcRn et Ac thérapeutiques

On sait maintenant que l'échec clinique des anticorps monoclonaux murins vient de leur très courte

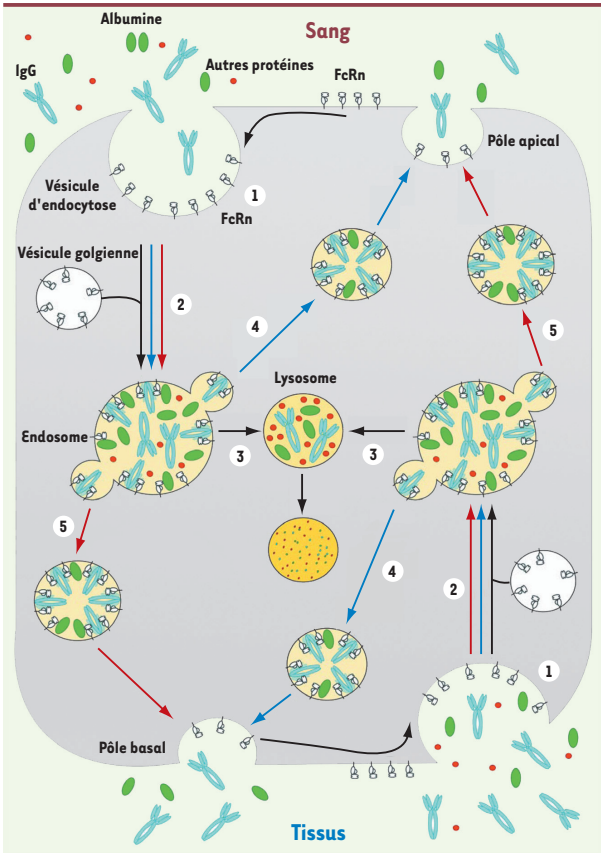


Figure 2. Représentation schématique du trafic cellulaire de FcRn. Le FcRn est largement exprimé dans les cellules endothéliales, comme dans le schéma, et épithéliales. Dans ces cellules polarisées, FcRn peut être exprimé au niveau de la membrane plasmique, se distribuant plus ou moins équitablement entre les pôles apical et basal selon les types cellulaires. En réalité, la majeure partie de FcRn se trouve dans les compartiments vésiculaires intracellulaires. 1. Les cellules exprimant FcRn sont douées de pinocytose et peuvent internaliser à leur pôle apical et/ou basal les protéines solubles présentes dans l'environnement, dont l'albumine (en vert) et les IgG (en bleu). Dans ces vésicules d'endocytose, le pH est neutre et FcRn ne s'associe ni aux IgG, ni à l'albumine. 2. La fusion de ces vésicules avec d'autres vésicules d'origine golgienne produit un endosome dont le pH s'acidifie, ce qui permet au FcRn de se lier aux IgG et à l'albumine, dans la limite des molécules de FcRn disponibles. 3. Les IgG et l'albumine excédentaires, ainsi que les autres protéines ne se liant pas à FcRn (en rouge), suivent la voie lysosomale de plus en plus acide (figurée en jaune, fléchage noir) conduisant à leur dégradation. 4. Les IgG et l'albumine captées par FcRn sont recyclées, c'est-à-dire reconduites à la surface apicale et/ou basale (fléchage bleu). En fusionnant avec la membrane plasmique, le pH remonte et les IgG comme l'albumine se dissocient de FcRn, ce qui permet leur libération dans le milieu extracellulaire. FcRn se retrouve alors temporairement exprimé en surface, avant d'être de nouveau internalisé. 5. Le FcRn assure aussi le transfert des IgG et de l'albumine d'un pôle à l'autre de la cellule (fléchage orange) dans le sens apical vers basal ou à l'inverse.

demi-vie chez l'homme résultant de la faible affinité du FcRn humain pour les IgG de souris [10]. La solution fut apportée par l'humanisation de la portion Fc qui réduit aussi l'immunogénicité et améliore l'interaction avec les mécanismes effecteurs. L'étape ultérieure serait maintenant de pouvoir augmenter la demi-vie des anticorps thérapeutiques afin d'accroître leur efficacité et/ou de réduire les doses administrées. Cette amélioration pourrait passer par la sélection d'anticorps à portion Fc mutée ayant une affinité pour le FcRn accrue à pH acide. Néanmoins, le gain d'affinité obtenu avec ces mutants (jusqu'à vingt-huit fois celle de l'IgG sauvage) n'est pas systématiquement associé à une amélioration de la pharmacocinétique et en particulier à un allongement de la demi-vie [11].

FcRn n'a peut-être donc pas encore livré tous ses mystères... ♦

FcRn, a multifaceted IgG receptor

SUMMARY

**Neonatal Fc receptor,
key control of immunoglobulins biodistribution**

In 1969, Brambell, while studying the long serum half-life of IgG and their ability to cross the materno-foetal barrier, attributed these two properties to the existence of a specific Fc receptor, which was later denominated FcRn for neonatal Fc receptor. The resolution of its structure revealed that it is a MHC class-I-like molecule. FcRn is able to load IgG and albumin in a pH-dependent manner. It acts as an intracellular transport protein and as such is controlling the serum half-life of these proteins (apical recycling of IgG and albumin in endothelial cells), IgG biodistribution (apical to basolateral and basolateral to apical transport of IgG in epithelial and endothelial cells) and it may also contribute

REVUES

SYNTHÈSE

to phagocytosis. FcRn is thus a key partner in the pharmacokinetics of therapeutic antibodies, opening interesting prospects for optimisation of their use. ♦

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Ransom DR. Prophylactic effect of antitoxin on the child in utero. *J Am Med Ass* 1909 ; iii : 556.
2. Brambell FWR, Hemmings WA, Morris IG. A theoretical model of γ -globulin catabolism. *Nature* 1964 ; 205 : 1352-5.
3. Brambell FWR. The transmission of immune globulins from the mother to the foetal and newborn young. *Proc Nutr Soc* 1969 ; 28 : 35-41.
4. Simister NE, Mostov KE. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature* 1989 ; 337 : 184-7.
5. Martin WL, West AP Jr, Gan L, Bjorkman PJ. Crystal structure at 2.8 Å of an FcRn/heterodimeric Fc complex: mechanism of pH-dependent binding. *Mol Cell* 2001 ; 7 : 867-77.

6. Vidarsson G, Stemerding AM, Stapleton NM, et al. FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Blood* 2006 ; 108 : 3573-9.
7. Anderson CL, Chaudhury C, Kim J, et al. Perspective-FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine. *Trends Immunol* 2006 ; 27 : 343-8.
8. McCarthy KM, Lam M, Subramanian L, et al. Effects of mutations in potential phosphorylation sites on transcytosis of FcRn. *J Cell Sci* 2001 ; 114 : 1591-8.
9. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 2007 ; 7 : 715-25.
10. Ober RJ, Radu CG, Ghetie V. Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *Int Immunol* 2001 ; 13 : 1551-9.
11. Datta-Mannan A, Witcher DR, Tang Y, et al. Monoclonal antibody clearance. Impact of modulating the interaction of IgG with the neonatal Fc receptor. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 1709-17.

TIRÉS À PART

C. Magdelaine-Beuzelin

11/12/2009 – 632 pages

Prix public TTC : 75 €

PSYCHIATRIE DE LA PERSONNE ÂGÉE

... Médecine-Sciences ... Flammarion

PSYCHIATRIE DE LA PERSONNE ÂGÉE

Jean-Pierre CLÉMENT

Médecine-Sciences

Flammarion

Cet ouvrage de référence, divisé en 5 parties, fait un point complet sur toutes les pathologies psychiatriques, spécifiquement liées à l'âge, auxquelles le psychiatre, comme le médecin généraliste, se trouvent de plus en plus souvent confrontés.

Après une 1^{re} partie consacrée à l'état actuel des connaissances sur le vieillissement et le fonctionnement psychique, l'épidémiologie des troubles mentaux chez le sujet âgé... la 2^e partie, la plus importante, traite des différents aspects cliniques des troubles psychiques de la personne âgée, comme les troubles anxieux et du sommeil, les états dépressifs, le suicide, les états confusionnels et délirants, les démences, etc.

Une dizaine de chapitres sont ensuite dédiés aux différentes thérapeutiques médicamenteuses, aux divers types de psychothérapies, etc. Puis l'ouvrage s'intéresse aux aspects psychosociaux et aux perspectives de la recherche en ce domaine.

Au total un ouvrage indispensable, très pratique et très complet, sur un sujet de grande actualité.

En vente chez votre libraire spécialisé, par correspondance ou sur notre site www.medecine.lavoisier.fr ou www.eminter.fr

Bon de commande à retourner complété à : LAVOISIER SAS – 14, rue de Provigny – 94236 CACHAN Cedex

Psychiatrie de la personne âgée : 75 € TTC (+ 7 € de participation aux frais de port par exemplaire) soit 82 €. Frais de port offert* si paiement joint à la commande.	Quantité	(*France métropolitaine, Suisse, UE. Autres nous consulter) Je joins mon règlement à la commande : Montant total de : _____ € Chèque bancaire ou postal payable en France à l'ordre de LAVOISIER SAS (Une facture acquittée sera jointe au colis)
Carte bancaire n° :		Date d'expiration :
Les 3 derniers chiffres situés au dos de votre carte bancaire :		Nom / Prénom :
Fonction / spécialité :		Adresse :
Code postal : Ville :		Tél. : E-mail :
Ces renseignements pourront figurer sur un fichier informatique. Conformément à la loi Informatique & Libertés du 6 janvier 1978, vous bénéficiez d'un droit d'accès et de rectification aux données vous concernant.		

Date et signature obligatoire :

MS 12/09

1056

M/S n° 12, vol. 25, décembre 2009

Magdelaine.indd 1056

08/12/2009 15:41:28

3-2 Pharmacocinétique et biodistribution

3-2-1 Demi-vie et distribution

Les anticorps thérapeutiques, une fois injectés au patient, vont dans une certaine mesure se comporter comme des IgG endogènes et interagir avec le FcRn. Le FcRn va conditionner, comme il le fait pour les IgG naturelles, non seulement la demi-vie des anticorps en fonction de la concentration d'IgG circulantes, mais également leur distribution dans l'organisme. Une façon d'illustrer ceci est de prendre des exemples parmi les protéines thérapeutiques autres que les anticorps comme les cytokines dont la petite taille et la courte demi-vie sérique impliquent des administrations répétées limitant leur utilisation clinique (Jazayeri & Carroll, 2008). Les processus de recyclage et de transcytose des IgG par le FcRn ont inspiré la fusion de protéines d'intérêt thérapeutique avec la portion Fc d'une IgG, dans le but d'en améliorer la demi-vie (Ashkenazi *et al.*, 1993), mais aussi de développer certaines voies d'administration. En effet, la présence avérée de FcRn sur l'épithélium pulmonaire (Spiekermann *et al.*, 2002) fait de cette voie déjà convoitée depuis longtemps, un moyen non invasif intéressant, de délivrer ces molécules composites (Bitonti & Dumont, 2006). Bitonti et Dumont ont élaboré plusieurs molécules prototypes comme l'érythropoïétine-Fc d'IgG1 humaine qui, après administration par aérosol, montre une biodisponibilité 30 % supérieure à celle d'une dose équivalente d'érythropoïétine par voie intra-veineuse. De plus, l'IFN- α -Fc a une demi-vie 20 fois plus longue que la molécule native, IFN- α (interféron alpha), associée à une meilleure activité biologique qui persiste au moins deux semaines après une seule inhalation, alors que celle-ci dure à peine 5 jours avec l'IFN- α (Bitonti & Dumont, 2006 ; Dumont *et al.*, 2006). La fusion à un Fc d'IgG1 confère à la molécule native des propriétés pharmacocinétiques classiquement attribuées aux IgG et directement associées à l'interaction avec le FcRn.

L'efficacité thérapeutique du bévaccizumab dans le traitement d'une maladie oculaire, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), illustre le rôle du FcRn dans la distribution tissulaire des anticorps. En effet, la société Genentech a développé un anticorps ciblant le VEGF dont la version IgG1 entière correspond au bévaccizumab (Avastin®) indiqué dans le traitement des cancers colo-rectaux. Ce format d'anticorps ne pouvait *a priori* être utilisé dans le traitement de la DMLA puisque Mordenti et collaborateurs ont publié en 1999 qu'un anticorps entier, i.e le trastuzumab, ne pénètre pas la rétine (Mordenti *et al.*, 1999). C'est

pourquoi la firme a par la suite élaboré la version Fab de l'anticorps anti-VEGF (ranibizumab (Lucentis®)), de poids moléculaire beaucoup plus faible qu'une IgG1 entière, dont l'affinité pour la cible a été optimisée et est indiquée dans le traitement de la DMLA par injection intra-vitréale. Cependant, la commercialisation du bévacizumab ayant devancé celle du ranibizumab, les ophtalmologistes ont essayé, avec succès, le bévacizumab non seulement en injection intra-vitréale (Rosenfeld *et al.*, 2005) mais aussi par voie systémique (Bolz *et al.*, 2007). Ces résultats sont d'autant plus intéressants que Kim et collaborateurs ont montré que le FcRn est exprimé au niveau de la barrière hémato-rétinienne (Kim *et al.*, 2008) ce qui expliquerait que le bévacizumab injecté par voie veineuse puisse être efficace dans la DMLA.

3-2-2 Concentration des anticorps

Le recyclage des anticorps thérapeutiques par le FcRn influence leur PK mais également celle des molécules ciblées. Très peu d'études ont été publiées à ce propos, certainement en raison de la difficulté à disposer de techniques de dosages fiables de ces molécules. Lowe et collaborateurs ont analysé la PK de l'omalizumab (Xolair®) et la pharmacodynamie des IgE, sa cible antigénique. En effet, l'omalizumab neutralise les IgE dans le traitement de l'asthme ce qui améliore les symptômes. Cependant, chez les patients traités, le dosage des IgE totales, i.e. IgE complexées à l'omalizumab et IgE libres, montre que celles-ci sont augmentées. Bien que la concentration des IgE libres, neutralisées par l'omalizumab, diminue, les complexes IgE-IgG, de catabolisme plus lent s'accumulent dans le sang (Lowe *et al.*, 2009), allongeant artificiellement la demi-vie des IgE.

3-2-3 Immunogénicité et pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques anti-TNF- α

Le choix de la famille des anticorps anti-TNF- α pour illustrer le lien entre immunogénicité et PK des anticorps monoclonaux recombinants est multiple. Tout d'abord les anticorps anti-TNF- α sont utilisés dans le traitement de maladies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde, maladie de Crohn...), pathologies dans lesquelles est plus fréquemment recensée une réponse anti-anticorps que dans les cancers. De plus, les anticorps anti-TNF- α furent, avec l'infliximab en 1998, parmi les premiers anticorps thérapeutiques commercialisés, si bien que les données cliniques le concernant abondent. Enfin, la famille

des anticorps anti-TNF- α est d'autant plus intéressante à analyser qu'elle possède des représentants dans chaque génération d'anticorps : l'infliximab est chimérique, le certolizumab pegol humanisé et l'adalimumab complètement humain (Tableaux II, IV et V).

3-2-3-1 Infliximab

L'infliximab (Remicade®) est indiqué dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante, la maladie de Crohn de l'adulte et de l'enfant, la rectocolite hémorragique, le psoriasis et le rhumatisme psoriasique (<http://www.remicade.com>). La polyarthrite rhumatoïde et le Crohn sont les deux indications pour lesquelles il y a le plus grand recul sur l'utilisation de ce biomédicament et l'impact de son immunogénicité a été beaucoup étudié. Les anticorps HACA induits par l'infliximab et dont il est lui-même la cible ont finalement été baptisés *antibodies-to-infliximab* ou ATI. La prévalence des ATI dans le cas des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde varie entre 12% et 44% (Bendtzen *et al.*, 2006 ; Haraoui *et al.*, 2006 ; Maini *et al.*, 1998 ; Svenson *et al.*, 2007 ; van den Bemt *et al.*, 2008 ; van der Bijl *et al.*, 2008 ; van der Laken *et al.*, 2007 ; Wolbink *et al.*, 2006) et entre 6% et 61% en ce qui concerne le Crohn (Baert *et al.*, 2003 ; Farrell *et al.*, 2003 ; Hanauer *et al.*, 2004 ; Miele *et al.*, 2004 ; Targan *et al.*, 1997 ; Vermeire *et al.*, 2007). Ces chiffres sont difficilement comparables puisqu'ils sont issus de cohortes de patients souffrant de pathologies différentes, que les études ne sont pas conçues de la même façon en termes de temps de prélèvement par rapport à la dernière injection, de traitement des échantillons mais également de médicaments adjuvants de type immunosuppresseurs (Anderson *et al.*, 2005).

De plus, les techniques de dosage des ATI comme les autres méthodes de dépistage des HACA sont loin d'être standardisées (§ 1-6). De plus, les sources d'interférences avec le dosage des ATI, quelle que soit la technique employée, sont nombreuses : il s'agit pour l'essentiel de l'infliximab circulant résiduel ou d'auto-anticorps comme les facteurs rhumatoïdes (Emi Aikawa *et al.*, 2009) fréquemment retrouvés dans la population générale et *a fortiori* chez les sujets atteints de polyarthrite rhumatoïde, mimant la fixation des ATI sur l'infliximab utilisé dans le test, et donnant des résultats faussement positifs.

Les conséquences de la survenue des ATI pour les patients ont également été étudiées. Baert et collaborateurs ont montré que les ATI, détectés chez 61% des patients traités pour

maladie de Crohn, diminuent la réponse clinique au traitement et induisent un risque majoré de faire une réaction à l'injection suivante lorsque leur concentration est supérieure à 8 mg/mL (Baert *et al.*, 2003), élément confirmé par d'autres équipes (Miele *et al.*, 2004 ; Wolbink *et al.*, 2006 ; de Vries *et al.*, 2007 ; van der Laken *et al.*, 2007 ; Ainsworth *et al.*, 2008 ; Radstake *et al.*, 2008). Il a été montré par ailleurs que la prévalence des ATI est inversement proportionnelle à la concentration circulante d'infliximab (Bendtsen *et al.*, 2006) et que cette concentration est d'autant plus basse que la concentration des ATI est élevée (Haraoui *et al.*, 2006 ; Wolbink *et al.*, 2006) suggérant à la fois une neutralisation de l'infliximab par les ATI et une accélération de son élimination ou l'impossibilité de le doser en raison d'anticorps neutralisants de type anti-idiotype.

Par ailleurs, comme pour plusieurs autres anticorps thérapeutiques dont l'adalimumab, l'infliximab est sujet à une variation inter-individuelle d'efficacité dont les mécanismes ne sont pas totalement compris, on sait cependant, que la PK de l'anticorps est impliquée. En effet, plusieurs équipes ont rapporté que des concentrations circulantes élevées d'infliximab sont associées à une meilleure réponse au traitement (St Clair *et al.*, 2002 ; Reich *et al.*, 2005 ; Maser *et al.*, 2006).

3-2-3-2 Certolizumab pegol

Le certolizumab pegol (Cimzia®), approuvé en avril 2008 par la FDA (Meldred *et al.*, 2008) pour le traitement du Crohn et également en cours d'évaluation dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (Choy *et al.*, 2002). Bien que le recul clinique sur la molécule soit de fait encore faible, plusieurs études ont entre autres évalué son immunogénicité. Sandborn et collaborateurs rapportent que 8% des patients traités développent des anticorps anti-certolizumab (Sandborn *et al.*, 2007) confirmant ainsi ce qui avait déjà été publié (Schreiber *et al.*, 2007). Les premières évaluations de la molécule dans la polyarthrite rhumatoïde montrent que chez des patients recevant des quantités différentes du médicament, tous développent des anticorps anti-certolizumab après la seconde injection, quelle que soit la dose. Les auteurs précisent que l'incidence des anticorps induits varie avec la dose mais qu'elle est plus faible pour les fortes doses (Choy *et al.*, 2002). La technique de dépistage des anticorps anti-certolizumab utilisée dans les trois études est un ELISA en double antigène (Choy *et al.*, 2002) selon le même modèle que celui décrit pour les ATI et présentant donc les mêmes limites. Cela est surprenant puisque le certolizumab pegol est un Fab : l'absence du fragment Fc rend possible l'utilisation d'un anticorps couplé à une enzyme et dirigé contre le

Fc des anticorps anti-certolizumab afin d'en révéler la fixation sur le certolizumab, dans un test ELISA.

3-2-3-3 Adalimumab

L'adalimumab (Humira®) est indiqué dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (Bender *et al.*, 2007) et plus récemment dans la maladie de Crohn (Sandborn *et al.*, 2007). Sa structure d'anticorps humanisé a initialement fait dire de lui qu'il était moins immunogène que son homologue chimérique, l'infliximab (Emi Aikawa *et al.*, 2009). Cependant, la survenue d'anticorps anti-adalimumab a été décrite : leur incidence cumulée varie entre 6% et 87% dans la polyarthrite rhumatoïde (Keystone *et al.*, 2004 ; Weinblatt *et al.*, 2003 ; van de Putte *et al.*, 2004 ; Benden *et al.*, 2007 ; Bartelds *et al.*, 2007 et Bartelds *et al.*, 2009) et Sandborn et collaborateurs rapportent que 2,6% des 269 patients traités pour maladie de Crohn ont développé ces anticorps (Sandborn *et al.*, 2007). Pour les mêmes raisons que celles avancées pour l'infliximab, ces chiffres ne sont pas comparables. Les obligations en termes de technique employée pour le dépistage des anticorps anti-anticorps thérapeutiques sont communes à toutes les molécules et leurs limites également. L'influence des anticorps anti-adalimumab sur l'efficacité du traitement de la polyarthrite rhumatoïde n'est pas claire : ils limiteraient l'amélioration des signes cliniques pour Bender et collaborateurs (Bender *et al.*, 2007) voire favoriseraient une mauvaise réponse au traitement (Bartelds *et al.*, 2007) ou bien au contraire n'affecteraient pas de façon significative la réponse (van de Putte *et al.*, 2004). Par ailleurs, comme cela a été décrit pour l'infliximab, l'adalimumab présente une variation inter-individuelle d'efficacité que l'on attribue au moins en partie à sa PK (Bartelds *et al.*, 2007).

Bien que chacun des trois anticorps anti-TNF- α stimule chez certains des patients auxquels ils sont administrés la production d'anticorps anti-anticorps, l'impact de ces anticorps induits ne semble pas identique, *i.e.*, les ATI semblent être à l'origine de réactions à l'injection et d'une moins bonne réponse au traitement (Ainsworth *et al.*, 2008 ; de Vries *et al.*, 2007 ; Miele *et al.*, 2004 ; van der Laken *et al.*, 2007 ; Radstake *et al.*, 2008 ; Wolbink *et al.*, 2006) de façon beaucoup moins controversée que les anticorps anti-certolizumab pegol ou anti-adalimumab.

RESULTATS

1- Présentation générale

J'ai choisi de commencer ce chapitre de résultats par quelques études cliniques auxquelles j'ai contribué se rapportant au suivi des patients traités par anticorps anti-TNF- α . Ces travaux ont pour objectif de montrer qu'il est important de connaître la pharmacologie et l'immunogénicité de ces molécules dans un souci constant d'améliorer la prise en charge des patients. Ils illustrent également que la réponse clinique aux anticorps thérapeutiques est sujette à une forte variation inter-individuelle. Mon rôle dans ces études a consisté à élaborer certains outils biologiques nécessaires à ce suivi, à savoir le dosage des anticorps induits (anticorps anti-infliximab et anti-adalimumab).

Les travaux présentés dans une deuxième partie s'efforcent d'identifier les facteurs immunologiques et génétiques qui participent à l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques et qui, de ce fait pourraient concourir à expliquer une partie de la variabilité pharmacocinétique. Nous avons analysé les éléments structuraux des domaines variables de deux grandes familles d'anticorps, les anti-cancéreux et les anti-TNF- α pouvant contribuer à leur divergence du répertoire humain des Ig et donc à leur immunogénicité. Par ailleurs, nous avons recherché l'influence des polymorphismes de deux gènes candidats, *IGHG1* codant les allotypes G1m porté sur les domaines CH1 des IgG1 et *FCGR3A* affectant le récepteur Fc γ RIIIA, sur la survenue des anticorps induits par l'infliximab.

Dans une troisième partie, nous nous appuyons sur l'exemple des anticorps thérapeutiques utilisés en ophtalmologie pour proposer l'étude du FcRn comme nouvelle piste de recherche quant à la variabilité pharmacocinétique des anticorps. En effet, l'implication de ce récepteur d'IgG dans la PK et la biodistribution des anticorps est de mieux en mieux décrite, suggérant que des variations de son niveau d'expression pourrait influencer cette PK et, de fait ouvrir la voie de l'exploration de sa propre variabilité génétique.

2- Pharmacocinétique de l'adalimumab et de l'infliximab en gastro-entérologie : influence des anticorps induits

2-1 Introduction

La place récurrente qu'occupe l'immunogénicité des anticorps anti-TNF- α dans les travaux cliniques et pharmacologiques abordés dans cette première partie de résultats justifie la présentation de ces publications dans cette thèse. Elle permet de poser la problématique des anticorps induits dans leur contexte et témoigne que le suivi de ce paramètre est indispensable à la bonne prise en charge des patients. Les questions pharmacologiques et cliniques que soulève la survenue des anticorps induits, et plus particulièrement des anticorps anti-infliximab (ATI) et anti-adalimumab sont d'explorer les conséquences liées à leur survenue en termes de réponse clinique et de pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques. Les questions scientifiques qui se posent en arrière-plan sont d'identifier les éléments qui gouvernent leur survenue, reflet de l'immunogénicité des anti-TNF- α . Est-ce la structure des anticorps recombinants, leur interaction avec le système immunitaire du patient et/ou le terrain génétique de celui-ci ?

L'infliximab étant le chef de file de cette famille, nous avons initialement mis au point au laboratoire en 2004, le dosage des ATI selon une technique ELISA en double antigène (Ternant *et al.*, 2008 (article n°3) ; Van Assche *et al.*, 2009 (article n°8, Annexe n°2) ; Mulleman *et al.*, 2009 (article n°9, Annexe n°3)), comme cela est recommandé par les agences réglementaires. Elle fut suivie par le développement d'une technique similaire permettant de doser les anticorps anti-adalimumab (Karmiris *et al.*, 2009 (article n°2)). Bien que les performances de ces techniques soient limitées par la présence de l'anticorps thérapeutique circulant résiduel, conjointement dosé au laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie du CHRU de Tours, elles nous permettent de faire le suivi biologique des patients traités en rhumatologie et en gastroentérologie au CHRU, et de répondre aux demandes de nombreux autres centres hospitaliers français, et plus largement européens. Les laboratoires d'Immunologie et de Pharmacologie-Toxicologie se sont alors associés pour

créer le Centre Pilote de Suivi Biologique des Anticorps thérapeutiques (CePiBAC) donnant plus de lisibilité à leur domaine de compétence en matière d'anticorps thérapeutiques.

Cliniciens, pharmaco-toxicologues et immunologistes s'intéressent aux anticorps thérapeutiques et travaillent ensemble pour en optimiser l'utilisation, cependant, chacun de ces spécialistes aborde le sujet avec les interrogations propres à sa discipline. Il serait difficile de traiter de l'immunogénicité de ces molécules sans évoquer les questions cliniques qui s'y rapportent puisque les anticorps thérapeutiques ayant été largement humanisés, leur immunogénicité ne peut s'étudier que chez l'homme. En effet, ces molécules sont très immunogènes pour les animaux, y compris les primates et ce, en raison de la divergence inter-espèce des répertoires d'IgG. Ces modèles animaux ne permettent pas de prédire l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques chez l'homme et en extrapoler le potentiel immunogénique de l'animal (primates inclus) à l'homme n'est supporté par aucun rationnel scientifique (Loisel *et al.*, 2007).

Typiquement, les cliniciens ont besoin de savoir quelle efficacité ils peuvent attendre des traitements anti-TNF- α . S'ils possèdent un assez bon recul sur l'utilisation de l'infliximab, ce n'est pas encore le cas de l'adalimumab, souvent utilisé en deuxième intention après échec du traitement par infliximab. Bien que les critères cliniques soient l'élément prépondérant permettant d'évaluer le succès thérapeutique, les cliniciens trouvent dans le suivi biologique aussi bien pharmacologique qu'immunologique de leurs patients, des arguments supplémentaires les aidant à optimiser cette prise en charge (modification de la posologie ou changement de molécule). Les questions soulevées par l'article n°2 présenté ci-dessous sont triple. Tout d'abord clinique, afin de juger de l'efficacité de l'adalimumab en relais de l'infliximab chez des patients atteints de Crohn pour lesquels ce dernier s'est soldé par un échec, quelle que soit son étiologie. Puis, pharmacologique afin d'évaluer l'influence des concentrations résiduelles d'adalimumab sur cette réponse clinique. Et enfin, immunologique en explorant la survenue des anticorps induits anti-adalimumab à la fois sur la réponse clinique et sur les concentrations résiduelle d'adalimumab.

Les pharmaco-toxicologues quant à eux, cherchent à décrire la pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques anti-TNF- α et à explorer les sources de sa variabilité inter-individuelle, pré-requis nécessaire à l'adaptation de leur posologie. L'article n°3 rapporte les résultats de la modélisation compartimentale des paramètres pharmacocinétiques de l'infliximab réalisée sur une cohorte de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Crohn et rectocolite hémorragique), ainsi qu'une analyse de

l'influence de covariables démographiques, des traitements adjuvants mais également des ATI sur ces paramètres.

2-2 Article n°2 : Influence of trough levels and immunogenicity on long-term outcome of adalimumab therapy in Crohn's disease

Konstantinos Karmiris, Gilles Paintaud, Maja Noman, Charlotte Magdelaine-Beuzelin, Marc Ferrante, Danielle Degenne, Karolien Claes, Tamara Coopman, Nele Van Schuerbeek, Gert Van Assche, Séverine Vermeire, Paul Rutgeerts. *Gastroenterology.*, 2009, 137, 1628-1640.

Influence of Trough Serum Levels and Immunogenicity on Long-term Outcome of Adalimumab Therapy in Crohn's Disease

KONSTANTINOS KARMIRIS,* GILLES PAINAUD,[‡] MAJA NOMAN,* CHARLOTTE MAGDELAINE-BEUZELIN,[§] MARC FERRANTE,* DANIELLE DEGENNE,[§] KAROLIEN CLAES,* TAMARA COOPMAN,* NELE VAN SCHUERBEEK,* GERT VAN ASSCHE,* SEVERINE VERMEIRE,* and PAUL RUTGEERTS*

*Department of Gastroenterology, University Hospital Gasthuisberg, Leuven, Belgium; and Laboratory of [‡]Pharmacology-Toxicology and [§]Immunology, Tours University Hospital, Tours, France

This article has an accompanying continuing medical education activity on [page 1836](#). Learning Objective: Upon completion of this examination, successful learners will be able to interpret the role of immunogenicity in the use of biologic agents in inflammatory bowel diseases.

See related article, [Lewis JD et al](#), on page 1195 in *CGH*.

BACKGROUND & AIMS: Adalimumab is an efficacious therapy for active Crohn's disease, but long-term data are scarce. We conducted an observational study to assess the long-term clinical benefit of adalimumab in patients who failed to respond to infliximab, specifically focusing on the influence of trough serum concentration and antibodies against adalimumab on clinical outcome. **METHODS:** A total of 168 patients with Crohn's disease treated with adalimumab in a tertiary center were included in a prospective follow-up program. Trough serum concentration and antibodies against adalimumab were measured at predefined time points using enzyme-linked immunosorbent assays. **RESULTS:** A total of 71% and 67% of patients responded by weeks 4 and 12, respectively; among them, 61.5% demonstrated sustained clinical benefit until the end of follow-up (median [interquartile range], 20.4 [11.7–30.0] months). Of the 156 patients receiving maintenance therapy, 102 (65.4%) had to step up to 40 mg weekly and 60 (38.5%) eventually stopped adalimumab therapy mainly due to loss of response. Significantly lower adalimumab trough serum concentrations were measured throughout the follow-up period in patients who discontinued therapy as compared with patients who stayed on adalimumab. Antibodies against adalimumab were present in 9.2% of the patients and affected trough serum concentration. Serious adverse events occurred in 12% of the patients. **CONCLUSIONS:** Introduction of adalimumab after failure of infliximab therapy resulted in a sustained clinical benefit in two thirds of patients during a median follow-up period of almost 2 years. Discontinuation was directly related to low adalimumab trough serum concentration, which

was observed more frequently in patients who developed antibodies against adalimumab.

Crohn's disease (CD) is a chronic, relapsing, transmural inflammation of the gastrointestinal tract affecting mainly young patients and resulting in a considerably decreased quality of life.¹ So far, there is no medical or surgical cure for CD and the goal of the existing spectrum of therapeutic modalities is to induce and maintain remission.²

Tumor necrosis factor (TNF)- α holds a pivotal role in the pathogenesis of CD.³ The introduction of infliximab, a chimeric monoclonal immunoglobulin G1 antibody against TNF- α , more than 10 years ago for inducing and maintaining clinical response and remission in patients with moderate to severe luminal and fistulizing CD created new perspectives for the management of this disease.^{4–6} Unfortunately, 25%–40% of the patients who respond to this therapy need multiple dose and interval adjustments to maintain clinical response over the long-term and about 10% of patients per year discontinue therapy because of loss of response or side effects.^{5–8}

The development of antibodies to infliximab and, as a consequence, low trough serum concentration of the drug have been implicated as predisposing factors for infliximab treatment failure.^{9–13}

Adalimumab (Humira, D2E7; Abbott Laboratories, Abbott Park, Chicago, IL) is a recombinant, fully human, subcutaneously delivered immunoglobulin G1 monoclonal antibody. This second anti-TNF agent was found to be effective for treatment of refractory luminal CD, both

Abbreviations used in this paper: CRP, C-reactive protein; IQR, interquartile range; OR, odds ratio; SAE, severe adverse events; TNF, tumor necrosis factor.

© 2009 by the AGA Institute
0016-5085/09/\$36.00
doi:10.1053/j.gastro.2009.07.062

in patients who were naive to infliximab and in those who had already been treated with infliximab.¹⁴⁻¹⁷ Although fully human, adalimumab is not devoid of immunogenicity. Antibodies against adalimumab have been reported in 2.6%–38% of patients treated for CD or rheumatoid arthritis, the rate depending also on the presence of concomitant immunomodulator therapy.^{16,18,19} In patients with rheumatoid arthritis, antibodies against adalimumab have been associated with low adalimumab trough serum concentration and decreased clinical response,¹⁸ but data in CD are lacking.

The aims of this study were (1) to assess the long-term outcome of adalimumab therapy, including safety, in a consecutive series of 168 patients with CD who discontinued infliximab therapy because of loss of response or intolerance; (2) to evaluate the influence of adalimumab trough serum concentration on clinical response, adalimumab dose escalation, and discontinuation of therapy; and (3) to investigate the presence of antibodies against adalimumab and their relationship to adalimumab trough serum concentration and clinical outcome.

Patients and Methods

Patients

This was an observational cohort study performed at a single tertiary care center, where a prospectively designed standardized schedule was used for follow-up by experienced clinicians of all patients treated with adalimumab. Eligible patients were male and female patients with CD who had presented an initial response to infliximab and subsequently became intolerant (acute and/or delayed hypersensitivity reactions) or lost response (worsening of clinical status as judged by the treating physician) despite dose adjustment. Thirty percent of the patients received a course of corticosteroids after discontinuation of infliximab therapy, while the others (1) were included in randomized controlled trials with experimental therapies but dropped out due to lack of efficacy, (2) remained under treatment with concomitant immunomodulators until initiation of adalimumab therapy, or (3) received no specific treatment (infliximab washout period before entering adalimumab trials). The modified Vienna classification was used for assessing CD location and behavior.²⁰ Assessment of CD and extraintestinal manifestation activity was based on endoscopic, histopathologic, radiologic, and clinical criteria. In all patients, latent tuberculosis was again excluded before initiation of adalimumab therapy via a protein purified derivative skin test and a chest x-ray. Patients with evidence of tuberculosis exposure at initiation of adalimumab therapy who had not received prophylaxis while being treated with infliximab received anti-tuberculosis prophylactic treatment for at least 6 months. Patients were seen at the IBD outpatient clinic every 2 weeks for the first 12 weeks of adalimumab treatment and every

1–3 months afterwards, depending on the patient's clinical status.

Primary and Secondary Analyses

The primary analysis concerned the proportion of patients with an initial response to adalimumab who demonstrated sustained clinical benefit of this treatment throughout their entire follow-up. Second, we examined the influence of immunogenicity on the efficacy of adalimumab by measuring adalimumab trough serum concentration and antibodies against adalimumab at predetermined time points and relating the data to loss of response, need for dose escalation, and discontinuation rate.

In the secondary analysis, we assessed the efficacy of adalimumab on fistula closure and on extraintestinal manifestations, analyzed the rate of severe adverse events (SAE), and looked at clinical factors influencing treatment outcome with special focus on concomitant medications.

Definitions

Short-term clinical response was defined as an improvement of symptoms of the disease at 4 and 12 weeks after the first injection as judged by the treating physician. Patients who became completely symptom-free were considered full responders. Patients who had clear clinical improvement with an obvious decrease of disease activity but who still had symptoms were considered partial responders. Patients who discontinued therapy by week 4 due to absence of clinical benefit were considered primary nonresponders. Improvement in fistulizing CD was defined as a $\geq 50\%$ decrease in the number of draining perianal fistulas from baseline during at least 2 consecutive treatment visits and remission as complete closure of all draining fistulas according to the treating physician's assessment.

Patients who reported lasting control of disease activity by the end of follow-up, regardless of the need for dose escalation, were considered to have sustained clinical benefit.

Patients with recurrent symptoms necessitating adalimumab dose escalation (standard intervention was adalimumab 40 mg every other week to 40 mg every week) were considered to have lost response; however, if they regained response and sustained it until the end of follow-up, they were considered to have sustained clinical benefit. The adalimumab dosing interval was decreased to once weekly in patients who presented with symptoms of active luminal disease that were dominant at baseline and were accompanied by an increase in C-reactive protein (CRP) level or endoscopic lesions. In patients predominantly treated for perianal fistulizing CD or for extraintestinal manifestations, these clinical conditions were used as indications for escalating from every other week to weekly therapy.

Biologic activity was assessed at baseline and 4 and 12 weeks after initiation of therapy, and biologic response was defined as a decrease in CRP level of at least 50% from baseline or normalization of CRP level (<3 mg/L).

SAE was defined as any adverse event that resulted in hospitalization, was fatal or life threatening, or led to significant disability.

All patients gave informed consent to participate in the study.

Measurement of Adalimumab Trough Serum Concentration and Antibodies Against Adalimumab

Blood samples were drawn at standardized time points just before injection of adalimumab (trough serum concentration). The trough serum concentration of adalimumab was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay derived from the one developed for infliximab.²¹ In brief, recombinant human TNF- α was coated on the solid phase and recognized by adalimumab, and the therapeutic monoclonal antibody was detected by an anti-human immunoglobulin G Fc γ -specific antibody conjugated to horseradish peroxidase. The limit of detection was 0.004 μ g/mL and the lower and upper limits of quantification were 0.1 and 4.8 μ g/mL, respectively. Sera exceeding the upper limit of quantification were diluted 1:10, with the coefficient of variation of this procedure being $<10\%$.

Serum concentrations of antibodies against adalimumab were analyzed using a double-antigen enzyme-linked immunosorbent assay based on their capture by adalimumab-coated plates and their detection by peroxidase-coupled adalimumab. Because of the interference of circulating adalimumab, antibodies against adalimumab could not be measured if the adalimumab concentration was >0.094 μ g/mL. The cutoff value (for false-positive antibodies against adalimumab), determined using untreated samples of patients with an autoimmune disease, was 0.128 μ g/mL (obtained from the 99th percentile). However, this applies to the first sample in each patient for which the interpretation cannot be based on adalimumab concentration. The trough serum concentration of adalimumab and antibodies against adalimumab were determined after the patients completed follow-up; the treating physician was unaware of these data.

Statistical Analysis

SPSS 15.0 software package (SPSS Inc, Chicago, IL) was used for performing all appropriate statistical analyses. Medians with interquartile range (IQR) or means with SD were calculated for continuous data, and percentages were computed for discrete data. The χ^2 test was used for comparison of categorical data, and odds ratios (OR) were provided where necessary. Differences between independent groups were traced with the use of Student t test for normally distributed values and the Mann-Whitney U test for nonnormally distributed val-

ues. For differences between dependent groups, the Wilcoxon signed rank test was used. The sustained clinical benefit of adalimumab was estimated by Kaplan-Meier analyses. To compare hazard rates in populations defined by one variable at the time, the log-rank test was used. Logistic and Cox proportional hazard models were conducted for the detection of predictors of clinical response to adalimumab treatment. A receiver operating characteristic analysis was performed for tracing an adalimumab trough serum concentration with an influence on sustained clinical benefit. $P < .05$ was considered significant.

Results

Patients and Induction Scheme Schedule

A total of 209 patients with inflammatory bowel disease initiated treatment with adalimumab between April 2003 and December 2007 at the IBD unit of the University Hospital of Leuven. Of these patients, 191 had CD and 168 of 191 had previously failed to respond to infliximab. Seventy-one of these 168 patients (42%) took part in clinical trials with adalimumab, but only time points when active drug was administered (assessed after unblinding) were taken into consideration. Long-term follow-up until the end of March 2008 was completed in all 168 patients with CD.

The main indication for initiation of adalimumab was luminal CD in 160 patients (95.2%), fistulizing CD in 2 patients, and arthritic manifestations in 6 patients. Before starting treatment with adalimumab, these patients had received a median (IQR) of 8.0 (4.0 – 14.2) infusions of infliximab for 29.3 (8.4 – 56.5) months. Adalimumab therapy was started within 5.0 (2.0 – 16.2) months after the last infliximab infusion. During infliximab treatment, 51% of the patients needed either dose escalation or shortening of the interval between infusions to maintain response. Fifty-five percent experienced at least one infusion reaction, either acute or delayed, and 32% stopped infliximab therapy because of intolerance. Loss of response was the cause for discontinuation in 68% of the patients. Patients' baseline characteristics are listed in Table 1.

A total of 126 of 168 patients (75%) received 160 mg adalimumab subcutaneously at week 0 and 80 mg at week 2 as an induction scheme. In 5 of 126 patients, luminal CD was quiescent at baseline and these patients were treated for perianal fistulizing CD ($n = 1$), persistent postoperative anastomotic enterocutaneous fistulas ($n = 1$), and arthritic manifestations ($n = 3$). The remainder ($n = 121$) had active luminal CD. Twenty-eight patients (16.7%) received 80/40 mg and 14 (8.3%) first received placebo in a clinical trial but were then treated with 40 mg subcutaneously every 2 weeks without a loading dose.

Table 1. Patients' Baseline Characteristics (n = 168)

Female/male (%)	120/48 (71.4/28.6)
Main indication for adalimumab treatment (%)	
Luminal CD	160 (95.2)
Fistulizing CD	2 (1.2)
Arthritic manifestations	6 (3.6)
Median (IQR) age at diagnosis (y)	22.8 (17.7–29.8)
Median (IQR) age at initiation of adalimumab therapy (y)	36.3 (27.3–47.1)
Median (IQR) disease duration before initiation of adalimumab therapy (y)	10.5 (5.7–17.2)
Median (IQR) follow-up of adalimumab treatment (mo)	20.3 (11.7–29.9)
Median (IQR) baseline CRP level (mg/L, n = 159)	14.1 (3.9–33.3)
Location of disease (%)	
Ileitis	37 (22)
Colitis	43 (26)
Ileocolitis	88 (52)
Upper gastrointestinal tract	7 (4.2)
Smokers (%)	69 (41)
Concomitant medication at initiation of adalimumab therapy (%)	
Corticosteroids	41 (24.4)
Azathioprine/6-mercaptopurine	41 (24.4)
Methotrexate	21 (12.5)
Indication for adalimumab treatment in relation to infliximab failure (%)	
Intolerance of infliximab	54 (32)
No response to infliximab	11 (6.5)
Loss of response to infliximab	97 (58)

Short-term Clinical Response of Luminal CD to Adalimumab

Overall, 105 patients (70.5%) in both induction scheme groups (n = 149) responded by week 4 and 100 (67.1%) by week 12. Forty-nine (40.4%) of the patients who received 160/80 mg showed a complete response, 35 (29%) a partial response, and 37 (30.6%) no clinical response by week 4. In the 80/40 mg group, 12 of 28

patients (43%) showed a complete response, 9 (32%) a partial response, and 7 (25%) no clinical response by week 4. By week 12, in patients who received 160/80 mg, a complete clinical response was present in 37 patients (30.6%), a partial response in 47 patients (38.8%), and no clinical response in 37 patients (30.6%). In the 80/40 mg group, 11 patients (39.3%) showed a complete response, 5 (17.9%) a partial response, and 12 (42.8%) no clinical response by week 12 (Figure 1A).

The majority of patients had an elevated CRP level at baseline (>3 mg/L, n = 130, 77.4%). The median CRP level at baseline was 14.1 (3.9–33.3) mg/L and decreased to 4.2 (1.1–11.3) mg/L by week 4 ($P < .0001$) and to 4.4

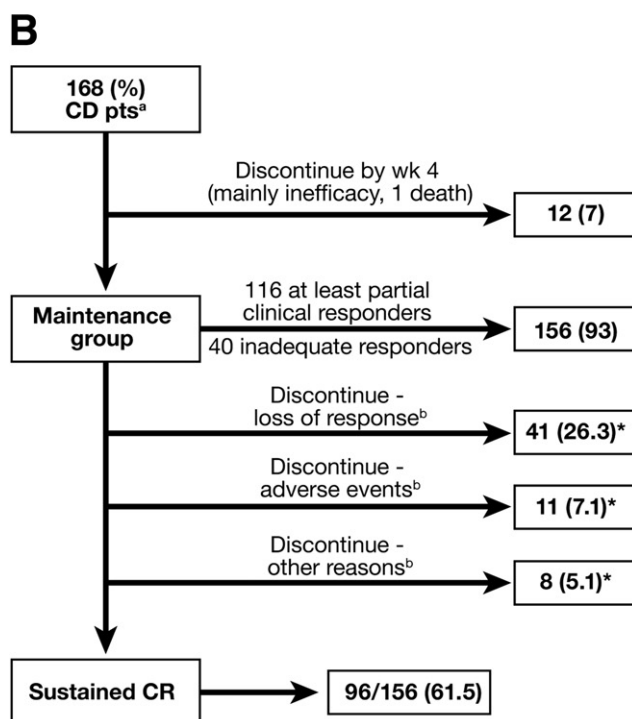
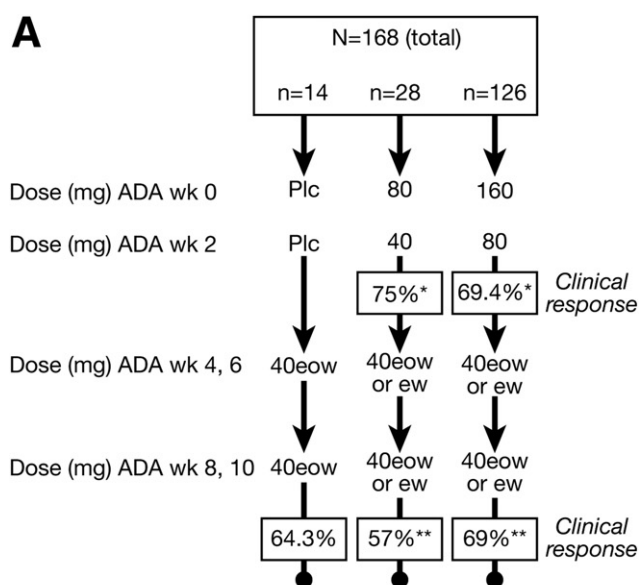


Figure 1. (A) Short-term outcome in 168 patients with CD treated with adalimumab who previously failed to respond to infliximab therapy. Fourteen patients received placebo as an induction scheme (weeks 0 and 2), 28 received 80/40 mg adalimumab, and 126 received 160/80 mg. Subsequently, all patients received adalimumab either 40 mg every other week or 40 mg every week. No significant difference was observed in clinical response between the 2 arms that received active drug as induction scheme both at week 4 ($*P = .57$) and week 12 ($**P = .23$). (B) Long-term outcome of adalimumab therapy. The initial cohort comprised 168 patients with CD. Twelve patients (7%) discontinued treatment by week 4 mainly due to inefficacy. A total of 156 patients (93%) entered the maintenance phase; from these patients, 60 (38.5%) discontinued adalimumab therapy (*) due to loss of response (26.3%), adverse events (7.1%), and other reasons described in the text (5.1%). Ninety-six patients (61.5%) demonstrated sustained clinical response until the end of follow-up. ^aMedian follow-up period, 20.4 (11.7–30.0) months. ^bMedian treatment duration if adalimumab stopped, 29.3 [8.7–52.8] weeks. ADA, adalimumab; CR, clinical response; eow, every other week; ew, every week; plc, placebo; pts, patients.

(1.3–18.9) mg/L by week 12 ($P < .0001$). Ninety-one of 121 patients (75.2%) showed a biologic response to adalimumab at week 4, and CRP decreased to normal values in 39 patients (32.2%). At week 12, 64 of 94 patients (68.1%) responded biologically, with 33 patients (35.1%) showing a normalization of CRP level. Clinical and biologic response correlated well at both time points ($P = .006$).

Long-term Clinical Benefit and Discontinuation of Adalimumab Treatment

Of the 168 patients included in this analysis, 12 (7%) discontinued adalimumab by week 4 due to primary nonresponse ($n = 10$), adverse events ($n = 1$, intense injection site reaction and acne), and a fatal event ($n = 1$, cardiac arrest of unknown origin). Half of these patients showing primary nonresponse underwent early bowel resection, and the others were rescued with corticosteroids (Figure 1B).

A total of 156 patients (93%) continued adalimumab after week 4, of whom 116 (74.4%) had at least a partial clinical response. In 40 patients (25.6%), therapy was continued beyond week 4, although response was considered unsatisfactory, in an effort to achieve a delayed response. Thirty-two of these inadequate responders (80%) received 40 mg adalimumab weekly after induction and 20 of 32 (62.5%) responded. Of the 116 responders at week 4, 70 (60.3%) needed dose escalation and 53 of 70 (75.7%) regained clinical response. In total, 102 patients (65.4%) had a dose escalation, of whom 73 (71.6%) responded. Median time to dose escalation was 14.0 (10.7–24.0) weeks. In particular, the probability of dose escalation was approximately 15% at 30 weeks, 42% at 60 weeks, and 80% at 120 weeks of adalimumab treatment (Figure 2A). No difference was observed in the rate of or time to dose escalation between the patients who received 160/80 mg and those who received 80/40 mg.

At the end of follow-up, 96 of 156 patients (61.5%) showed sustained clinical benefit to adalimumab therapy (Figure 1B). The probability of a patient sustaining clinical benefit was approximately 60% at 60 weeks, 50% at 120 weeks, and 38% at 180 weeks (Figure 2B). Sixty out of 156 patients (38.5%) discontinued adalimumab because of loss of response ($n = 41$; 26.3%), adverse events ($n = 11$; 7.1%), or other reasons ($n = 8$; 5.1%) (Figure 1B). The probability of a patient ceasing treatment was 40% at 60 weeks, 50% at 120 weeks, and 62% at 180 weeks (Figure 2B). Discontinuation of adalimumab treatment occurred after a median of 29.4 (8.7–52.8) weeks.

At baseline, 62 patients (37%) were receiving concomitant immunomodulators. The latter was stopped in 29 patients (46.8%) after 10.6 (6.8–18.2) months. Forty-one patients (24.4%) received corticosteroids at baseline and 21 (51.2%) could definitively stop them after 3.0 (0.7–3.6) months.

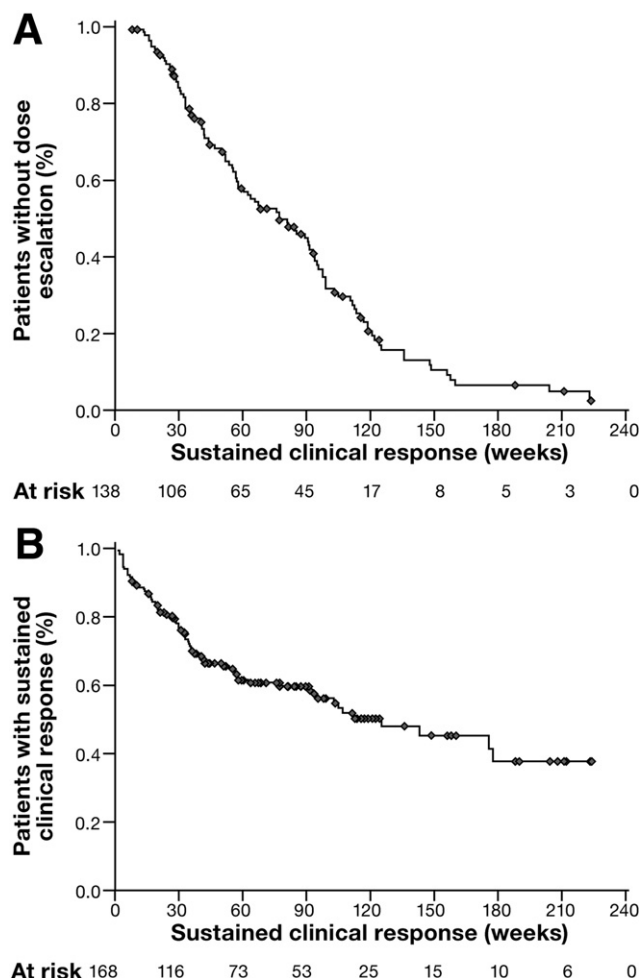
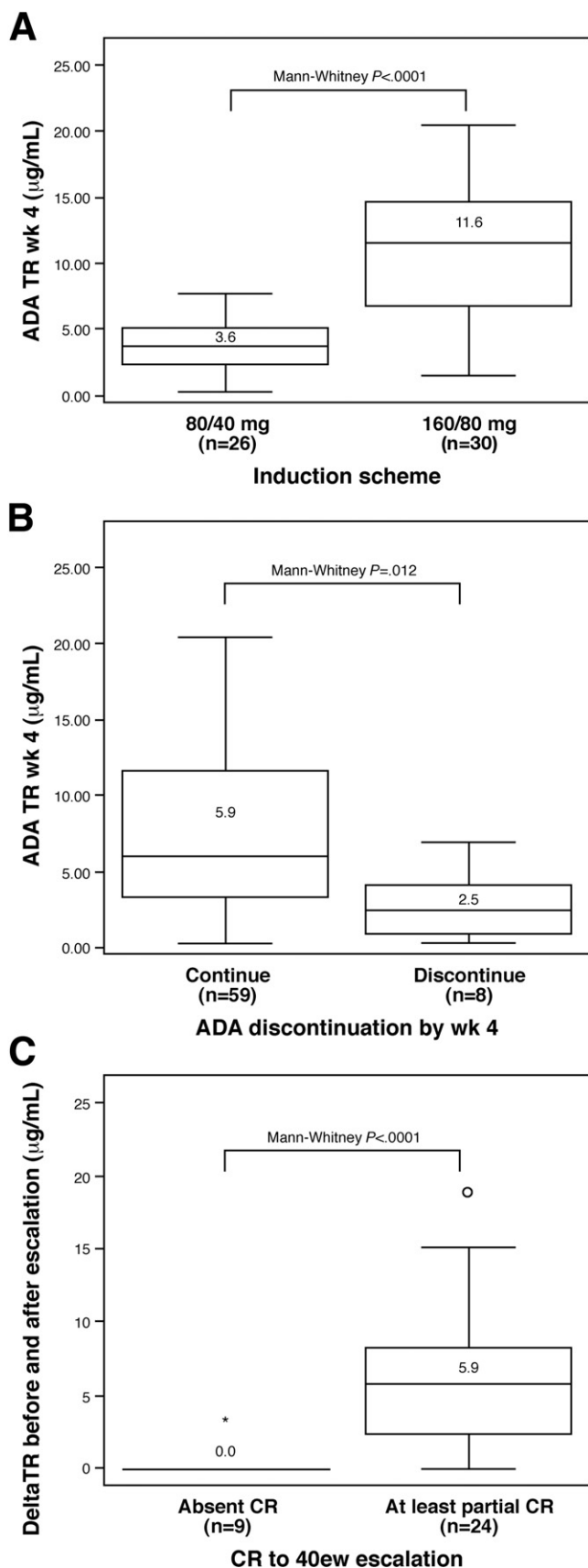


Figure 2. (A) Sustained clinical benefit of adalimumab in the patients of the maintenance group according to dose escalation. The curve represents the proportion of patients with sustained clinical benefit who did not experience an escalation of dose during follow-up. *At risk* represents the patients who continued treatment demonstrating a sustained clinical response at given time points, considering those with available data on dose escalation as the initial cohort ($n = 138$). (B) Sustained clinical benefit of adalimumab in the overall cohort. The curve represents the proportion of patients with a sustained clinical response during follow-up. *At risk* represents the patients who continued treatment demonstrating a sustained clinical response at given time points, considering as initial cohort the study population ($n = 168$).

Relationship Between Trough Serum Concentration and Antibodies Against Adalimumab and Short-term Outcome

Adalimumab trough serum concentration and antibodies against adalimumab were available in 130 patients (77.4% of the total cohort). Seventy-six percent received 160/80 mg as an induction dose, 65% responded on a short-term basis, 65% needed dose escalation, and 37% received immunomodulators at baseline. Median trough serum concentration was 8.6 (6.5–10.8) $\mu\text{g/mL}$, 5.3 (2.8–10.9) $\mu\text{g/mL}$, 7.9 (3.2–12.0) $\mu\text{g/mL}$, 7.8 (1.8–12.2) $\mu\text{g/mL}$, and 10.7 (6.1–18.1) $\mu\text{g/mL}$ at weeks 2, 4, 12, 24, and 54, respectively. In comparison with patients who



received 80/40 mg, those who received 160/80 mg as a loading dose showed higher adalimumab trough serum concentration at week 4 ($P < .0001$; Figure 3A) and a higher rate of CRP normalization (OR, 3.9 [1.1–14.4]; $P = .04$) but also more frequent (OR for discontinuation, 0.3 [0.1–0.7]; $P = .004$) and longer sustained clinical benefit (31.8 [15.3–41.9] vs 12.0 [4.0–38.2] weeks; $P = .04$), less frequent primary nonresponse (OR, 0.02 [0.003–0.2]; $P < .0001$), and faster withdrawal of immunomodulators (8.9 [3.7–12.0] vs 22.8 [10.0–33.2] months; $P = .01$). Patients in the 160/80 mg induction scheme developed numerically less frequently antibodies against adalimumab, but this was not statistically significant (5.7% vs 17.9%; $P = .05$).

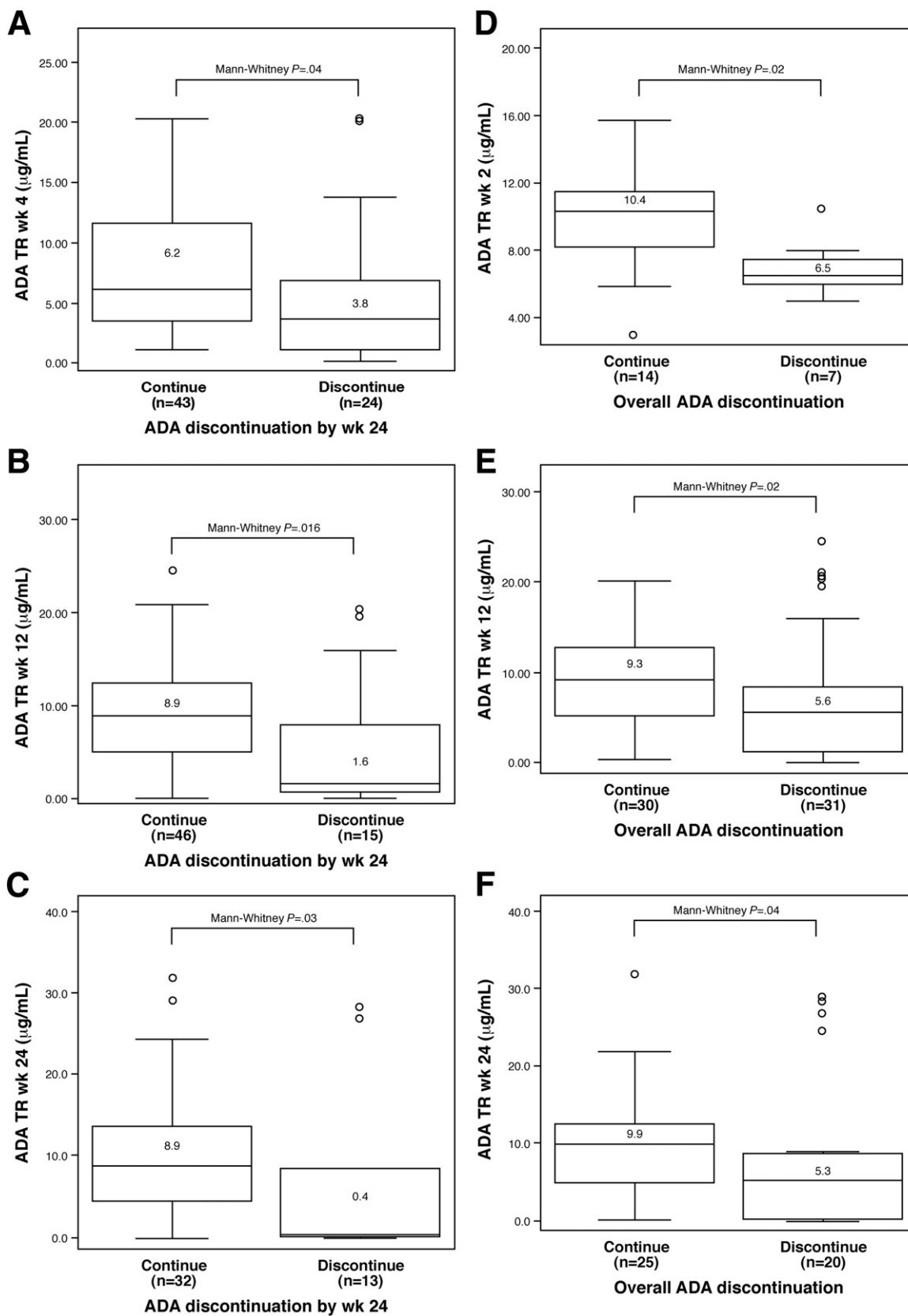
No relationship was found between adalimumab trough serum concentration or antibodies against adalimumab and short-term clinical response, although patients who discontinued adalimumab by week 4 had lower trough serum concentration compared to those who continued throughout maintenance treatment ($P = .012$; Figure 3B).

In our multivariate analysis, no predictors for short-term clinical response were detected.

Relationship Between Trough Serum Concentration and Antibodies Against Adalimumab and Long-term Outcome

Patients who lost response received dose escalation. Adalimumab trough serum concentration increased after dose escalation from 4.8 (2.3–8.9) to 9.4 (1.2–16.4) $\mu\text{g/mL}$ ($P = .001$), and this increase correlated well with the clinical response to escalation (5.9 [1.9–8.3] for responders vs 0.0 [0.0–1.7] $\mu\text{g/mL}$ for nonresponders, $P < .0001$, Figure 3C). The median trough serum concentration at the time of discontinuation in the 59 patients (45.4%) who stopped therapy was 3.2 (0.3–11.7) $\mu\text{g/mL}$. The patients who discontinued adalimumab by 6 months of treatment demonstrated lower trough serum concentration throughout this respective period of follow-up compared to those who could continue therapy beyond

Figure 3. Influence of induction schedule on (A) median (IQR) adalimumab trough serum concentration (for 160/80 mg: 11.6 [6.7–14.7] vs 3.6 [2.3–5.2] $\mu\text{g/mL}$ for 80/40 mg; $P < .0001$), (B) the relationship between therapy discontinuation by week 4 and median adalimumab trough serum concentration (for discontinuation: 2.5 [0.8–4.3] vs 5.9 [3.2–11.9] $\mu\text{g/mL}$ for continuation; $P = .012$), and (C) the relationship between increase of median adalimumab trough serum concentration and clinical response to dose escalation (for responders: 5.9 [1.9–8.3] vs 0.0 [0.0–1.7] $\mu\text{g/mL}$ for nonresponders; $P < .0001$). Mann-Whitney tests; the asterisk and small circle represent mild outliers; the upper and lower whiskers indicate the distance from the end of the box to the largest and smallest observed values that are less than 1.5 box lengths from either end of the box; the top and bottom of the box indicate the 75th and 25th percentiles, respectively; and the band near the middle of the box indicates the 50th percentile. ADA, adalimumab; CR, clinical response; ew, every week; TR, trough serum concentration.



24 weeks (Figure 4A–C). A similar difference was also apparent between the patients who stopped adalimumab by the end of follow-up and those who still had a sustained clinical benefit by that time (Figure 4D–F). In 67 patients, adalimumab trough serum concentration was available 4 weeks after initiation of therapy. From these patients, those who developed antibodies against adalimumab by the end of follow-up ($n = 9$) demonstrated a lower median adalimumab trough serum concentration at week 4 than those who never developed measurable antibodies against adalimumab ($n = 58$) (2.1 [0.8–4.1] vs 6.1 [3.2–11.5] $\mu\text{g/mL}$; $P < .02$; Figure 5). Patients who displayed an adalimumab trough serum concentration $<0.33 \mu\text{g/mL}$ at least once (sensitivity, 95%; positive predictive value, 81%) demonstrated significantly less sustained clinical benefit than patients never showing such low trough serum concentration (log-rank test; $P = .01$; Figure 6A).

Twelve patients had a trough serum concentration $<0.094 \mu\text{g/mL}$ at least once. Eleven of them (91.6%) discontinued adalimumab therapy and all 11 displayed antibodies against adalimumab, while the discontinuation rate in patients with trough serum concentration persistently $>0.094 \mu\text{g/mL}$ was 40.7% (OR, 16.0 [2.0–128.4]; $P = .001$). The patients with antibodies against adalimumab had lower median trough serum concentration throughout the entire follow-up period ($P < .0001$; Figure 5) independently of the time point that antibodies against adalimumab were detected.

Concomitant immunomodulator therapy at baseline did not affect treatment outcome (log-rank test; $P = .45$; Figure 6B), did not influence adalimumab trough serum concentration, and did not decrease the development of antibodies against adalimumab. Only time to dose escalation was longer in patients who were treated with immunomodulators (17.0 [12.0–27.5] vs 12.0 [8.0–22.0] weeks; $P = .008$). There was also no correlation between sustained clinical benefit and concomitant corticosteroid therapy at baseline (log-rank test; $P = .2$; Figure 6C). The patients who had normalized CRP levels at both week 4 and week 12 discontinued adalimumab less frequently (OR for week 4, 0.2 [0.1–0.6]; $P = .001$) and showed longer sustained clinical benefit (log-rank test for week 4, $P = .008$; Figure 6D). The presence of an adverse event or injection site reaction was not related to the presence of

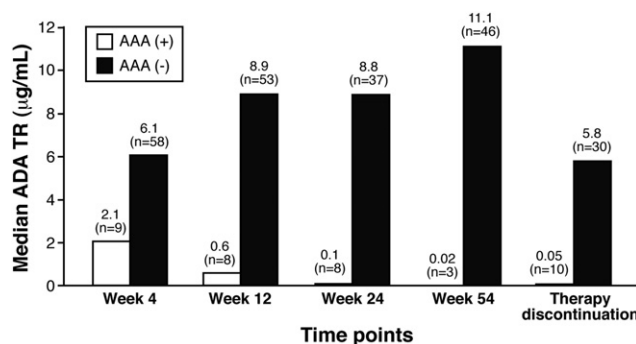


Figure 5. Relationship between antibodies against adalimumab and adalimumab trough serum concentration in different time points. AAA, antibodies against adalimumab; ADA, adalimumab; TR, trough serum concentration.

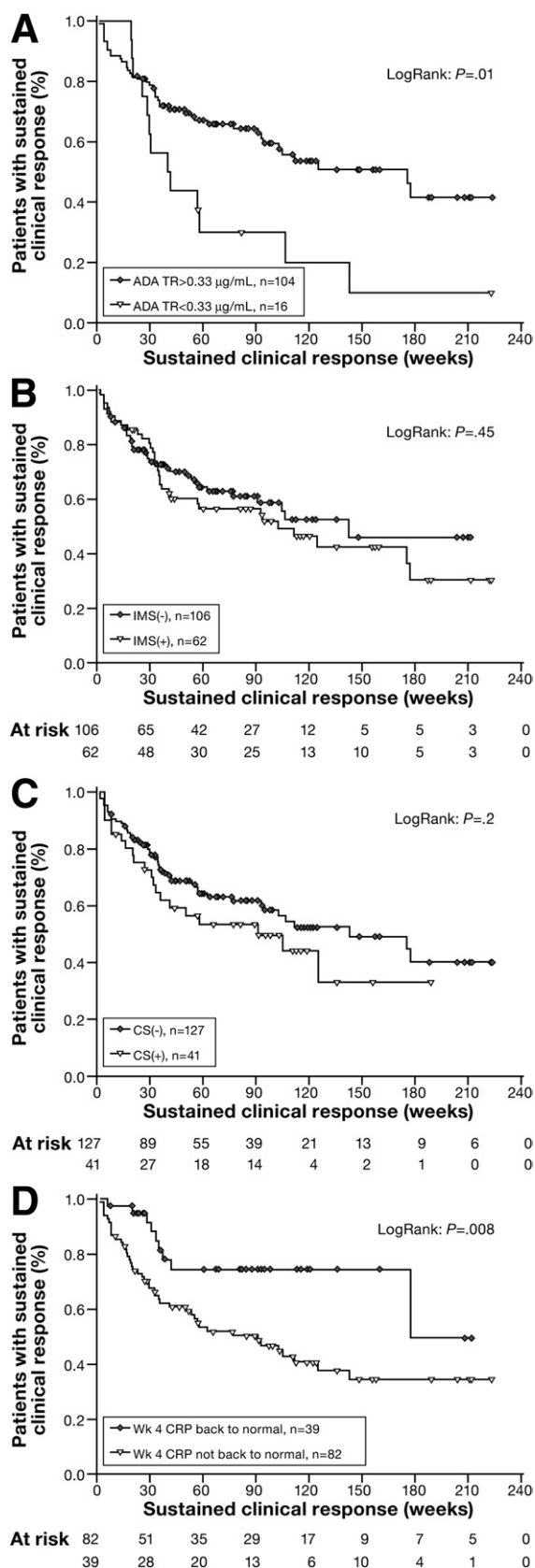
antibodies against adalimumab. Clinical response was not influenced by the reason that led to therapy discontinuation. In the Cox regression analysis, no predictors for sustained clinical benefit turned out to be significant.

Antibodies against adalimumab were detected at any time in 12 patients (9.2%). The first positive sample was detected after 22.5 (13.0–39.5) weeks. In the majority of the patients who developed antibodies against adalimumab (10 of 12), these were still present at the time of therapy discontinuation. Finally, we revisited antibodies to infliximab status in 121 of 130 patients (93.1%) for whom antibodies against adalimumab and adalimumab trough serum concentration were measured. Of these 121 patients, 8 were indeterminate for antibodies to infliximab (due to circulating levels of infliximab at the time of assessment). Therefore, 113 patients were analyzed. The presence of antibodies to infliximab before initiation of adalimumab therapy was not associated with a higher incidence of antibodies against adalimumab (6 of 12 antibodies against adalimumab–positive patients were also antibodies to infliximab positive and 6 of 12 were antibodies to infliximab negative), with discontinuation of adalimumab therapy, or with the need for dose escalation (data not shown).

Adalimumab Treatment and Fistula Closure

At baseline, 19 of 32 patients with perianal CD lesions (59.4%) presented with actively draining fistulas. In 12 of 19 patients (63.1%), improvement in fistula

Figure 4. Comparison of median (IQR) adalimumab trough serum concentration at (A) week 4 (for discontinuation: 3.8 [1.1–6.9] vs 6.2 [3.5–11.9] $\mu\text{g/mL}$ for continuation; $P = .04$), (B) week 12 (for discontinuation: 1.6 [0.3–8.0] vs 8.9 [4.9–12.6] $\mu\text{g/mL}$ for continuation; $P = .016$), and (C) week 24 (for discontinuation: 0.4 [0.1–8.4] vs 8.9 [4.4–14.2] $\mu\text{g/mL}$ for continuation; $P = .03$) of the patients who discontinued therapy by month 6 and those who continued treatment beyond that point and at (D) week 2 (for discontinuation: 6.5 [5.6–8.0] vs 10.4 [7.9–11.5] $\mu\text{g/mL}$ for continuation; $P = .02$), (E) week 12 (for discontinuation: 5.6 [1.1–8.9] vs 9.3 [5.2–12.9] $\mu\text{g/mL}$ for continuation; $P = .02$), and (F) week 24 (for discontinuation: 5.3 [0.1–8.8] vs 9.9 [4.8–13.6] $\mu\text{g/mL}$ for continuation; $P = .04$) of the patients who discontinued therapy and those who sustained clinical benefit by the end of follow-up. Mann–Whitney tests; small circles represent mild or extreme outliers; the upper and lower whiskers indicate the distance from the end of the box to the largest and smallest observed values that are less than 1.5 box lengths from either end of the box; the top and bottom of the box indicate the 75th and 25th percentiles, respectively; and the band near the middle of the box indicates the 50th percentile. ADA, adalimumab; TR, trough serum concentration.



drainage was observed with complete response in 52.6% (mean $\pm$ SD) time to fistula closure, 16.2 ± 11.7 weeks). Three patients experienced a relapse after 38.0 ± 47.1 weeks. One of these patients escalated to 40 mg every week and responded. From the patients showing initial response, 3 discontinued adalimumab therapy after 58.7 ± 38.3 weeks. In total, 11 patients (58%) were still being treated with adalimumab by the end of follow-up. One patient who was treated for enterocutaneous fistulas did not respond.

Short-term Clinical Response of Extraintestinal Manifestations to Adalimumab

Seventy-three patients (43.5%) presented with at least one extraintestinal manifestation at baseline (81% female patients). The majority (70 of 73 [96%]) had arthritic manifestations (68 peripheral arthralgias, 5 ankylosing spondylitis, and 1 sacroiliitis), 4 (5.5%) had ocular manifestations (3 uveitis, 1 episcleritis), and 3 (4%) had skin extraintestinal manifestations (1 erythema nodosum, 1 pyoderma gangrenosum, and 1 Sweet syndrome). At week 4, 23 patients (31.5%) showed a complete response, 24 (33%) had a partial response, and 26 (35.5%) had no clinical response. At week 12, 30 (41%) showed a

Figure 6. (A) Sustained clinical benefit stratified by adalimumab trough serum concentration of 0.33 µg/mL (sensitivity, 95%; positive predictive value, 81%). Filled diamonds and open triangles indicate patients with adalimumab levels greater than and less than 0.33 µg/mL, respectively, who discontinued treatment throughout follow-up. The curves indicate the proportion of patients in each group with a sustained clinical response during follow-up. Log-rank test was used to compare hazard rates between the 2 groups. (B) Sustained clinical benefit stratified by concomitant therapy with immunomodulators. Filled diamonds and open triangles indicate patients without and with immunomodulator therapy at baseline, respectively, who discontinued treatment throughout follow-up. The curves indicate the proportion of patients in each group with sustained clinical response during follow-up. Log-rank test was used to compare hazard rates between the 2 groups. At risk indicates patients who continued treatment in either group at given time points while demonstrating sustained clinical response. (C) Sustained clinical benefit stratified by concomitant use of corticosteroids. Filled diamonds and open triangles indicate patients without and with corticosteroid therapy at baseline, respectively, who discontinued treatment throughout follow-up. The curves indicate the proportion of patients with a sustained clinical response during follow-up. Log-rank test was used to compare hazard rates between the 2 groups. At risk indicates patients who continued treatment in either group at given time points while demonstrating a sustained clinical response. (D) Sustained clinical benefit stratified by normalization of CRP levels by week 4 in patients with an increased baseline CRP level. Filled diamonds and open triangles indicate patients with and without CRP normalization, respectively, who discontinued treatment throughout follow-up. The curves indicate the proportion of patients with sustained clinical response during follow-up. Log-rank test was used to compare hazard rates between the 2 groups. At risk indicates patients who continued treatment in either group at given time points while demonstrating a sustained clinical response. ADA, adalimumab; CS, corticosteroids; IMS, immunomodulator; TR, trough serum concentration.

Table 2. SAEs

Gender/age (y)	Duration of adalimumab treatment until event (wk)	No. of infliximab infusions (treatment duration, mo)	Immunomodulators	Event category	Event
M/44	2	11 (18)	Null	Fatal	Death (cardiac arrest of unknown origin)
F/64 ^a	166	1 (0)	Azathioprine	Fatal	Death (lung cancer-chemotherapy-sepsis)
M/30	33	23 (69)	Null	Malignancy	Intraperitoneal B large cell lymphoma
F/41	69	14 (19)	Methotrexate	Malignancy	Ductal breast cancer in situ (cT2N2M0)
M/55	6	30 (57)	Null	Malignancy	Clear cell renal carcinoma (pT1bNOM0)
F/43	178	6 (11)	Null	Malignancy	Papillary renal cell carcinoma (pT1aNOM0)
F/49 ^b	91	45 (47)	Null	Malignancy	Basal cell carcinoma
F/51 ^b	178	45 (47)	Null	Malignancy	Basal cell carcinoma
F/54	76	4 (25)	Null	Benign tumor	Meningioma (grade I)
F/62 ^a	92	1 (0)	Azathioprine	Benign tumor	Bowen skin tumor
F/29	3	Unknown	Null	Infectious	<i>Campylobacter enteritis/Pseudomonas cystitis</i>
F/44	21	27 (47)	Azathioprine	Infectious	Pneumonia
F/49	18	8 (25)	6-Mercaptopurine	Infectious	Fever of unknown origin
F/24	31	6 (8)	Null	Infectious	Esophageal moniliasis
F/27	55	37 (66)	Null	Infectious	Streptococcal pneumonia
F/51	58	11 (59)	Methotrexate	Infectious	Upper respiratory tract infection
F/22	25	41 (69)	Azathioprine	Infectious	Pleuritis
M/42	6	4 (4)	Null	Infectious	Multifocal pneumonia
F/56	20	1 (0)	Null	Infectious	Pneumonia
F/38	144	9 (13)	Null	Various	Elective abortion (week 12; trisomy 18)
F/34	29	4 (57)	Null	Various	Empty amniotic sac pregnancy
F/47	88	5 (21)	Null	Various	Suicide attempt

^aSame patient.^bSame patient.

complete response, 15 (20.5%) had a partial response, and 28 (38.5%) had no clinical response. Clinical response did not depend on the induction scheme (160/80 mg or 80/40 mg) used but correlated well with the clinical response to luminal CD at both week 4 and week 12 (OR for week 4, 12.5 [3.7–42.3]; $P < .0001$). From the patients showing an initial response, 36% discontinued adalimumab after a median of 41.7 (29.0–92.0) weeks mainly due to loss of response.

Safety

A total of 22 SAEs occurred in 20 patients (12%) during follow-up of adalimumab treatment (Table 2). Before the initiation of adalimumab therapy, these patients had been treated with a median of 9.0 (4.5–25.0) infusions of infliximab for 25.0 (12.0–57.0) months. The 2 fatal events were considered unrelated to adalimumab therapy. Seven of these 20 patients were being treated with concomitant immunomodulators while SAEs occurred. No difference was detected regarding rate and kind of SAEs between the patients who were and were not being treated with immunomodulators. Thirty-two patients (19%) experienced an injection site reaction. All events occurred while patients were being treated with adalimumab. No cases of opportunistic infections, demyelinating disease, or congestive heart failure occurred.

The adverse events that led to therapy discontinuation were intense injection site reaction ($n = 1$), delayed hy-

persensitivity reaction ($n = 1$), excessive fatigue, nausea, productive cough, pruritus, urticaria, emerged extensive psoriasis and lupus-like syndrome, or SAEs including diagnosis of various tumors ($n = 5$; Table 2). Other causes for discontinuation were pregnancy in 2 patients, operated inactive stricturing CD in 2, definite inadequate response in 3 (discontinued therapy between week 4 and week 12 from baseline), and self-cessation of treatment while in remission in 1.

Discussion

Adalimumab, a recombinant fully human immunoglobulin G1 monoclonal antibody, was introduced for the treatment of patients with moderate to severe CD who were either naive to infliximab therapy or who previously failed to respond to infliximab therapy.^{14–17} The GAIN study showed efficacy in patients who had already been treated with infliximab, although adalimumab seemed less efficacious in these patients than in patients who had never been treated with infliximab.¹⁷ Open-label studies reported a short-term clinical response up to 67% and a discontinuation rate between 25% and 30%. These studies either did not exceed 1 year or comprised small size cohorts. Also, only limited results were presented and not all patients treated were followed up on a long-term basis.^{22–25} Although human antibodies like adalimumab are considered less immunogenic, the CLASSIC II study described

2%–4% of antibodies against adalimumab,¹⁶ but their influence on clinical outcome has not yet been studied.

The present study assessed the long-term efficacy and safety of treatment with adalimumab in a large cohort of patients with CD who failed to respond to infliximab therapy and evaluated the influence of adalimumab trough serum concentration and antibodies against adalimumab on clinical response and discontinuation rate. Overall, sustained clinical benefit (defined as having symptom control and ongoing adalimumab maintenance therapy at the end of follow-up) was observed in 61.5% during a median follow-up of 20 months (50% at 120 weeks and 38% at 180 weeks). Escalation to 40 mg every week was needed in 65.4% of patients. Antibodies against adalimumab were detected in 9.2%. Adalimumab trough serum concentration was lower throughout the entire follow-up period in patients who discontinued therapy and was affected by the presence of antibodies against adalimumab. SAEs occurred in 12% of patients.

Sustained clinical benefit was satisfactory not only during 1 year as in the published studies^{15,16,22,23} but also during a median follow-up of 20 months, especially taking into account the disease characteristics of our patients. Almost two thirds of the initial responders to adalimumab in our cohort (61.5%) maintained benefit until the end of their follow-up. However, 50% of the patients followed up for 120 weeks or more lost clinical benefit and 80% needed dose escalation. The efficacy of adalimumab therapy was similar for luminal and fistulizing CD and also for the extraintestinal manifestations. A corticosteroid-sparing effect was seen in 51% of our patients. Baseline characteristics such as concomitant immunomodulator therapy, location or duration of the disease, and prior reason for stopping infliximab treatment did not influence outcome. The major limitation of a cohort study including patients treated in clinical practice is the absence of response criteria based on clinical scores such as Crohn's Disease Activity Index. However, patients with ongoing symptoms despite dose escalation were discontinued from further adalimumab therapy, and therefore discontinuation of adalimumab probably most accurately reflects complete loss of response to adalimumab in this study.

Two thirds of the patients entering maintenance therapy escalated to 40 mg every week. The probability of a patient escalating the dose was comparable with what is described in the placebo-controlled trials (27% in CHARM,¹⁵ 46% in CLASSIC II¹⁶) for the first year of follow-up but increased significantly during the second year, probably because all our patients had previously failed to respond to infliximab. The clinical response to dose escalation was, however, very good (71.6%).

The short-term clinical response rate was higher than that described in placebo-controlled studies (58% in CHARM,¹⁵ 30% in CLASSIC,^{14,16} and 38% in GAIN¹⁷), probably due to differences in definitions used for clinical

response (physician's evaluation versus use of the Crohn's Disease Activity Index). In the present study, we investigated specifically the relationship between adalimumab trough serum concentration and treatment outcome and between the formation of antibodies against adalimumab and trough serum concentration. Early discontinuation of therapy correlated with lower adalimumab trough serum concentration. The use of 160/80 mg as an induction scheme was superior in terms of discontinuation rate and time compared with 80/40 mg, and this correlated with higher trough serum concentration. In 25.6% of our patients entering the maintenance phase, clinical response had been unsatisfactory by week 4, but these patients did respond by week 12. In this cohort study, we did not intend to analyze optimal adalimumab induction regimens in patients previously failing to respond to infliximab, but our data do indicate that early dose escalation to 40 mg every week in patients with absence of response at week 4 is a strategy that recruits a significant number of late responders.

Long-term treatment discontinuation of adalimumab was related to lower trough serum concentration, although there was no direct relationship between short-term efficacy and trough serum concentration. We observed that in patients who had a trough serum concentration $<0.33 \mu\text{g/mL}$ at least once, sustained clinical benefit was significantly decreased; however, given the limited size of this specific population (16 patients), these data should be interpreted with caution. In this study, the rate of antibodies against adalimumab positivity was higher than what has been described in previous adalimumab studies.¹⁶ These discrepancies probably reflect differences in the study populations, the assays used for the measurements, and of course the different dose regimens.

The patients who developed antibodies against adalimumab in our cohort had more frequently low trough serum concentration. Interestingly, in 92% of the patients with a trough serum concentration measured below the threshold for detection of antibodies against adalimumab ($0.094 \mu\text{g/mL}$) at least once, antibodies against adalimumab were detected, showing that antibodies against adalimumab led to more rapid elimination of adalimumab (low trough serum concentration) and to treatment discontinuation. In the majority of patients who lost clinical benefit, adalimumab trough serum concentration was still above the limit of detection of our assay at the time of the last assessment. Therefore, these patients were indeterminate for antibodies against adalimumab and we were unable to ascertain the association between antibodies against adalimumab and loss of clinical benefit. In our study, concomitant immunomodulator therapy did not influence treatment outcome.

The proportion of patients who had to discontinue treatment because of injection site reactions was very low,

and this is most likely due to the “human” nature of adalimumab and the administration route. The presence of concomitant immunomodulators but also of antibodies against adalimumab did not influence these events. Although injection site reactions occurred in one fifth of our patients, only 2 patients discontinued adalimumab treatment. In previous studies reporting long-term follow-up in patients treated at a single center with infliximab, the rate of SAEs ranged from 8.6% to 18.9%, depending on the definitions used for SAEs.^{26–28} The rate reported here falls within this range, although all patients had already been exposed for a long time to infliximab.

In conclusion, this long-term observational study showed that up to 70% of patients with CD who present with secondary failure to infliximab demonstrate a response to adalimumab, with 61.5% maintaining clinical benefit during a median follow-up of almost 2 years. Low trough serum concentration of adalimumab is associated with increased early and late discontinuation rates, although there is no direct relationship between trough serum concentration and short-term efficacy of treatment. The added value of tailoring adalimumab maintenance therapy in individual patients based on adalimumab trough serum concentration should be studied in a prospective controlled trial. The great majority of patients with undetectable trough serum concentration also display antibodies against adalimumab. These antibodies were detected in 9.2% of our patients. Concomitant immunomodulator therapy at baseline did not affect treatment outcome, did not influence adalimumab trough serum concentration, did not decrease the development of antibodies against adalimumab, and had no negative impact on SAEs. Hence, we believe that adalimumab can be used as monotherapy, which would increase the safety of this treatment.

References

- Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690–697.
- Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 2007;369:1641–1657.
- Papadakis KA, Targan SR. Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology* 2000;119:1148–1157.
- Targan SR, Hanauer SB, Van Deventer SJ, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* 1997;337:1029–1035.
- Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomized trial. *Lancet* 2002;359:1541–1549.
- Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, et al. Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004;350:876–885.
- Schnitzler F, Fidler H, Ferrante M, et al. Long-term outcome of treatment with infliximab in 614 Crohn's disease patients: results from a single center cohort. *Gut* 2009;58:492–500.
- Van Assche G, Magdelaine-Beuzelin C, D'Haens G, et al. Withdrawal of immunosuppression in Crohn's disease treated with scheduled infliximab maintenance: a randomized trial. *Gastroenterology* 2008;134:1861–1868.
- Farrell RJ, Alsahli M, Jeen YT, et al. Intravenous hydrocortisone premedication reduces antibodies to infliximab in Crohn's disease: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2003;124:917–924.
- Baert F, Noman M, Vermeire S, et al. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med* 2003;348:601–608.
- Hanauer SB, Wagner CL, Bala M, et al. Incidence and importance of antibody responses to infliximab after maintenance or episodic treatment in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2:542–553.
- St Clair EW, Wagner CL, Fasanmade AA, et al. The relationship of serum infliximab concentrations to clinical improvement in rheumatoid arthritis: results from ATTRACT, a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2002;46:1451–1459.
- Maser EA, Vilella R, Silverberg MS, et al. Association of trough serum infliximab to clinical outcome after scheduled maintenance treatment for Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:1248–1254.
- Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, et al. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology* 2006;130:323–333.
- Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P, et al. Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial. *Gastroenterology* 2007;132:52–65.
- Sandborn WJ, Hanauer SB, Rutgeerts P, et al. Adalimumab for maintenance treatment of Crohn's disease: results of the CLASSIC II trial. *Gut* 2007;56:1232–1239.
- Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, et al. Adalimumab induction therapy for Crohn's disease previously treated with infliximab. *Ann Intern Med* 2007;146:829–838.
- Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, et al. Clinical response to adalimumab: relationship to anti-adalimumab antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:921–926.
- West RL, Zelinkova Z, Wolbink GJ, et al. Immunogenicity negatively influences the outcome of adalimumab treatment in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;28:1122–1126.
- Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a working party of the 2005 Montreal world congress of gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005;19(Suppl A):5A–36A.
- Ternant D, Mulleman D, Degenne D, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of infliximab. *Ther Drug Monit* 2006;28:169–174.
- Hinojosa J, Gomollon F, Garcia S, et al. Efficacy and safety of short-term adalimumab treatment in patients with active Crohn's disease who lost response or showed intolerance to infliximab: a prospective, open-label, multicentre trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:409–418.
- Peyrin-Biroulet L, Lacroix C, Bigard MA. Adalimumab maintenance therapy for Crohn's disease with intolerance or lost response to infliximab: an open-label therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:675–680.

24. Seiderer J, Brand S, Dambacher J, et al. Adalimumab in patients with Crohn's disease-safety and efficacy in an open-label single centre study. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:787-796.
25. Ho GT, Smith L, Aitken S, et al. The use of adalimumab in the management of refractory Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:308-315.
26. Colombel JF, Loftus EV, Tremaine WJ, et al. The safety profile of infliximab in patients with Crohn's disease: the Mayo clinic experience in 500 patients. *Gastroenterology* 2004;126:19-31.
27. Ljung T, Karlen P, Schmidt D, et al. Infliximab in inflammatory bowel disease: clinical outcome in a population based cohort from Stockholm County. *Gut* 2004;53:849-853.
28. Fidder HH, Schnitzler F, Ferrante M, et al. Long-term safety of infliximab for the treatment of inflammatory bowel disease: a single-center cohort study. *Gut* 2009;58:501-508.

Received October 13, 2008. Accepted July 23, 2009.

Reprint requests

Address requests for reprints to: Paul Rutgeerts, MD, PhD,
Department of Gastroenterology, University Hospital Gasthuisberg,

Herestraat 49, B-3000, Leuven, Belgium. e-mail: paul.rutgeerts@uz.kuleuven.be; fax: (32) 16 34 44 19.

Conflicts of interest

The authors disclose the following: Dr Paintaud is on an advisory committee for Roche, has a research contract with Innate Pharma, is a consultant for LFB, and receives a speaker fee from Pierre Fabre; Dr Van Assche receives a speaker fee/research support from Centocor, Schering-Plough, Abbott, and UCB; Dr Vermeire receives grants/research support from UCB; is a consultant for AstraZeneca, Ferring, and Pfizer; is on the speakers bureau for Schering-Plough, Abbott, Ferring, and UCB; and is on an advisory committee for Shire and Ferring; and Dr Rutgeerts receives research grants, lecture fees, and consultant fees from Abbott, Centocor, Schering-Plough, and UCB. The remaining authors disclose no conflicts.

Funding

Supported by a grant from European Crohn's and Colitis Organisation and the Hellenic Society of Gastroenterology.

2-3 Article n°3 : Infliximab pharmacokinetics in inflammatory bowel disease patients

David Ternant, Alexandre Aubourg, Charlotte Magdelaine-Beuzelin, Danielle Degenne, Hervé Watier, Laurence Picon, Gilles Paintaud. *Ther Drug Monit.*, 2008, 30, 523-529.

Infliximab Pharmacokinetics in Inflammatory Bowel Disease Patients

David Ternant, PharmD, PhD,*†‡ Alexandre Aubourg, MD,*†§ Charlotte Magdelaine-Beuzelin, PharmD,*†|| Danielle Degenne, PharmD,*†|| Hervé Watier, MD, PhD,*†|| Laurence Picon, MD,§ and Gilles Paintaud, MD, PhD*†‡

Abstract: Infliximab, a chimeric monoclonal antibody, has profoundly modified the treatment of several inflammatory diseases, but no satisfactory description of its pharmacokinetics is available. The objective of this study is to describe the pharmacokinetics of infliximab and to explore the sources of its interindividual variability. Thirty-three chronic inflammatory bowel disease patients were studied. Infliximab serum concentrations, obtained during therapeutic drug monitoring, were analyzed using a population approach. Influence of sex, weight, age, concomitant immunosuppressive treatment, and development of antibodies toward infliximab (ATI) on pharmacokinetic parameters was investigated. A two-compartment model with first-order distribution and elimination constants allowed a satisfactory description of infliximab serum concentrations. Mean population distribution and elimination half-lives were 4.3 and 18.5 days, respectively. Weight and sex were found to significantly influence volume of distribution of the central compartment, which increased with weight and was higher in men. Clearance was 2.7 times higher, and elimination half-life was 34% lower in the presence of ATI. In two patients, an increase in infliximab dose or a decrease in dosing interval lead to a decrease in infliximab clearance toward its value in patients without ATI.

Infliximab pharmacokinetics are similar to those of other monoclonal antibodies, notably with an elimination half-life of approximately 3 weeks. Both body weight and sex were found to influence infliximab pharmacokinetics, and its clearance increased thrice in the presence of ATI.

Key Words: Infliximab, monoclonal antibodies, therapeutic drug monitoring, pharmacokinetics, inflammatory bowel diseases

(*Ther Drug Monit* 2008;30:523–529)

INTRODUCTION

Infliximab is a chimeric human-mouse monoclonal immunoglobulin (Ig)G1 antibody directed against tumor necrosis factor (TNF)- α , which has profoundly modified the treatment of chronic inflammatory diseases. It is now approved

for the treatment of rheumatoid arthritis (RA), Crohn's disease (CD), ankylosing spondylitis (AS), and psoriasis. Current knowledge on clinical pharmacokinetics of infliximab has been reviewed by Klotz et al.¹ The apparent volume of distribution of infliximab is low (3–6 L) and corresponds to the intravascular space. The long persistence of infliximab in this compartment, with a reported elimination half-life of approximately 7 to 12 days, is explained by a low systemic clearance of approximately 11 to 15 mL/hr.¹ The mechanisms by which the IgGs such as infliximab are cleared from intravascular space are not fully understood. Similar to all circulating proteins, IgGs are endocytosed by vascular endothelial cells and directed to lysosomal degradation. The low clearance of IgGs is caused by the Brambell receptor (FcRn), which protects them from catabolism and transports them back into the circulation.²

The administration of infliximab leads to highly variable concentrations among patients. This variability is relevant because infliximab concentrations influence the clinical response of RA,^{3–5} CD,^{6,7} AS,⁸ and psoriatic⁹ patients. Part of this variability is explained by the development, in some patients, of antibodies directed toward infliximab (ATI). These induced antibodies are more frequent when infliximab is not administered regularly (ie, “on demand”), or when no concomitant immunosuppressive treatment is associated.^{4,6} These antibodies lead to infusion reactions, lower infliximab trough concentrations, and shortening of the duration of effect,^{5,6,10} but the quantitative impact of the presence of ATI on infliximab pharmacokinetics has never been assessed.

Although infliximab serum concentrations were reported in RA,^{3–5,11} CD,^{7,12,13} AS,⁸ and psoriatic⁹ patients, no formal compartmental pharmacokinetic study has been published. A precise description of infliximab pharmacokinetics and of its variability is, however, a prerequisite to individual dose adjustment. In addition, when infliximab has to be interrupted because of pregnancy or surgery,¹⁴ the timing of infliximab discontinuation is only based on the limited information available on its pharmacokinetics. The objective of this study is to describe the pharmacokinetics of infliximab and its interindividual variability in patients treated for inflammatory bowel disease (IBD).

METHODS

Patient Population

As part of routine monitoring of patients treated for CD or ulcerative colitis (UC), blood samples were collected to

Received for publication February 15, 2008; accepted May 20, 2008.

From the *Université François Rabelais Tours, GICC; †CNRS, UMR 6239, and CHRU de Tours, Departments of ‡Pharmacology-Toxicology, §Gastroenterology, and ||Immunology, Tours, France.

David Ternant was supported by a grant from the Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique.

Correspondence: Dr. Gilles Paintaud, MD, PhD, Department of Pharmacology-Toxicology, CHRU de Tours, Hôpital Bretonneau, F-37044 Tours Cedex 9, France (e-mail: paintaud@med.univ-tours.fr).

Copyright © 2008 by Lippincott Williams & Wilkins

measure infliximab serum concentrations and to detect the presence of ATI. Infliximab concentrations were measured both in predose serum samples and in samples collected 2 hours after the end of the infusion to estimate individual half-lives. This parameter was used to estimate infliximab concentrations 4 and 8 weeks after infusion to allow comparisons with the literature.^{4,6,12} Individual results were sent to the prescriber within the framework of a routine therapeutic drug monitoring service and were discussed during clinico-biological rounds. The samples were not drawn specifically for this study, which was performed retrospectively. Clinical evaluation of CD patients included the CD activity index (CDAI), and the biological response was assessed using C-reactive protein.

In 33 patients with IBD, the number of blood samples available over time was compatible with a meaningful pharmacokinetic analysis. Patients received 5 mg/kg of infliximab as 2 hour intravenous infusions at weeks 0, 2, 4, and 8 and every 8 weeks thereafter. If, during the maintenance phase, clinical efficacy was considered insufficient (i.e., CDAI >150), the dosing regimen was adjusted by decreasing the dosing interval (e.g., from 8 to 7 wk) or by increasing the dose (e.g., from 5 to 6 mg/kg) with a maximum of 10 mg/kg. For patient 28, infliximab was administered "on demand" on average every 16 weeks. Most patients received concomitant immunosuppressive treatment (Table 1).

Infliximab and ATI Assays

Infliximab serum concentrations were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay as previously described.¹³ The limit of detection was 0.014 mg/L, and the

lower limit of quantification was 0.04 mg/L. Serum concentrations of ATI were analyzed using a double-antigen enzyme-linked immunosorbent assay based on their capture by infliximab-coated micro plates and their detection by peroxidase-coupled infliximab. Because of the interference of circulating infliximab, ATI are not detected if infliximab concentrations are too high. In our population, the highest infliximab concentration that was still compatible with the detection of ATI was 0.93 mg/L. Therefore, ATI results were considered to be nonconclusive if infliximab concentration was greater than 0.93 mg/L. A patient was considered ATI+ if ATIs were detected on at least one of his/her visits.

Pharmacokinetic Data Analysis

Infliximab serum concentrations were analyzed by a population pharmacokinetic approach, using the nonlinear mixed effect modeling program Winnonmix professional 4.1 (Pharsight corporation, Mountain View, NC). A conditional first-order method and quasi-Newton optimization method were used. Models were compared by visual inspection of plots of observed and predicted concentrations versus time, of plots of residuals versus predicted concentration and versus time, and by analysis of coefficients of variation of parameter estimates, interindividual coefficients of variation of estimated parameters, value of the objective function ($-2 \ln$ -likelihood), and Akaike's information criteria (AIC). The model with the lowest objective function (assessed by a χ^2 test) and with the lower AIC was selected.

One, two, and three mammillary compartment models with first-order elimination and distribution constants and zero-order input (constant rate infusion) were tested. The interindividual variability of the pharmacokinetic parameters was described as

$$\theta_i = f(\theta, \eta_i),$$

where θ_i is the estimated individual parameter of the i^{th} patient, θ is the typical value of the parameter in the population, and η_i is the random effect (i.e., the difference between θ_i and θ). Additive, proportional, and exponential models were tested. The final model was chosen to obtain normally distributed η s with mean 0 and variance ω^2 . Covariance matrix of the η s was assumed to be diagonal. The error (residual) model was

$$C_{\text{obs},ij} = g(C_{\text{pred},ij}, \varepsilon_{ij}),$$

where $C_{\text{obs},ij}$ is observed infliximab concentration of the i^{th} patient at time j , $C_{\text{pred},ij}$ is the concentration predicted by the combined structural and interindividual models, and ε_{ij} is the residual. Additive, proportional, exponential, and mixture models (i.e., combining additive and proportional error components) were tested. The final error model was chosen so that ε s were normally distributed with mean 0 and variance σ^2 .

Age, weight, sex, disease, concomitant immunosuppressive treatment, and ATI status were tested as covariates. The continuous covariates weight (WT) and age (AG) were centered on their median. The dichotomous covariates sex (SX), disease (DIS), and presence of ATI (ATI) were coded 0 or 1. The presence of ATI was a time-varying covariate: it was coded as ATI = 1 when ATIs were detected and ATI = 0 otherwise. The influence of concomitant immunosuppressive

TABLE 1. Summary of Patients Characteristics

Patients	No.	Median (Range)
Patients	33	
Trough concentrations	478	
Inflammatory bowel disease		
Crohn's disease	30	
Ulcerative colitis	3	
Treatment phase		
Beginning	18	
Steady-state	15	
Demographic characteristics		
Age (yr)		33 (19 – 53)
Weight (kg)		67 (44 – 110)
Sex (women/men)	18/15	
ATI status		
ATI detected at least once	5	
Concomitant immunosuppressive treatment		
Azathioprine or 6-mercaptopurine	25	
Methotrexate	4	
Azathioprine then methotrexate	1	
Tacrolimus	1	
none	2	

ATI, antibodies toward infliximab.

treatment was tested by two approaches: 1) each immunosuppressive agent was tested as a covariate when it was administered to at least four patients (this was the case for azathioprine, methotrexate, and 6-mercaptopurine), and 2) concomitant immunosuppressive treatment was coded as a dichotomous variable, with TRT = 0 for no treatment and TRT = 1 otherwise.

The influence of individual covariates was assessed by adding them one by one to the base model in a forward, stepwise manner until no further reduction in the objective function was obtained. Then, a backward elimination step was performed to confirm the significant influence of each covariate.

Statistical Analysis

Proportions of ATI+ and ATI- patients who had an alteration of infliximab treatment were compared with Fisher's exact test.

RESULTS

Patients

A total of 478 infliximab trough and peak concentrations were available in 33 patients (Table 1). Thirty patients had CD, and three had UC. Thirty-one patients received concomitant immunosuppressive treatment (Table 1). Eighteen patients were monitored at the beginning of their infliximab treatment, whereas 15 patients were monitored at a later phase of their treatment and were assumed to be at steady-state. For these patients, the median interval between the beginning of infliximab treatment and the first concentration measurement was 13 (range, 5–19) months. ATIs were detected at least once in five patients (Table 2).

In all but one patient (#12), the first detection of ATI followed the reintroduction of infliximab after a discontinuation. Except for patient 4, who was intolerant to all immunosuppressive agents tested, all ATI+ patients were receiving an immunosuppressive treatment at the time of ATI detection. The detection of ATI was concomitant with a decrease in clinical response, except for patient 26.

Infliximab treatment was altered in 13 of the 33 patients because of a CDAI greater than 150 (Table 3). The treatment was altered in 9 of 28 ATI- patients and in 4 of 5 ATI+ patients. The treatment was altered more often in ATI+ than in ATI- patients ($P = 0.026$). In 4 of these 13 patients, infliximab concentrations were not available both before and after treatment alteration: 2 were switched to adalimumab, and 2

had a shortening of their infusion interval before this concentration monitoring period. In the remaining nine patients, mean trough concentrations measured before treatment alteration were 2.1 mg/L and 0.23 mg/L in ATI- and ATI+ patients, respectively. After the alteration, mean trough concentrations were 7.6 mg/L and 4.2 mg/L in ATI- and ATI+ patients, respectively.

In the three ATI+ patients whose infliximab regimen was altered, ATI became undetectable. In another ATI+ patient (patient 26), ATI became undetectable over time, although he had no therapeutic modification because of sustained response to infliximab.

Pharmacokinetic Modeling

The data were best described using a two-compartment pharmacokinetic model. The objective function was lower for this model than for a one-compartment model ($-2 \times \ln\text{-likelihood} = 3071$ vs. 3236, $P < 0.0001$) and not different from that of the three-compartment model (3076, NS). AIC of the two-compartment model (3083) was lower than both those of the one-compartment (3244) and the three-compartment (3100) models. The interindividual variability was described by an exponential model, and the error was described by a mixture model. Both weight and sex were found to have a significant influence on central volume of distribution (V_C). The presence of ATI had a significant influence on systemic clearance (CL_C) (Table 4). None of the patient characteristics was found to influence distribution parameters (V_P and CL_P). The backward elimination procedure confirmed the significant influence of weight, sex, and ATI presence on infliximab pharmacokinetics.

In the final model, V_C was described as

$$V_C = V_{C,\text{man}} \cdot SX + V_{C,\text{woman}} \cdot (1 - SX) + V_{C,\text{WT}} \cdot \frac{WT}{\text{med}(WT)},$$

where $SX = 0$ for women and 1 for men, $V_{C,\text{man}}$ and $V_{C,\text{woman}}$ are baseline V_C of men and women, respectively, $V_{C,\text{WT}}$ is the component of V_C for a median weighted patient, and $\text{med}(WT)$ is median weight of the population. Clearance of the central compartment (CL_C) was described as

$$CL_C = CL_{C,\text{ATI}+} \cdot (\text{ATI}) + CL_{C,\text{ATI}-} \cdot (1 - \text{ATI}),$$

where $CL_{C,\text{ATI}+}$ and $CL_{C,\text{ATI}-}$ are typical values of CL_C in the presence and absence of ATI, respectively.

The final pharmacokinetic model described the data without bias (Fig. 1). Systemic clearance of patients with ATI was 2.7 times higher than that of patients without ATI (Table 5). As a consequence, distribution and elimination half-lives were almost halved (Table 6).

Figure 2 displays observed and model-predicted infliximab concentrations in three patients: a patient who did not develop ATI (patient 7, Fig. 2A) and two patients who developed ATI (patients 12 and 13, Fig. 2, B and C, respectively). In patient 12, ATIs were detected at the beginning of the follow-up, and his estimated CL_C was 0.043 L/hr. The interval between his 5 mg/kg infusions was shortened from 8 to 7 weeks. After this alteration, trough concentrations re-increased. After the eighth infliximab infusion, ATIs were no longer detectable, and the estimated CL_C was 0.015 L/hr,

TABLE 2. Time of Antibodies Toward Infliximab (ATI) Detection in Samples

ATI + Patient	Total No. of Samples	ATI + Samples
4	4	2 nd to 4 th
12	11	1 st to 4 th
13	11	1 st to 3 rd
26	11	1 st
32	10	1 st and 2 nd

TABLE 3. Description of Dose Alteration

Patient	Dose Alteration	Mean Infliximab Trough Concentration (mg/L)		ATI Status
		Before Adjustment	After Adjustment	
1	5 mg/kg every 7 weeks	Before concentration monitoring		–
3	5 mg/kg every 6 weeks	1.7	4.4	–
4	Switch to adalimumab			+
10	10 mg/kg every 6 weeks	3.3	18.0	–
12	5 mg/kg every 7 weeks	0.089	1.5	+
13	6 mg/kg every 8 weeks	0.014	7.8	+
14	5 mg/kg every 7 weeks	Before concentration monitoring		–
19	Switch to adalimumab			–
22	5 mg/kg every 6 weeks	1.8	2.8	–
25	5 mg/kg every 6 weeks	2.1	7.3	–
27	5 mg/kg every 7 weeks	2.1	2.9	–
31	5 mg/kg every 6 weeks	5.5	7.0	–
32	6 mg/kg every 8 weeks	0.59	3.3	+
Median (25 th –75 th percentiles)				
ATI–		2.1 (1.9–3.0)	5.7 (3.3–7.2)	
ATI+		0.09 (0.05–0.4)	3.3 (2.4–5.6)	
Overall patients		1.8 (0.6–2.1)	4.4 (2.9–7.3)	

All concentrations taken into account were at steady-state.
ATI, antibodies toward infliximab.

a value close to the mean value estimated in the absence of ATI (Fig. 2B). In patient 13, ATI were detected at the beginning of the follow-up, at which time estimated CL_C was 0.023 L/hr. The dose was increased to 7 mg/kg, and this was followed by an increase in trough infliximab concentrations. After the fourth infusion, ATIs were no longer detected, and the estimated CL_C was 0.0083 L/hr, again a value close to the mean value estimated in the absence of ATI (Fig. 2C).

DISCUSSION

This study was based on data collected during routine monitoring of infliximab in IBD patients in which individual infliximab pharmacokinetics was estimated to assess patient exposure. However, the treatment alterations described in this

study were based on clinical response and not on infliximab concentrations. We used these data retrospectively to analyze infliximab pharmacokinetics.

Previous studies describing infliximab pharmacokinetics used a one-compartment model.^{4,12,13} However, because of its human Fc portion, the basic behavior of infliximab should not be different from that of other therapeutic monoclonal antibodies.² A two-compartment model was indeed used to describe the pharmacokinetics of another chimeric antibody, rituximab,^{15,16} of a humanized antibody, sibrotuzumab,¹⁷ and of a fully human antibody, golimumab.¹⁸ In the present study, a two-compartment model allowed a satisfactory description of infliximab pharmacokinetics. For a median subject, the estimated V_C was 2.7 L, which is similar to plasma volume and to the values reported for infliximab using a one-compartment

TABLE 4. Covariate Model Development

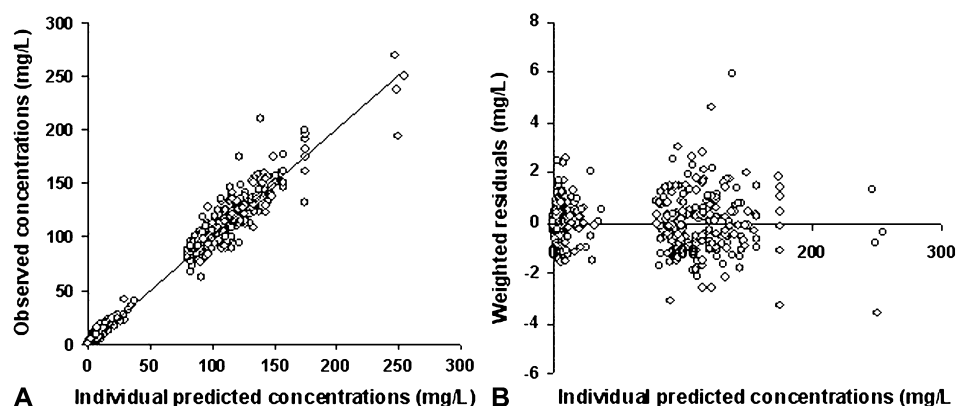
No. of Covariates Deleted	Model	–2 (ln-likelihood)	–2 (Δ ln-likelihood)*	P Value	Limit χ^2 Value
Full	WT, SX on Vc; ATI on CLc	3014.81	0		
1	WT, SX on Vc	3038.49	23.68	<0.01†	6.64
1	WT on Vc, ATI on CLc	3031.05	16.25	<0.01†	6.64
1	SX on Vc, ATI on CLc	3029.15	14.34	<0.01†	6.64
2	WT on Vc	3050.05	35.24	<0.01†	9.21
2	SX on Vc	3048.51	33.70	<0.01†	9.21
2	ATI on CLc	3042.36	27.55	<0.01†	9.21
3	no covariate	3071.10	56.30	<0.01†	11.35

*Changes in ln-likelihood caused by deletion of individual covariates from full population model.

†Significant; $\chi^2_n < 0.01$, with n = number of degrees of freedom, e.g. number of covariate parameters deleted.

WT, personal weight (kg); SX, sex; ATI, presence of antibodies toward infliximab; Vc and Vp, central and peripheral volumes of distribution; CLc and CLp, systemic and distribution clearances.

FIGURE 1. Individual model-predicted versus observed concentrations (A) and weighted residuals versus individual model-predicted concentrations (B).



model.^{4,12,13} However, we estimated a mean elimination $T_{1/2}$ of 19 days, which is twice the value reported in these studies (approximately 10 days). Pharmacokinetic studies of monoclonal antibodies using one-compartment^{4,13,19} or two-compartment^{15–18,20} models provided similar estimation for parameters of the central compartment (V_C and CL_C being estimated at approximately 3 L and 0.01 L/hr, respectively) but different estimations of elimination half-life. An elimination half-life of approximately 21 days is consistent with that of endogenous IgG.²¹ Therefore, a one-compartment model may provide a relevant estimation of central volume of distribution and systemic clearance but leads to a wrong estimation of elimination half-life and therefore of infliximab area under the curve.

In our study, both sex and weight were found to significantly influence V_C : this parameter was higher in men than in women and increased with body weight. An influence of weight on V_C was reported for other monoclonal antibodies such as golimumab¹⁸ and sibrotuzumab.¹⁷ Because V_C is similar to plasma volume and this volume increases with body weight, the influence of body weight on V_C was expected. Because of the influence of sex on weight, these covariates

were tested separately in forward and backward elimination steps (Table 3). Our results suggest separate influences of weight and sex on V_C . The influence of sex on V_C may occur because, for a given body weight, plasma volume is lower in women than in men. We observed no significant influence of concomitant immunosuppressive treatment on infliximab pharmacokinetics, although Maini et al.¹¹ reported lower concentrations in patients cotreated by methotrexate. This may be explained by the fact that only two patients were not cotreated by an immunosuppressive agent. Also, the small number of UC patients in our population probably precluded the detection of a possible difference in pharmacokinetics between CD and UC patients.

Previous studies reported lower infliximab trough concentrations in the presence of ATI,^{5,6} but their quantitative influence on infliximab pharmacokinetic was not assessed. Although cotreatment with immunosuppressive agents was previously reported to decrease the risk of developing ATI,⁶ four of the five patients of our study who developed ATI were cotreated. We observed an increase in infliximab clearance in the presence of ATI, its value being almost three time higher and elimination half-life twice shorter than in the absence of ATI. Our assay was unable to detect ATI in the presence of significant concentrations of infliximab, a problem encountered by other authors.^{5,6,22} In this study, the highest infliximab trough concentration for which ATI were detected was 0.93 mg/L. However, the lack of detection of ATI in the presence of “too high” concentrations of infliximab may correspond to their neutralization by the therapeutic antibody and therefore to low serum concentrations of active (i.e., unbound) ATIs.

TABLE 5. Estimated Infliximab Population Pharmacokinetic Parameters Using Two-Compartment Model With Influence of Sex and Weight on Central Volume of Distribution and Influence of Antibodies Toward Infliximab (ATI) on Systemic Clearance

Parameter (units)	Population Mean	Precision of Estimation (SE, CV%)*	Interindividual Variability (CV%)
V_C , men (L)	2.3	18.1	14.1
V_C , women (L)	1.1	31.4	11.3
V_C , weight (L)	1.7	19.6	19.2
CL_C , ATI– (L/h)	0.012	7.9	22.5
CL_C , ATI+ (L/h)	0.032	10.9	27.4
V_p (L/h)	1.9	22.6	15.0
CL_p (L/h)	0.0054	34.5	10.0
σ^2 (mg/L)	1.04	12.0	

*Coefficient of variation (CV) percentage, standard error of estimate/mean $\times$ 100.
 V_C and V_p , central and peripheral volumes of distribution; CL_C and CL_p , systemic and distribution clearances.

TABLE 6. Distribution and Elimination Half-Lives for Medium-Weighted Patient According to Sex and Presence of Antibodies Toward Infliximab (ATI)

Half-Lives	ATI –		ATI+	
	Men	Women	Men	Women
$T_{1/2-\alpha}$ (days)	5.1	4.0	2.8	2.1
$T_{1/2-\beta}$ (days)	19.7	18.0	12.5	12.3

$T_{1/2-\alpha}$ and $T_{1/2-\beta}$, distribution and elimination half-lives, respectively.

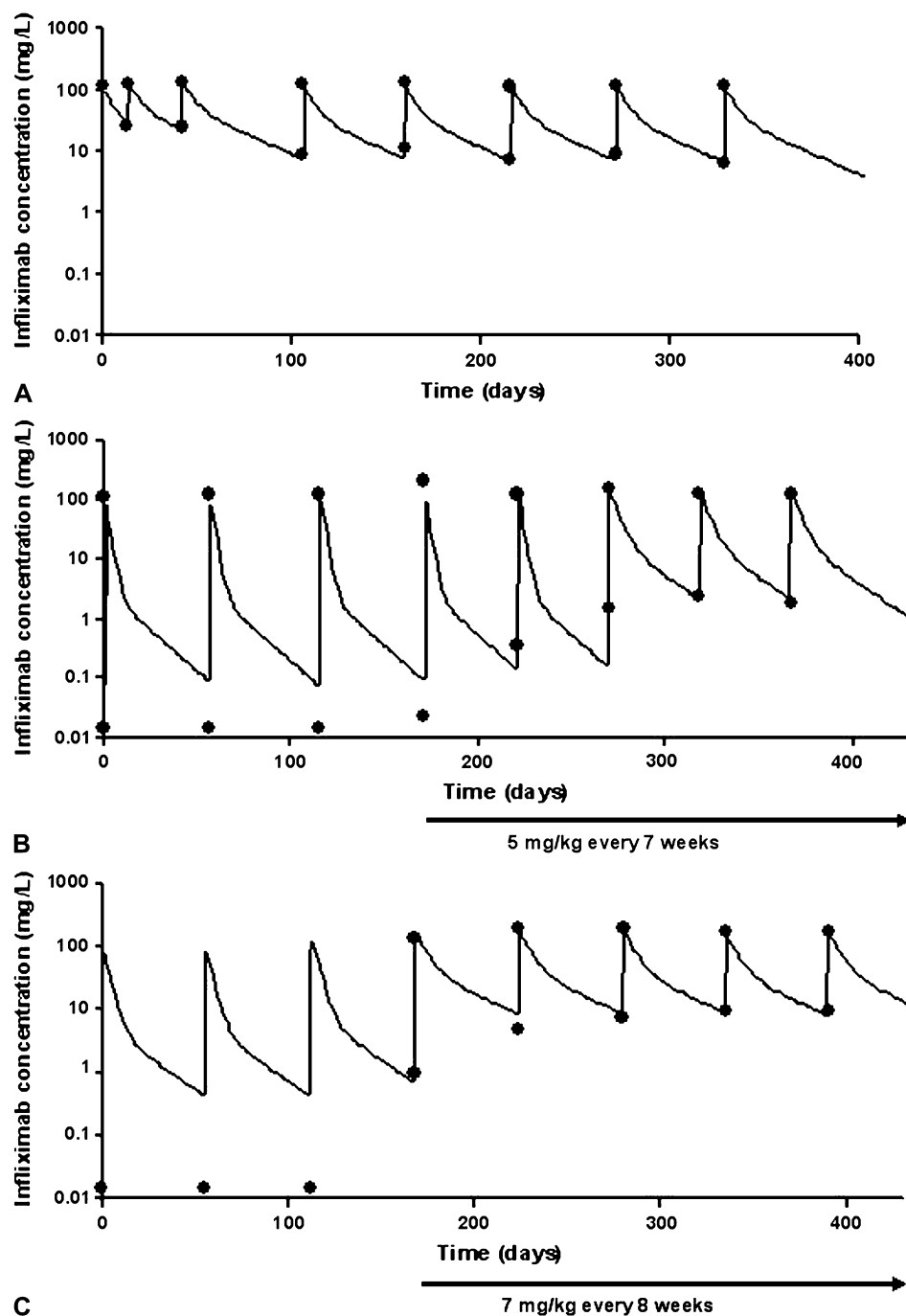


FIGURE 2. Pharmacokinetic profiles for patients 7 (A), 12 (B), and 13 (C). Observed (●) and model-predicted (solid lines) infliximab concentrations.

Because they had an unsatisfactory clinical response, the dose of patients 12, 13, and 32 was increased. This was followed by an increase in their infliximab concentrations and ATI becoming undetectable (Fig. 2, B and C). The change in infliximab pharmacokinetics, with an apparent decrease in its clearance, may be explained by two phenomena: 1) a decrease in ATI production, which is unlikely to occur over such a short period of time, and 2) a neutralization of free ATI by an excess of infliximab concentrations. These results suggest that an increase in infliximab dose may lead to ATI neutralization and

may lead to recovery of normal infliximab exposure. Similar results were reported for adalimumab.²³ However, these observations are not sufficient to recommend an increase in infliximab dose in ATI+ patients because their number, in the present study, is too small.

Therapeutic drug monitoring of infliximab may be useful because there is an interindividual variability of infliximab pharmacokinetics associated with an increase in clinical response with infliximab trough concentrations, as shown in RA,³⁻⁵ CD,^{6,7} AS,⁸ and psoriatic⁹ patients. Maser et al.⁷

observed a relationship between infliximab concentrations and clinical outcomes when studying a population of CD patients as a whole. Furuya et al.,²⁴ using simulations, developed a pharmacokinetic-pharmacodynamic model relating infliximab, TNF- α , and infliximab-TNF- α complex concentrations to clinical response. Therefore, no formal pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of infliximab has been published yet. The compartmental modeling of infliximab pharmacokinetics reported in the present study may therefore serve as a basis for the design of future studies of the concentration-effect relationship of this therapeutic monoclonal antibody, a necessary step before therapeutic drug monitoring can be recommended.

CONCLUSION

This study is the first to describe infliximab pharmacokinetics using a compartment model. The elimination half-life of infliximab that we have estimated is close to 3 weeks, a value much longer than the 10 days previously reported.^{12,13,25} The influence of sex on the central volume of distribution may be taken into account if an individual dose adjustment is required. The presence of ATI is associated with a 2.7-fold increase in infliximab systemic clearance.

ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge the technical assistance of Anne-Claire Duveau.

REFERENCES

- Klotz U, Teml A, Schwab M. Clinical pharmacokinetics and use of infliximab. *Clin Pharmacokinet*. 2007;46:645–660.
- Ternant D, Paintaud G. Pharmacokinetics and concentration-effect relationships of therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins. *Expert Opin Biol Ther*. 2005;5(Suppl 1):S37–47.
- Bendtzen K, Geborek P, Svenson M, et al. Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor alpha inhibitor infliximab. *Arthritis Rheum*. 2006;54:3782–3789.
- St Clair EW, Wagner CL, Fasanmade AA, et al. The relationship of serum infliximab concentrations to clinical improvement in rheumatoid arthritis: results from ATTRACT, a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2002;46:1451–1459.
- Wolbink GJ, Voskuyl AE, Lems WF, et al. Relationship between serum trough infliximab levels, pretreatment C reactive protein levels, and clinical response to infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:704–707.
- Baert F, Noman M, Vermeire S, et al. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2003;348:601–608.
- Maser EA, Vilella R, Silverberg MS, et al. Association of trough serum infliximab to clinical outcome after scheduled maintenance treatment for Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4:1248–1254.
- de Vries MK, Wolbink GJ, Stapel SO, et al. Decreased clinical response to infliximab in ankylosing spondylitis is correlated with anti-infliximab formation. *Ann Rheum Dis*. 2007;66:1252–1254.
- Reich K, Nestle FO, Papp K, et al. Infliximab induction and maintenance therapy for moderate-to-severe psoriasis: a phase III, multicentre, double-blind trial. *Lancet*. 2005;366:1367–1374.
- de Vries MK, Wolbink GJ, Stapel SO, et al. Inefficacy of infliximab in ankylosing spondylitis is correlated with antibody formation. *Ann Rheum Dis*. 2007;66:133–134.
- Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, et al. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1998;41:1552–1563.
- Cornillie F, Shealy D, D'Haens G, et al. Infliximab induces potent anti-inflammatory and local immunomodulatory activity but no systemic immune suppression in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001;15:463–473.
- Ternant D, Mulleman D, Degenne D, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of infliximab. *Ther Drug Monit*. 2006;28:169–174.
- Katz JA, Antoni C, Keenan GF, et al. Outcome of pregnancy in women receiving infliximab for the treatment of Crohn's disease and rheumatoid arthritis. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:2385–2392.
- Iacona I, Lazzarino M, Avanzini MA, et al. Rituximab (IDEC-C2B8): validation of a sensitive enzyme-linked immunoassay applied to a clinical pharmacokinetic study. *Ther Drug Monit*. 2000;22:295–301.
- Ng CM, Bruno R, Combs D, et al. Population pharmacokinetics of rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) in rheumatoid arthritis patients during a phase II clinical trial. *J Clin Pharmacol*. 2005;45:792–801.
- Kloft C, Graefe EU, Tanswell P, et al. Population pharmacokinetics of sibrotuzumab, a novel therapeutic monoclonal antibody, in cancer patients. *Invest New Drugs*. 2004;22:39–52.
- Zhou H, Jang H, Fleischmann RM, et al. Pharmacokinetics and safety of golimumab, a fully human anti-TNF-alpha monoclonal antibody, in subjects with rheumatoid arthritis. *J Clin Pharmacol*. 2007;47:383–396.
- Berinstein NL, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al. Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 1998;9:995–1001.
- Wiseman GA, Kornmehl E, Leigh B, et al. Radiation dosimetry results and safety correlations from 90Y-ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy for relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma: combined data from 4 clinical trials. *J Nucl Med*. 2003;44:465–474.
- Morell A, Terry WD, Waldmann TA. Metabolic properties of IgG subclasses in man. *J Clin Invest*. 1970;49:673–680.
- Candon S, Mosca A, Ruemmele F, et al. Clinical and biological consequences of immunization to infliximab in pediatric Crohn's disease. *Clin Immunol*. 2006;118:11–19.
- Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, et al. Clinical response to adalimumab: relationship to anti-adalimumab antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2007;66:921–926.
- Furuya Y, Ozeki T, Takayanagi R, et al. Theory based analysis of anti-inflammatory effect of infliximab on Crohn's disease. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2007;22:20–25.
- EMA. Scientific discussion for Remicade. 2005. EMA/H/C/240/II/61. Available at: <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Remicade/EMA-H-240-II-61-AR.pdf> Accessed October 2007.

2-4 Discussion

Le suivi clinique et pharmacologique sur 2 ans de 168 patients traités par adalimumab pour maladie de Crohn, après échec de l'infliximab, présenté dans l'article n°2 montre que parmi les 71% de répondeurs à 4 semaines de traitement, 61,5% bénéficient encore d'une réponse clinique à la fin du suivi. Alors que plusieurs études ont identifié la survenue des ATI et une concentration résiduelle basse d'infliximab comme étant des facteurs prédisposant à l'échec du traitement par infliximab (St Clair *et al.*, 2002 ; Baert *et al.*, 2003 ; Farrell *et al.*, 2003 ; Hanauer *et al.*, 2004 ; Maser *et al.*, 2006), nos résultats montrent qu'il n'y a pas de relation entre les concentrations sériques résiduelles d'adalimumab et l'efficacité du traitement, cependant, les patients qui suspendent le traitement ont des concentrations résiduelles basses. Actuellement, les données disponibles concernant la réponse clinique au traitement par adalimumab, l'influence de ses concentrations sériques et des anticorps induits ont été analysées pour des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Bien qu'il ne soit pas possible de les comparer aux résultats présentés dans l'article n°2, ils montrent clairement d'une part que la réponse clinique est corrélée à la concentration d'adalimumab circulant résiduel et malgré son humanisation poussée, à la présence d'anticorps anti-adalimumab (Radstake *et al.*, 2009), que d'autre part ces anticorps induits sont associés à des effets secondaires (Bender *et al.*, 2007), à des concentrations résiduelles d'adalimumab basses et une absence de réponse au traitement (Bartelds *et al.*, 2007).

Nous avons participé à cette étude en dosant les anticorps anti-adalimumab qui sont détectés chez 9,2% des patients. Ceci confirme ce qui est rapporté par ailleurs : qu'il s'agisse d'ATI ou d'anticorps anti-adalimumab, leur survenue est variable d'un patient à l'autre (Targan *et al.*, 1997 ; Baert *et al.*, 2003 ; Farrell *et al.*, 2003 ; Hanauer *et al.*, 2004 ; Miele *et al.*, 2004 ; Sandborn *et al.*, 2007 ; Vermeire *et al.*, 2007). En revanche, nous ne montrons pas que les anticorps anti-adalimumab soient associés à la survenue d'effets secondaires ou à une réaction à l'injection, contrairement à ce qui a été rapporté pour l'infliximab (Baert *et al.*, 2003), mais ils sont retrouvés dans la majorité des cas (10/12 patients) lorsque le traitement est interrompu. Ils sont de plus retrouvés chez 92% des patients qui ont des concentrations d'adalimumab circulant résiduel inférieures au seuil permettant leur détection, suggérant que ces anticorps induits ont essentiellement pour effet d'accélérer l'élimination du médicament.

Par ailleurs, les patients ayant été précédemment traités par infliximab, nous avons dosé leurs ATI afin d'en évaluer l'influence sur la survenue des anticorps anti-adalimumab. Parmi les 12 patients ayant développé des anticorps anti-adalimumab, les ATI ont été retrouvés pour

6 d'entre eux et sont absents chez les 6 autres. De ce fait, la présence d'ATI ne semble pas influencer la survenue des anticorps anti-adalimumab, pas plus qu'elle ne contraint à arrêter l'adalimumab ou à en augmenter les doses. Cette observation n'a pas été analysée plus précisément et relève finalement d'un assez petit effectif de patients. Cependant, les conséquences du relais entre deux molécules anti-TNF- α , classiquement entre infliximab et adalimumab, en termes de réponse clinique et d'immunogénicité des anticorps thérapeutiques a été analysé en rhumatologie. Bartelds et collaborateurs ont en effet étudié la réponse clinique à l'adalimumab ainsi que la survenue des anticorps induits d'une cohorte de 235 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, 52 ayant été traités précédemment avec de l'infliximab et 183 recevant l'adalimumab en première intention. Ils montrent que la survenue des anticorps anti-adalimumab est plus fréquente chez les patients ayant développé des ATI lors de leur traitement par infliximab (11/33 (33%)) que chez les patients seulement traités par adalimumab (32/183 (18%)). De plus, la réponse clinique à l'adalimumab utilisé en relais de l'infliximab est meilleure si les patients n'ont pas d'ATI (Bartelds *et al.*, 2009). Les auteurs proposent que la survenue d'anticorps induits vis-à-vis des deux bio-médicaments chez certains patients soit associée à leur terrain génétique, les prédisposant à développer une réponse immunitaire sans pour autant avancer de gènes d'intérêt. Ils réfutent par ailleurs l'éventualité d'une immunogénicité due à une trop faible dose d'anticorps thérapeutique en proportion d'une forte activité de la maladie et ce, en raison des critères cliniques caractérisant leur cohorte de patients. Bien que les résultats de Bartelds et collaborateurs ne puissent être comparés aux nôtres puisque les maladies traitées, les méthodes de dosage des bio-médicaments et des anticorps induits sont différentes, cette étude a le mérite de mettre en évidence l'existence possible de réactions croisées entre deux anticorps thérapeutiques, une opinion que nous partageons avec ces auteurs.

En effet, en ce qui concerne l'infliximab et l'adalimumab, cette éventualité est plus qu'envisageable d'un point de vue structural, puisque malgré l'ingénierie différente de leurs domaines variables, ils partagent les mêmes allotypes G1m17,1 sur leurs domaines constants (Tableaux II et V). Cependant, ces allotypes ne sont pas fréquemment portés par les IgG1 des individus caucasiens qui ont plus classiquement l'allotype complémentaire, G1m3 (Tableau VII et VIII). Cette observation nous a conduit à élaborer l'hypothèse que nous analysons dans la deuxième partie des résultats, selon laquelle les patients caucasiens (G1m3) pourraient s'immuniser au contact des anticorps thérapeutiques en particulier au niveau de leurs allotypes G1m17,1 qui participeraient ainsi au développement d'anticorps induits dont feraient partie les anticorps anti-allotypes. Etant donné la variabilité inter-individuelle de

survenue des ATI lors du traitement par infliximab, nous avons choisi d'étudier le polymorphisme *IGHG1*-359g/a codant les allotypes G1m3/17, comme facteur génétique candidat pouvant influencer la survenue des anticorps induits.

L'article n°3 décrit la pharmacocinétique de l'infliximab sur une cohorte de 33 patients de gastro-entérologie, selon un modèle bi-compartmental. Les résultats suggèrent que le sexe et le poids des patients influencent indépendamment le volume de distribution, alors qu'aucune association n'est mise en évidence entre les traitements immunosuppresseurs et les paramètres pharmacocinétiques. Il est connu que les ATI sont associés à des concentrations basses d'infliximab circulant résiduel sérique, mais leur influence sur sa pharmacocinétique n'a encore jamais été évaluée en gastro-entérologie. Les ATI ont été détectés chez 5 patients, sur un prélèvement au moins pendant le suivi : pour 4 patients, leur survenue est associée à la réintroduction de l'infliximab. La réponse clinique au traitement est plus fréquemment diminuée chez les patients développant des ATI (4/5) que lorsqu'ils n'en développent pas (9/28). De plus, les ATI accélèrent significativement la clairance de l'infliximab puisque celle-ci est 2,7 fois plus rapide en leur présence (0,032 L/h vs 0,012 L/h), ce qui a pour conséquence de modifier les demi-vies de distribution et d'élimination du bio-médicament. En effet, l'infliximab a une demi-vie d'élimination de 3 semaines comme la majorité des anticorps thérapeutiques entiers et les IgG naturelles, cependant les résultats montrent qu'en présence d'ATI celle-ci est deux fois plus rapide.

Ces observations ont été confirmées par d'autres en rhumatologie (Xu *et al.*, 2008) et plus récemment en gastro-entérologie (Fasanmade *et al.*, 2009) proposant que les ATI et l'infliximab forment des complexes éliminés plus rapidement que l'infliximab seul. Cette hypothèse a été étudiée par van der Laken et collaborateurs qui ont injecté à 4 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (2 répondeurs et 2 non répondeurs au traitement) de l'infliximab radio-marqué. L'imagerie leur a permis de localiser la distribution de l'infliximab dans l'organisme et de constater son élimination sanguine plus rapide chez l'un des patients non répondeurs. Par ailleurs, le dosage sérique des ATI montre des concentrations élevées chez les non répondeurs, mais basses voire indétectables pour les autres. Les auteurs rapportent la présence de complexes ATI-infliximab chez les deux patients non répondeurs, et notamment la détection de complexes de très grande taille pour l'un d'eux ayant fait une grave réaction à l'injection et leur attribuent possiblement la responsabilité de l'échec du traitement (van der Laken *et al.*, 2007). Dans l'article n°3, il nous est difficile d'affirmer que les complexes associant infliximab et ATI sont éliminés rapidement et qu'ils ne sont plus en circulation. En

effet, notre technique de dosage des ATI qui ne comporte pas de phase de dissociation acide, ne permet pas de mettre en évidence les ATI issus de ces complexes et donc de témoigner de la présence de ces complexes dans le sérum. Les mécanismes qui gouverneraient l'élimination plus rapide de ces complexes par rapport à l'infliximab seul ne sont pas encore identifiés. Une piste possible de recherche serait de s'intéresser à l'implication de certains récepteurs comme FcRn et/ou les FcγR dans ce mécanisme.

Par ailleurs, Fasanmade et collaborateurs ont identifié l'albumine comme étant une covariable majeure influençant les paramètres PK de l'infliximab chez les patients atteints de rectocolite hémorragique. Ils montrent que chez les patients ayant des concentrations sériques élevées d'albumine, l'élimination de l'infliximab est moins rapide et sa demi-vie donc plus longue que chez les patients ayant des concentrations sériques basses d'albumine. Ces résultats suggèrent aux auteurs que les fortes concentrations d'albumine soit le reflet d'une expression accrue de FcRn, responsable d'un recyclage plus important de l'infliximab. Ils proposent d'utiliser l'albumine sérique comme marqueur prédictif de l'exposition des patients à l'infliximab (Fasanmade *et al.*, 2009).

Enfin, dans notre étude, l'augmentation des doses d'infliximab pour certains des patients ayant développé des ATI est suivie d'une augmentation des concentrations d'infliximab circulant résiduel (Figure 2 de l'article n°3) et de l'absence de détection des ATI certainement secondaire à leur neutralisation par l'infliximab libre en excès. Cependant, cette observation nécessite d'être confirmée avant d'en faire une recommandation à l'attention des cliniciens qui souhaitent enrayer la survenue des ATI !

3- Recherche de facteurs structuraux et génétiques impliqués dans l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques

3-1 Introduction

Après avoir montré les effets des anticorps induits sur la réponse clinique et la pharmacocinétique de l'infliximab et de l'adalimumab, nous avons souhaité en explorer les fondements et comprendre quels sont les facteurs qui conditionnent cette immunogénicité. Plusieurs observations méritent d'être recensées. Bien que l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques ne puisse être directement comparée en raison de leurs indications, posologies et voies d'administration différentes et quelles que soient les revendications marketing des firmes pharmaceutiques qui les commercialisent, aucune génération d'anticorps aussi humanisée soit-elle (chimériques, humanisés ou complètement humains) n'est exempte de stimuler chez certains patients, la production d'anticorps induits : nous l'avons nous même observé avec l'adalimumab, anticorps complètement humain (article n°2). Cette immunogénicité dépend également de la maladie traitée et du terrain génétique des patients. Nous avons donc choisi d'étudier l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques sous deux aspects : le premier consiste à en analyser les sources liées à la structure de ces molécules, le second à rechercher un facteur génétique prédisposant les individus à produire des anticorps induits.

La difficulté de comparer cliniquement l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques issus des différentes générations, et ce en raison de leurs indications, posologies et voies d'administration différentes, nous a amené à étudier leurs séquences afin de savoir s'il est possible d'en extraire des données relatives à l'immunogénicité de ces molécules, voire de l'évaluer théoriquement. Nous avons analysé précisément leurs domaines variables et, aussi antinomique que cela puisse paraître la variabilité de leurs domaines constants. Notre analyse structurale des domaines variables a été réalisée indépendamment sur les deux plus grandes familles d'anticorps nus. Les anti-cancéreux d'une part, travail qui a fait l'objet d'une publication (article n°3) et qui regroupent deux anticorps chimériques (cétuximab et

rituximab, voir Tableau II), trois anticorps humanisés (alemtuzumab, bevacizumab et trastuzumab, voir Tableau IV) et un anticorps complètement humain (panitumumab, voir Tableau V). Les anti-TNF- α d'autre part, où figurent un anticorps chimérique (infliximab), un anticorps humanisé (certolizumab pégol) et un anticorps complètement humain (adalimumab). Seules les séquences du golimumab qui a très récemment reçu son AMM (Tableau V) n'ont pu être prises en compte. Au sein de chaque famille, nous avons étudié précisément les séquences peptidiques et nucléotidiques de leurs domaines variables en cherchant le degré d'homologie liant les différentes générations d'anticorps, mais également en objectivant la divergence qui les sépare du répertoire germinale des IgG humaines. Cette analyse constitue une première étape théorique inédite vers l'évaluation de l'immunogénicité des domaines variables des anticorps thérapeutiques.

Nous nous sommes également intéressés à la variabilité des séquences des domaines constants des IgG1, beaucoup plus restreinte que la précédente, puisqu'elle se limite aux variations allotypiques. Contrairement aux domaines variables qui sont propres à l'anticorps qui les porte, les allotypes sont plus conservés, portés par toutes les chaînes $\gamma 1$ des IgG1 d'un individu et partagés par des groupes d'individus dans la population. A l'échelle des anticorps thérapeutiques, les domaines variables diffèrent d'une spécialité à l'autre, mais l'ingénierie dont ils sont issus fait qu'ils peuvent partager les mêmes allotypes (Tableaux II, IV et V), suggérant d'éventuelles réactions d'immunogénicité croisées entre deux anticorps utilisés chez un même patient. En effet, les anticorps thérapeutiques portent des allotypes d'IgG1 qui peuvent être différents de ceux que les patients traités expriment sur leurs propres IgG1. Par exemple, les allotypes G1m17,1 portés par l'infliximab sont opposés à ceux portés par les IgG1 de la majorité des Caucasiens (G1m3).

Bien que Bartelds et collaborateurs ne fassent pas allusion aux allotypes (communs) de l'infliximab (Tableau II) et de l'adalimumab (Tableau V), anticorps thérapeutiques dont ils ont analysé l'immunogénicité et son influence sur la réponse clinique (Bartelds *et al.*, 2009), leur travail illustre très bien notre double intérêt structural et génétique, pour les allotypes des IgG1. En effet, d'une part ces auteurs constatent la survenue plus fréquente des anticorps anti-adalimumab chez les patients ayant aussi développé des ATI ce qui leur évoque fortement une réaction croisée entre les deux molécules. D'autre part ils font état, comme d'autres avant eux que ce soit en rhumatologie ou en gastroentérologie (Baert *et al.*, 2003) de la variabilité inter-individuelle de survenue des anticorps induits par l'infliximab, suggérant une part de responsabilité du terrain génétique du patient dans cette réponse immunitaire. Ces différentes observations sont autant d'arguments qui justifient selon nous de chercher une possible

influence du caractère génétique que constituent les allotypes d'IgG1 (*IGHG1*-359g/a), sur l'immunogénicité de l'infliximab et qui pourrait expliquer la variabilité inter-individuelle de survenue des ATI, en particulier dans le Crohn (article n°4).

Le second facteur génétique que nous avons choisi d'étudier est le polymorphisme *FCGR3A*-158V/F qui affecte FcγRIIIA. En effet, comme nous l'avons montré, en collaboration avec le réseau des gastroentérologues belges, *FCGR3A*-158V/V est associé à une meilleure réponse biologique à l'infliximab dans cette maladie (Louis *et al.*, 2004) : il est légitime de se demander si ce polymorphisme est associé à une moindre production d'anticorps induits. A l'inverse, la forme FcγRIIIA-158V du récepteur ayant une meilleure affinité pour les IgG1 (Dall'Ozzo *et al.*, 2004), on pourrait faire l'hypothèse que cette forme fixerait mieux les complexes immuns TNF- α - infliximab et favoriserait ainsi la présentation des peptides issus de l'infliximab et la réponse ATI.

3-2 Evaluation de l'immunogénicité des domaines variables des anticorps thérapeutiques à partir de données structurales : exemples des anticorps anti-cancéreux et des anticorps anti-TNF- α

3-2-1 Article n°4 : Structure-functions relationships of the variable domains of monoclonal antibodies approved for cancer treatment

Charlotte Magdelaine-Beuzelin, Quentin Kaas, Vanessa Wehbi, Marc Ohresser, Roy Jefferis, Marie-Paule Lefranc, Hervé Watier. *Crit Rev Oncol Hematol.*, 2007, 64, 210–225.

Structure–function relationships of the variable domains of monoclonal antibodies approved for cancer treatment

Charlotte Magdelaine-Beuzelin^{a,b}, Quentin Kaas^c, Vanessa Wehbi^a, Marc Ohresser^a,
Roy Jefferis^d, Marie-Paule Lefranc^c, Hervé Watier^{a,b,*}

^a Université François Rabelais de Tours, EA 3853 “Immuno-Pharmaco-Génétique des Anticorps thérapeutiques”, France

^b CHRU de Tours, Laboratoire d’Immunologie, France

^c IMGT, Laboratoire d’ImmunoGénétique Moléculaire, LIGM, Institut de Génétique Humaine, UPR CNRS 1142, Montpellier, France

^d Immunity and Infection, University of Birmingham, United Kingdom

Accepted 20 April 2007

Contents

1. Chimeric and humanized antibodies	211
2. IMGT Collier de Perles	217
3. Antibody/antigen interactions	219
4. Variable domain genetic analysis	220
5. Immunogenicity	222
Reviewers	223
Acknowledgements	223
References	223
Biographies	224

Abstract

Due to their exquisite specificity for a given epitope on the target antigen, recombinant monoclonal antibodies (rmAb) can deliver “targeted therapy” in oncology. This review focuses on the structural bases of “antigen specificity” to aid clinical researchers and pharmacologists in managing these new drugs. The fine structure of the Fv (Fragment variable) module (combination of VH and VL domains) from the five unconjugated antibodies currently approved for cancer treatment, namely rituximab, cetuximab, alemtuzumab, trastuzumab and bevacizumab, is presented and analysed. Co-crystal and functional studies are reviewed to define rmAb residues contributing to antigen binding site (paratope)–epitope interfaces. The genetic origin of these recombinant monoclonal antibodies, determined through the IMGT/3Dstructure-DB database and IMGT/V-QUEST (<http://imgt.cines.fr>), is presented, allowing the evaluation of homologies between antibodies and their closest germline human counterparts and hence their possible immunogenicity. Overall, the IMGT standards appear as a first and crucial step in the evaluation of recombinant antibodies.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Therapeutic antibodies; Variable domain; Paratope; Epitope; Oncology; Cancer; Rituximab; Cetuximab; Alemtuzumab; Trastuzumab; Bevacizumab; Monoclonal antibody; IMGT

* Corresponding author at: Laboratoire d’Immunologie, Faculté de Médecine, 10 boulevard Tonnellé, 37032 Tours Cedex, France.
Tel.: +33 247 47 38 74; fax: +33 234 38 94 12.

E-mail address: watier@med.univ-tours.fr (H. Watier).

There is an increase pressure in oncology to develop targeted therapies that avoid the numerous side effects associated with conventional chemotherapy. Recombinant monoclonal antibodies (rmAbs) and tyrosine kinase inhibitors (TKI) are the two main classes of drug with potential to provide such therapeutics. TKI are small molecule

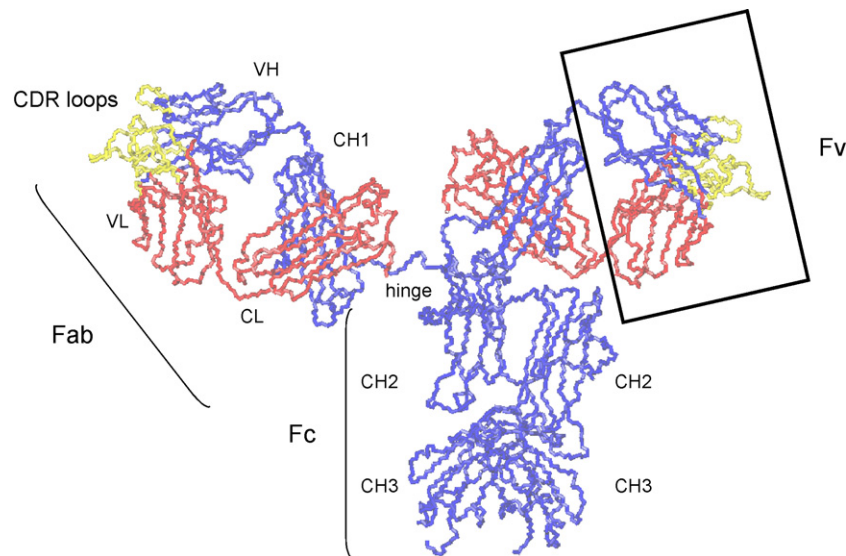


Fig. 1. Three-dimensional structure of a human IgG1 κ . Alpha carbon backbone representation of the monoclonal antibody b12 directed against the HIV envelope glycoprotein gp210, the first and up-to-now the only structure of an entire human IgG1 κ resolved by crystallography [8] (PDB and IMGT/3Dstructure-DB, <http://imgt.cines.fr>: 1hzh). Figure generated with VMD software [9]. The two identical γ 1 heavy chains are indicated in blue and the two identical κ light chains in red, which are linked together with disulfide bonds. The four polypeptide chains are folded into domains: one variable domain (VH) and three constant domains (CH1, CH2, CH3) for the γ heavy chain with the hinge region between CH1 and CH2, and one variable domain (VL) and one constant domain (CL) for the light chain (for κ chain: V-KAPPA and C-KAPPA) (for review [7]). The three arms of the antibody correspond to two Fab (Fragment antigen binding) and one Fc (Fragment crystallized). Each Fab carries one antigen binding site or paratope (CDR loops in yellow) at the top of the Fv (Fragment variable) module (association of the VH and VL, here V-KAPPA, domains). In contrast to schematic, symmetric and fixed Y-shaped representations usually presented in textbooks, this crystal structure illustrates the asymmetry of the antibody, which results from the high degree of freedom of its three arms around the inter-heavy chain disulfide bridges in the hinge region. It allows the molecule to be very flexible: each Fab, and therefore each Fv, may rotate and bend.

drugs that act intracellularly whereas rmAbs are large biomolecules (biopharmaceuticals, *i.e.* recombinant proteins) acting extracellularly, either on membrane bound antigens or antigens of the tumour microenvironment. TKI are not entirely selective for their molecular target as they display some degree of cross-inhibition towards other tyrosine kinase receptors [1,2]; rmAbs are specific for the targeted antigen, which may be expressed on normal tissue in addition to tumour cells. Specificity is the defining characteristic of antibodies due to the various selection processes operative in the development of humoral immune responses. Similarly, rmAbs developed from combinatorial libraries are subject to selection for specificity and increased affinity by *in vitro* techniques that mirror molecular mechanisms operating *in vivo*.

There are currently five unconjugated rmAbs approved for cancer treatment, namely rituximab, cetuximab, alemtuzumab, trastuzumab and bevacizumab, and there is increasing understanding of their mechanism(s) of action, *in vitro* and *in vivo* [3–6]. These rmAbs were generated by molecular engineering with selection for specificity and affinity; however, three-dimensional (3D) structural data have now been published for four of them that allow a more detailed analysis of the structural features that account for specificity. The present review focuses on the structure of the variable domains of these therapeutic antibodies, in relation with their high specificity and affinity for a given epitope on the target antigen. Comparison of the V-REGION sequences

of chimeric and humanized antibodies with those of human sequences allows insights into possible correlations with observed immunogenicity. These insights will inform for the future development of new antibody specificities.

1. Chimeric and humanized antibodies

Technologies for the generation of full human rmAbs have been developed relatively recently and no fully human rmAb has been approved for cancer treatment to-date, however, several are currently in phase III trials.¹ The five unconjugated therapeutic antibodies currently in use in oncology, are rmAbs constructed from genes encoding murine or rat mAb selected for their specificity and based on the format of a human IgG1 κ , *i.e.* the *IGHG1* and *IGKC* genes encoding the constant region of the γ 1 heavy chains and of the κ light chains, respectively, are from human, to decrease their potential immunogenicity. Each has unique VH and VL (V-KAPPA) sequences that “pair” to generate unique Fv (Fragment variable) modules (for review [7]) (Fig. 1).

¹ A fully human antibody, panitumumab (Vectibix®), a human IgG2 kappa rmAb (ABX-EGF) that binds to the human EGFR received FDA approval on 27 September 2006 (after submission of this article). In the absence of 3D structure, the conclusions on the antibody/antigen interactions remains unchanged. Information on the panitumumab sequences and IMGT Collier de Perles will be provided, when available, in The IMGT Biotechnology page, Monoclonal antibodies with clinical indications, <http://imgt.cines.fr>.

Table 1

Presentation of the six rmAbs used in oncology

rmAbs	Main indication	Date of FDA approval ^a , EMA approval ^b	Patent number (available on http://ep.espacenet.com)
Chimeric rmAbs			
cetuximab (Erbix [®])	Treatment of patients with advanced colorectal cancer that has spread to other parts of the body	12 February 2004, 29 June 2004	[49]
rituximab (MabThera [®] , Rituxan [®]) ^c	Treatment of patients with relapsed or refractory low-grade or follicular, B cell non-Hodgkin's lymphoma	26 November 1997, 2 June 1998	[50]
Humanized rmAbs			
alemtuzumab (MabCampath [®])	Treatment of patients with B cell chronic lymphocytic leukemia who have been treated with alkylating agents and who have failed fludarabine therapy	5 July 2001, 6 July 2001	[51]
bevacizumab (Avastin [®])	First-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer	26 February 2004, 12 January 2005	[52]
trastuzumab (Herceptin [®])	Treatment of patients with metastatic breast cancer whose tumours overexpress the HER-2 protein and who have received one or more chemotherapy regimens for their metastatic disease	25 September 1998, 28 August 2000	[53]
Fully human rmAb			
panitumumab (Vectibix [®])	Treatment of EGFR-expressing, metastatic colorectal carcinoma with disease progression on or following fluoropyrimidine-, oxaliplatin-, and irinotecan-containing chemotherapy regimens	27 September 2006	[54]

Indications, date of approval and patent number.

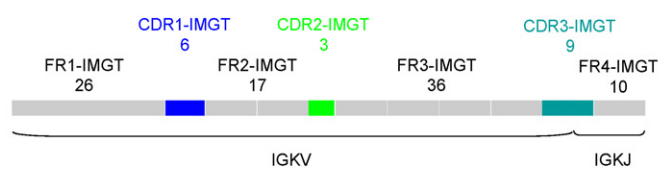
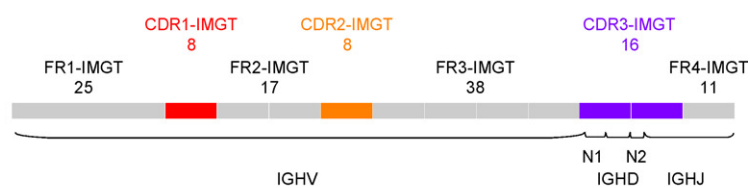
^a FDA: U.S. Food and Drugs Administration (<http://www.fda.gov>).^b EMA: European Medicines Agency (<http://www.emea.eu.int/>).^c Rituxan[®] in USA, Canada and Japan, MabThera[®] in the remaining world.

Depending on the homology of the Fv sequences with human sequences the rmAbs are described as “chimeric” or “humanized”. In “chimeric” rmAbs, the Fv is entirely non-human in origin, *e.g.* mouse for cetuximab and rituximab. In “humanized” rmAbs the complementarity determining regions (CDR), which confer specificity, are of non-human origin (rat or mouse) and replace the CDRs of a human Fv, *i.e.* the framework regions (FR) are of human origin, *e.g.* alemtuzumab, bevacizumab and trastuzumab (Table 1). Besides CDR grafting, more recent humanization technologies have been also developed, such as resurfacing or human engineering [10].

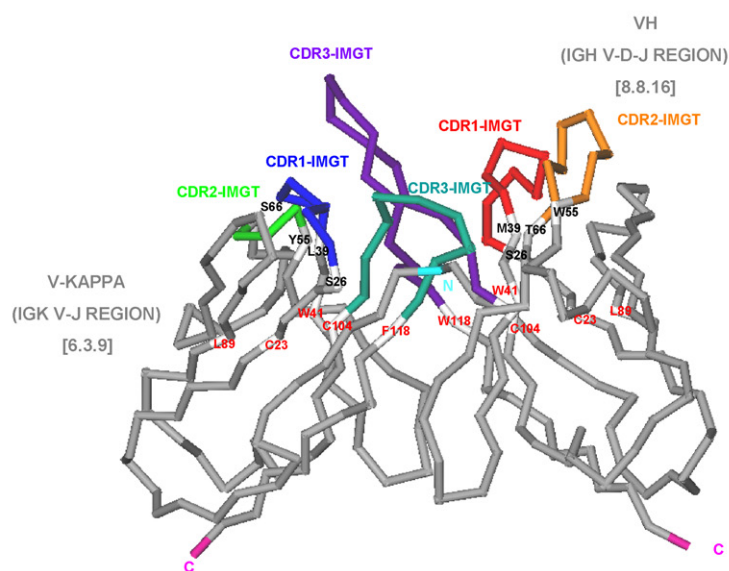
A schematic representation of a Fv is shown in Fig. 2. During the *in vivo* synthesis of an immunoglobulin (IG) in a B cell, the VL domain (here, V-KAPPA) or V-J-REGION results from the rearrangement of a V gene (IGKV) to a J gene

(IGKJ), the VH domain or V-D-J-REGION results from the rearrangement of a IGHV gene, a IGHD gene and a IGHJ gene. In addition to the combinatorial diversity created by these gene rearrangements, the VH V-D-J junction diversity is considerably increased by the N-diversity which results from the trimming of the V-, D- and J-REGION ends to be joined and the random addition of nucleotides by the terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT) [7]. Further diversity is introduced within a secondary immune response by somatic hypermutation of VH and VL sequences. Sequence diversity is particularly focused at the V-J and V-D-J junctions [11] that generate the CDR3 hypervariable regions that have a major role in determining antibody specificity forming contacts with the epitope [12] (Fig. 2). Whatever the species origin, there is no global structural differences in the V domain structure. Therefore, the primary amino acid

Fig. 2. Structure of the Fv of bevacizumab. (A) Linear representation of the two domains V-KAPPA and VH which form the Fv of bevacizumab. The V-KAPPA (V-J-REGION) results from the rearrangement of a IGKV gene and a IGKJ gene. The VH (V-D-J-REGION) results from the rearrangement of a IGHV gene, a IGHD gene and a IGHJ gene. N1 and N2 indicate N-REGIONs not encoded in the germline genes and which result from the N-diversity mechanism at the V-D-J junction (for review [7]). Framework regions (FR) and complementarity determining regions (CDR) alternate. FR and CDR are delimited according to the IMGT unique numbering for V-DOMAIN [13]. The number of amino acid residues is indicated below each FR and CDR. (B) Lateral and (C) top view of the alpha carbon backbone representation of the Fv of bevacizumab [14] (PDB and IMGT/3Dstructure-DB: 1cz8). CDR-IMGT are coloured according to the IMGT colour menu. VH CDR1-IMGT (red), CDR2-IMGT (orange) and CDR3-IMGT (purple); V-KAPPA CDR1-IMGT (blue), CDR2-IMGT (green) and CDR3-IMGT (green blue). The N (cyan) and C (magenta) ends of each region are also coloured. The conserved C23, W41 and L89, and the six FR-IMGT positions limiting the CDR-IMGT regions, also designated as anchor positions (positions 26 and 39 for the CDR1-IMGT, 55 and 66 for the CDR2-IMGT, 104 and 118 for the CDR3-IMGT) are shown in white. Nine antiparallel beta strands (in grey) constitute the FR-IMGT. The folding drives the formation of the CDR-IMGT loops which are localised at the top of the Fv and form the antigen binding site or paratope. The lengths of the CDR-IMGT are indicated between brackets separated by dots, figures are generated using VMD software [9].

(A) V-KAPPA domain (IGK V-J-REGION)VH domain (IGH V-D-J-REGION)

(B)



(C)

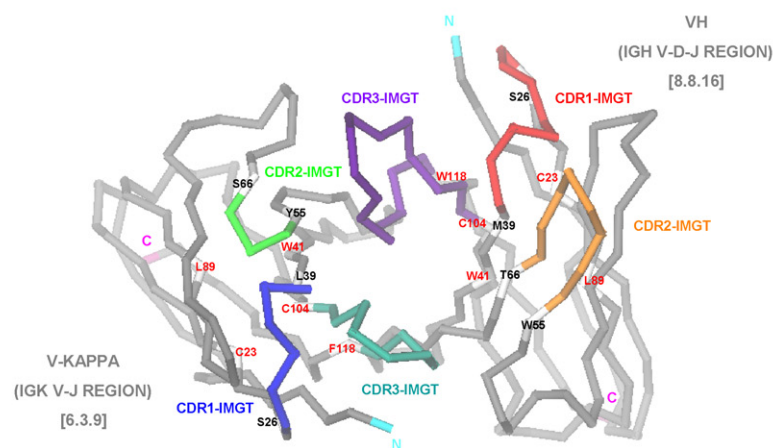


Fig. 2.

VH domain

	FR1-IMGT (1-26)					CDR1-IMGT (27-38)					FR2-IMGT (39-55)					CDR2-IMGT (56-65)					FR3-IMGT (66-104)					CDR3-IMGT (105-117)					FR4-IMGT (118-128)				
	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120																						
cetuximab	QVQLKQSGP	GLVQPSQSL	ITCTVS	GFSL	...TNYG	VHWRQSPGK	GLEWLG	IWSG	...GNT	DYNTFFT	SRLSINKD	NSKQVFF	KMNSLQ	SNDTAIYYC	ARALTYG	...DYEFAY	WGQGLTV	TVSA																	
rituximab ¹	QVQLKQPGA	ELVQPGAS	VKMSCKAS	GYTF	...TSYN	MHWVKQTP	GRGLEWIG	IYPG	...NGDT	SYNQKFK	GKATLTAD	KSSSTAYM	QLSSLT	SEDSAVYYC	ARSTYVG	...GDWYFNV	WGAGT	TVTVSA																	
alemtuzumab ²	QVQLKQSGP	GLVQPSQSL	ITCTVS	GFTF	...TDH	MNWRQPPG	RGRLEWIG	IRDKA	...GYTT	EYNPSVK	GRVTMLVD	TSKNQFSL	RSLSSV	TAADTAIYYC	ARSTYVG	...AAPPFY	WGQGLTV	TVSS																	
bevacizumab	EVQLVESGG	GLVQPGGSL	RLSCAAS	GYTF	...TNYG	MNWRQAPG	KGLEWVG	INTY	...TGEP	TYAADFK	RRFTFSLD	TSKSTAYL	QMNSLRA	EDTAIYYC	ARYTHYMG	SHWYFDV	WGQGLTV	TVSS																	
trastuzumab ³	EVQLVESGG	GLVQPGGSL	RLSCAAS	GFNI	...KDTY	IHWVRQAPG	KGLEWVAR	IYPT	...NGYT	RYADSVK	GRFTISAD	TSKNTAYL	QMNSLRA	EDTAIYYC	SRWGGG	...FYAMDY	WGQGLTV	TVSS																	
pertuzumab	EVQLVESGG	GLVQPGGSL	RLSCAAS	GFTF	...TDH	MDWVRQAPG	KGLEWVAD	VNPN	...SGGS	IYNQRFK	GRFTLSVD	RSKNTLYL	QMNSLRA	EDTAIYYC	ARNLDF	...SEYFDY	WGQGLTV	TVSS																	
panitumumab	...VS	GGSVS	...SGDY	WTWIRQSPG	KGLEWIGH	IYYS	...GNT	NYNPSLK	...SRLT	ISIDTSKTQ	FSLKSSV	TAADTAIYYC	VRDRVT	...GAFDI	WGQGLTV	TVSS																			

V-KAPPA domain

	FR1-IMGT (1-26)					CDR1-IMGT (27-38)					FR2-IMGT (39-55)					CDR2-IMGT (56-65)					FR3-IMGT (66-104)					CDR3-IMGT (105-117)					FR4-IMGT (118-128)				
	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120																						
cetuximab	DILLTQSP	VLIVSVSP	GERVFS	CRAS	QSI	...GTN	IHWYQRT	NGSPRL	LK	YA	...S	ESISGIP	SRFSGSG	...SGTDF	TLSSINS	VESEDI	ADYYC	QQNNN	...VPTT	FGAGTK	LEIK														
rituximab	QIVLSQSP	PAILLSAS	PGKVTMT	CRAS	SSV	...SY	IHWYQRT	NGSPRL	LK	YA	...S	ESISGIP	SRFSGSG	...SGTDF	TLSSINS	VESEDI	ADYYC	QQNNN	...VPTT	FGAGTK	LEIK														
alemtuzumab	DIQMTQSP	SSLSASV	GDRVTIT	CRAS	QNI	...DKY	LNWYQK	PGKAPK	LLIY	NT	...N	NLQGTVP	SRFSGSG	...SGTDF	TLSSINS	VESEDI	ADYYC	QQNNN	...VPTT	FGAGTK	LEIK														
bevacizumab	DIQMTQSP	SSLSASV	GDRVTIT	CRAS	QDI	...SNY	LNWYQK	PGKAPK	LLIY	FT	...S	SLHSGVP	SRFSGSG	...SGTDF	TLSSINS	VESEDI	ADYYC	QQNNN	...VPTT	FGAGTK	LEIK														
trastuzumab	DIQMTQSP	SSLSASV	GDRVTIT	CRAS	QDV	...NTA	VAWYQK	PGKAPK	LLIY	SA	...S	FLYSGVP	SRFSGSG	...SGTDF	TLSSINS	VESEDI	ADYYC	QQNNN	...VPTT	FGAGTK	LEIK														
pertuzumab	DIQMTQSP	SSLSASV	GDRVTIT	CRAS	QDV	...SIG	VAWYQK	PGKAPK	LLIY	SA	...S	YRYTGVP	SRFSGSG	...SGTDF	TLSSINS	VESEDI	ADYYC	QQNNN	...VPTT	FGAGTK	LEIK														
panitumumab	...TITQAS	QDI	...SNY	LNWYQK	PGKAPK	LLIY	DA	...S	NLETGVP	SRFSGSG	...SGTDF	TLSSINS	VESEDI	ADYYC	QHFDPH	...LPLA	FGAGTK	LEIK																	

¹In WO9411026 patent, P15 > A15.²In US5846534 patent, F28 > S28 and T35 > S35.³In US5821337 patent, Y117 > V117.⁴In US5821337 patent, Y68 > E68.

Fig. 3. IMGT protein displays of the VH and V-KAPPA domains of the cetuximab, rituximab, alemtuzumab, bevacizumab, trastuzumab, pertuzumab and panitumumab antibodies. Amino acid sequences are from 1yy9 (cetuximab), AX556949 and AX556951 (rituximab VH and V-KAPPA), 1ce1 (alemtuzumab), 1cz8 (bevacizumab), 1n8z (trastuzumab), 1s78 (pertuzumab), and DD214915 and DD214916 (panitumumab). Amino acid differences with patents from Table 1 are indicated. FR-IMGT and CDR-IMGT delimitations and gaps, represented by dots, are defined according to the IMGT unique numbering for V-DOMAIN [13]. The N-glycosylation site motifs in the cetuximab VH and V-KAPPA are underlined but only the VH motif is glycosylated (see text). Amino acids identified in IMGT/3Dstructure-DB [22] as having hydrogen bonds with the antigens (EGFR for cetuximab, CD52 mimotope for alemtuzumab, VEGF for bevacizumab, ERBB2 for trastuzumab and pertuzumab) (Table 2) are shown in boxes. The numbers 1 2 1 in the VH CDR3-IMGT numbering correspond to the additional positions 111.1, 112.2 and 112.1, respectively [13].

sequences of the VH and V-KAPPA of the five unconjugated anti-cancer mAbs can be aligned and are displayed in Fig. 3 using the IMGT unique numbering and definition of the FR-IMGT and CDR-IMGT [13].

In a “chimeric” antibody (e.g. rituximab and cetuximab), the original specificity of the murine antibody is conserved since the murine variable domains are unmodified. In a “humanized” antibody (e.g. alemtuzumab, bevacizumab and trastuzumab), only the CDRs of the original rat or murine antibody are retained, being grafted into human framework gene sequences, thus conferring the specificity of the original rat or murine antibody to a human antibody. Humanization was introduced in order to reduce the potential immunogenicity of the rat or murine variable domains [15].

When designing a humanized antibody it is important to select human VH and VL framework regions with highest homology to the original rat or murine ones in order to maintain the 3D orientation of the CDR loops [16,17]. This is usually achieved by comparing the sequences of the variable domains of the selected rat or murine monoclonal antibody to human sequences and 3D structures available in databases. It should be emphasized that the three humanized antibodies were designed using the Kabat system for defining the CDRs [18] before the CDR-IMGT standardization was available [13,19,20]. As a consequence the initial humanized form of the Campath antibody lacked specificity and affinity, therefore alemtuzumab was “designed” with mutations at two positions [21] which were thought to be FR but which clearly

Fig. 4. IMGT Colliers de Perles of the VH and V-KAPPA domains of the alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, trastuzumab, rituximab and pertuzumab antibodies. IMGT Colliers de Perles are shown on one layer and two layers. Amino acids are shown in the one-letter abbreviation. Positions at which hydrophobic amino acids (hydropathy index with positive value: I, V, L, F, C, M, A) and tryptophan (W) are found in more than 50% of analysed sequences are shown in blue. All proline (P) are shown in yellow. The CDR1-IMGT (BC loop), CDR2-IMGT (C'C'' loop) and CDR3-IMGT (FG loop) are limited by amino acids shown in squares (anchor positions), which belong to the neighbouring strands (FR-IMGT in V-DOMAINS). Arrows indicate the direction of the beta strands and their designations in 3D structures (from IMGT Repertoire, <http://imgt.cines.fr>) [25]. For the VH domains, CDR1-IMGT is in red, CDR2-IMGT is in orange and CDR3-IMGT is in purple. For the VL domains (here V-KAPPA), CDR1-IMGT is in blue, CDR2-IMGT is in green and CDR3-IMGT is in green blue [25]. The IMGT Colliers de Perles on two layers show, on the forefront, the GFCC'C'' strands and, on the back, the ABED strands. Hatched circles correspond to missing positions according to the IMGT unique numbering for V-DOMAIN [13]. IMGT Colliers de Perles are from IMGT/3Dstructure-DB entries (chain entry identifiers are shown between parentheses), or obtained, for rituximab whose 3D structure is not available, using the IMGT/Collier de Perles tool at the IMGT/3Dstructure-DB Query page [22]. Amino acid one-letter abbreviation: A (Ala), alanine; C (Cys), cysteine; D (Asp), aspartic acid; E (Glu), glutamic acid; F (Phe), phenylalanine; G (Gly), glycine; H (His), histidine; I (Ileu), isoleucine; K (Lys), lysine; L (Leu), leucine; M (Met), methionine; N (Asn), asparagine; P (Pro), proline; Q (Gln), glutamine; R (Arg), arginine; S (Ser), serine; T (Thr), threonine; V (Val), valine; W (Trp), tryptophan; Y (Tyr), tyrosine.

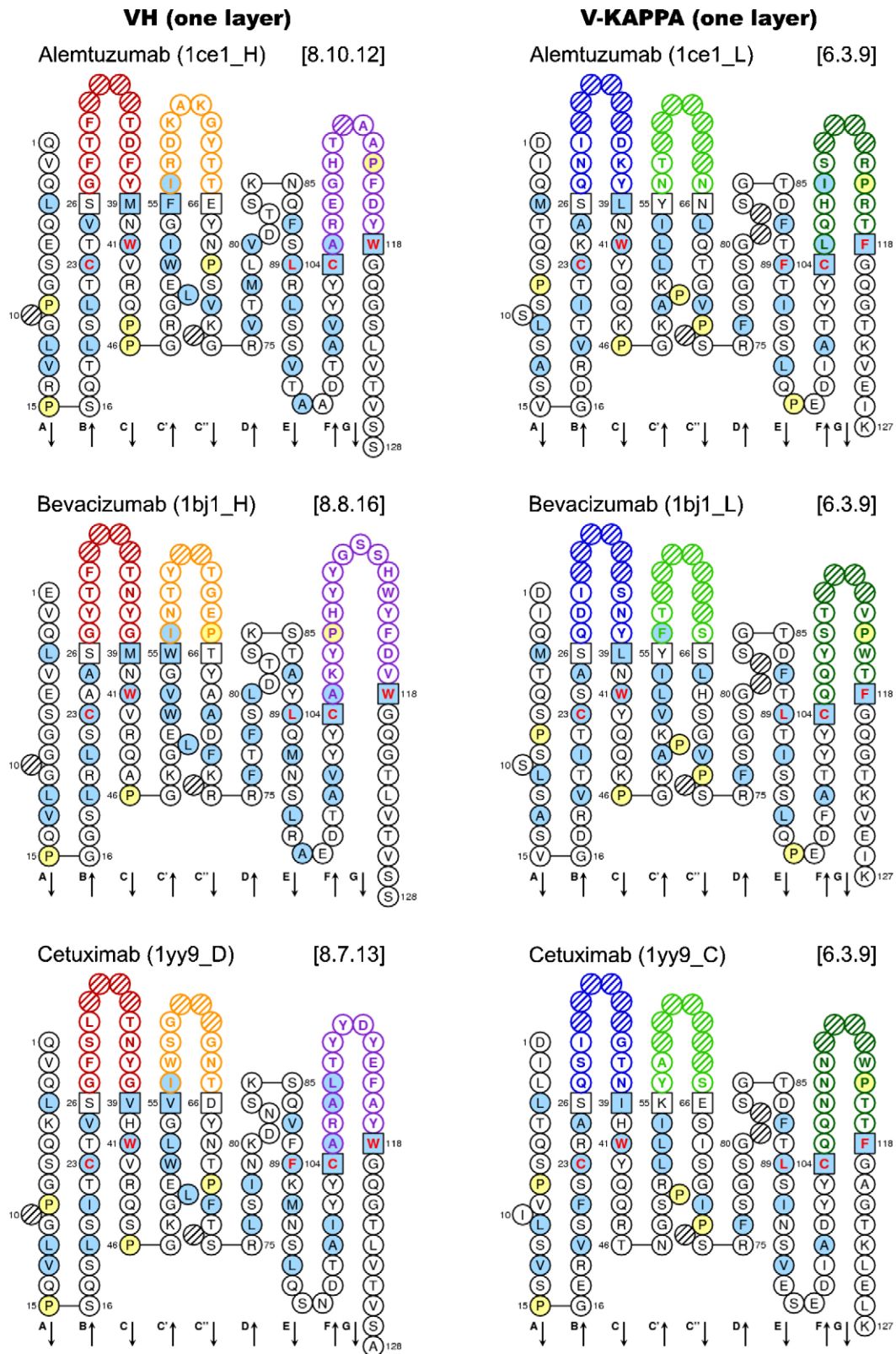


Fig. 4. (Continued)

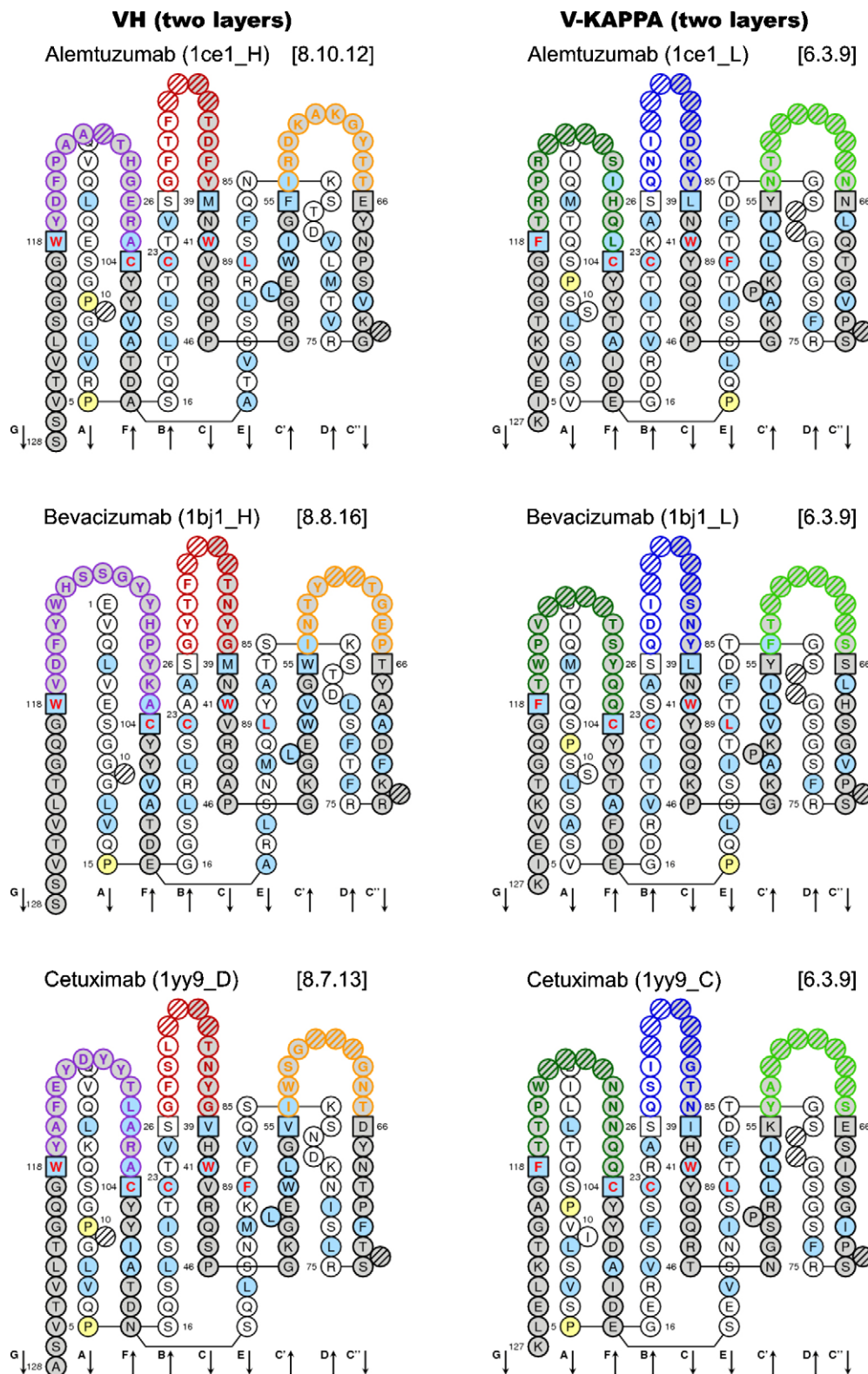


Fig. 4. (Continued)

belong to the CDR1-IMGT (positions 28 and 35 according to the IMGT unique numbering for V-DOMAIN [13]) (Fig. 3). Moreover, positions 66–74 of VH and positions 66–69 of V-KAPPA were grafted from rat onto human genes [15] as

they were thought to be CDR but they clearly belong to the FR-IMGT, and keeping these positions as “human” in rmAbs would probably diminish their potential immunogenicity (for sequences of the original rat and humanized Campath vari-

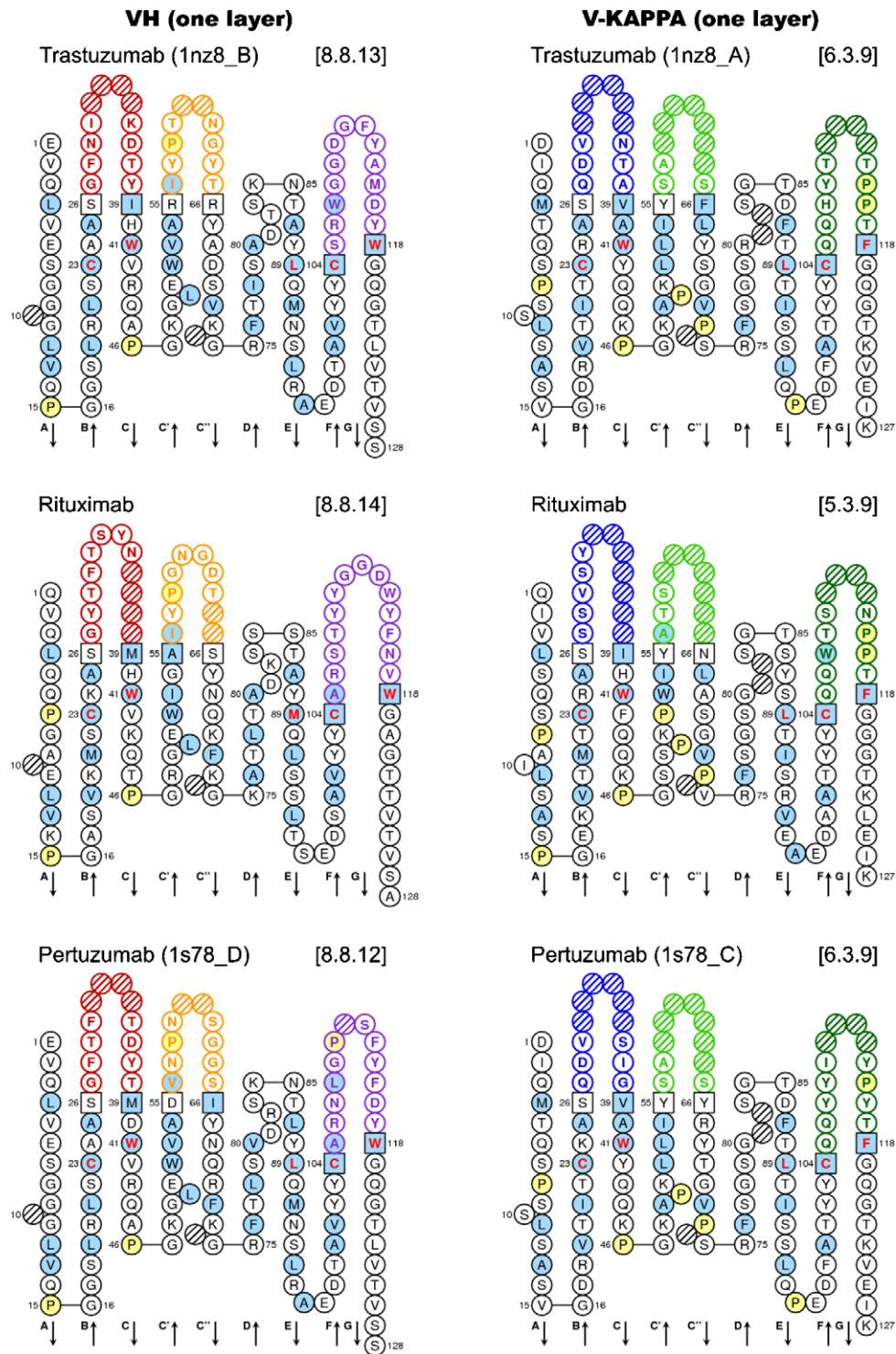


Fig. 4. (Continued)

able domains, see “Antibody humanization” in The IMGT Biotechnology page, <http://imgt.cines.fr>). This observation is confirmed by the fact that alemtuzumab can be captured by an anti-rat IgG specific antibody in an ELISA, not supposed to recognise the alemtuzumab idiotype beared by the CDRs [23].

2. IMGT Collier de Perles

The IMGT Colliers de Perles are two-dimensional (2D) standardized graphical representations of amino acid sequences of domains [13,24], and more particularly of V-DOMAINS [13,25]. The IMGT Colliers de Perles of the

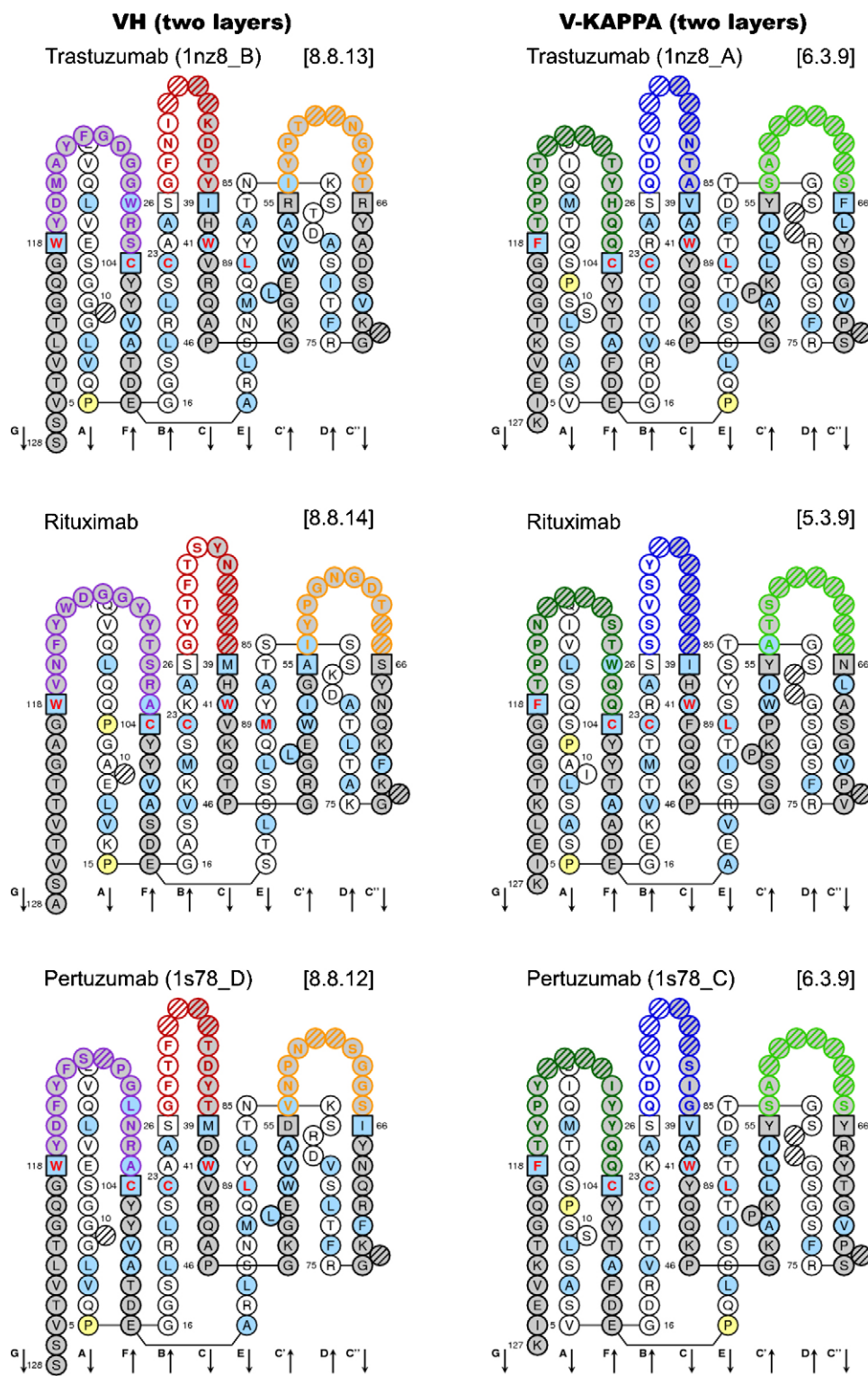


Fig. 4. (Continued).

VH and V-KAPPA of the five rmAbs are shown in Fig. 4. The IMGT Collier de Perles on one layer allows to readily define the FR-IMGT beta strands and the CDR-IMGT loops in the amino acid sequence of the variable domains. This emphasizes the usefulness of the IMGT Collier de Per-

les in designing humanized antibodies since the CDR-IMGT loops are the regions which need to be considered for the humanization. The CDR1-IMGT and CDR2-IMGT anchor positions need also to be checked as they determine the orientation of the CDR loops. The IMGT Collier de Per-

two layers shows the relative localisation of the strands and loops in space even if 3D structures are not yet available (for example, rituximab). For known 3D structures, they allow the display of hydrogen bonds in IMGT/3Dstructure-DB, <http://imgt.cines.fr>, and they give access to the contacts of each amino acid (IMGT Residue@Position card) by clicking on a given position in the IMGT Collier de Perles [22].

Glycosylation sites are observed in ~15% of normal human V regions, therefore, it is of interest to note that both the VH and V-KAPPA sequences of the cetuximab include a glycosylation site motif [N-X-T/S] (where X is any amino acid except proline) whereas none is observed in the other rmAbs (Fig. 3). The two motifs are opposite to the CDR loops. The motif localised at position 97 (at the tip of the EF loop) in the cetuximab VH is glycosylated and bears a complex diantennary oligosaccharide structure containing a very diverse mixture of glycans as usually observed for other rmAbs at the Fab domain [26], however, the motif at position 47 (at the CC' beta turn) in the V-KAPPA is unoccupied (Jefferis R, et al., unpublished data). Indeed, glycosylation is only effective in two thirds of potential *N*-glycosylation sites. When present in Fv regions, *N*-glycosylation has been reported to have a positive, negative or neutral impact on specificity, affinity, stability, solubility, etc. [27]. In the particular case of cetuximab, VH *N*-glycosylation probably does not interfere with antigen binding site since it is localised at the opposite side of the paratope, but may contribute to the immunogenicity of framework regions of this antibody since cetuximab is produced in rodent cells and could bear terminal residues (e.g. Galα(1 → 3) or Neu5Gc) not present in the human species.

3. Antibody/antigen interactions

To date, the 3D structure of bevacizumab in complex with the vascular endothelial growth factor, VEGF [14], of cetuximab in complex with the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor, EGFR (ERBB1) [6] and

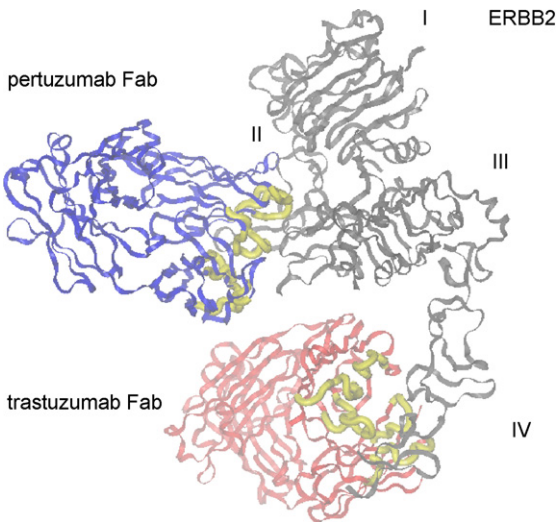


Fig. 5. Superimposition of trastuzumab Fab-ERBB2 and pertuzumab Fab-ERBB2 co-crystal structures. The ribbon structure of the extracellular domain of ERBB2 (also called NEU/HER-2) in grey shows that it is divided into four domains: I is the most distal and IV the most proximal from the cell membrane. Trastuzumab Fab [28] (PDB and IMGT/3Dstructure-DB: 1v8z) and pertuzumab Fab [29] (PDB and IMGT/3Dstructure-DB: 1s78), 3D structures are indicated in red and blue, respectively. The CDR loops of each antibody are represented as yellow tubes, connected to the framework regions of the variable domains represented as ribbons. The two antibodies are directed against two different epitopes on the receptor, on domain II for pertuzumab and on domain IV for trastuzumab. Figure generated with VMD [9].

of trastuzumab in complex with the extracellular domain of ERBB2 (also called NEU/HER-2) (Fig. 5) [28] have been reported. Most of the contact residues of bevacizumab with VEGF are located in the three CDR-IMGT loops of the VH domain, particularly the VH CDR3-IMGT [30] (Fig. 2B and Table 2). The epitope targeted by bevacizumab partly overlaps VEGF residues that interact with the binding to VEGFR1 (Flt-1, FLT1) and VEGFR2 (FLK1, KDR), the two VEGF receptors [14].

The 3D structures of the anti-EGFR cetuximab [6] and of the anti-ERBB2 trastuzumab [28], together with that

Table 2
Amino acids of rmAbs involved in hydrogen bonds with the antigens, from IMGT/3Dstructure-DB, <http://imgt.cines.fr>

rmAbs ^a	Number of H bonds ^b	VH			V-KAPPA	
		CDR1-IMGT	CDR2-IMGT	CDR3-IMGT	CDR1-IMGT	CDR3-IMGT
cetuximab (1yy9)	6 (5 + 1)		59G	<u>111Y</u> 112D 113Y		114W
alemtuzumab (1ce1)	14 (9 + 5)	<u>38Y</u>	<u>57R</u> 61K	107E 109H 110T		<u>107H</u> 114R <u>116R</u>
bevacizumab (1bj1)	14 (14 + 0)	38G	55W <u>58T</u>	107Y 108P <u>109Y</u> <u>110Y</u> <u>111L</u> <u>112L</u> <u>11S</u>		
trastuzumab (1n8z)	6 (2 + 4)		55R	<u>111G</u>	<u>36N</u>	108Y 114T
pertuzumab (1s78)	9 (9 + 0)	36D 37Y	57N 58P <u>59N</u>	110P 114Y		

Amino acid positions and CDR-IMGT delimitations are according to the IMGT unique numbering for V-DOMAIN [13]. Amino acids involved in one, two or three H bonds are not underlined, single underlined or double underlined, respectively. Amino acids involved in H bonds are shown in boxes in Fig. 3.

^a IMGT/3Dstructure-DB entries (same code as PDB) are shown between parentheses.
^b Hydrogen (H) bond identification is from IMGT/3Dstructure-DB contact analysis [22], <http://imgt.cines.fr>. Total number of H bonds is shown with, between parentheses, number of H bonds for VH and V-KAPPA.

of another anti-ERBB2 currently under development (pertuzumab) [29] allow a comprehensive description of the functional domains of this family of receptors. Cetuximab binds the domain III of the EGFR, mainly through its VH CDR2-IMGT and CDR3-IMGT. More particularly, tyrosine 111 in VH CDR3-IMGT (Fig. 3 and Table 2) protrudes into a pocket located in domain III of EGFR. By binding to this particular epitope, cetuximab blocks the interaction of EGF with its receptor, hence the antagonist activity of cetuximab [6].

Pertuzumab binds the domain II of ERBB2, a domain involved in the pairing of ERBB2 with other members of the ERBB family [29], through the three VH CDR-IMGT (Table 2). Since heterodimerization of ERBB2 is required for signalling, pertuzumab acts as an “indirect” antagonist of ERBB2 partners [6].

Trastuzumab recognises three loops on domain IV of ERBB2 [28], a domain which lies very close to the cell membrane (Fig. 5). CDR3-IMGT of both VH and V-KAPPA seem to be involved in this interaction by the formation of a pocket [28], but no more details are available about the residues required for the recognition of the epitope (Table 2). The domain IV of ERBB2 is probably subjected to the action of one or several metalloproteases as ADAM17 (TACE) [30] or MMP-15 (Slikowski M, pers. commun.) whose functions are to cleave ERBB2 and to release its ectodomain in the microenvironment. This soluble ectodomain may serve as decoy for trastuzumab, and decreases its clinical efficacy [31]. Interestingly, it has been shown that trastuzumab, but not pertuzumab, inhibits ERBB2 shedding by steric hindrance. One of the cleavage sites on ERBB2 has been identified and localised to a membrane proximal region very close to the epitope bound by trastuzumab [32]. However, there is no clear relation between the fact that trastuzumab blocks ERBB2 shedding and the precise mechanism of action of trastuzumab which is only active on tumours overexpressing ERBB2. The most common hypotheses are that trastuzumab prevents ERBB2 homodimerization and/or induces receptor internalisation, which ultimately lead to an arrest in ERBB2 signalling [28].

The 3D structure of alemtuzumab in complex with a synthetic peptide mimicking its natural antigen CD52 is also available; the natural CD52 ligand is a highly glycosylated and glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) anchored short polypeptide [33]. The ability of alemtuzumab to bind a peptidic mimic of CD52 [33] depends on the three VH CDR-IMGT and a noticeable contribution of V-KAPPA CDR3-IMGT (Table 2). No distinctive biological function has yet been assigned to the CD52 molecule and alemtuzumab does not seem to have antagonistic or agonistic activities on CD52-expressing cells; therefore the activity of alemtuzumab is assumed to be the recruitment of immune effector mechanisms [34].

The 3D structure of rituximab, one of the most widely used anti-cancer mAb, has not been determined. This is probably explained by the nature of its target antigen, the

membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1, MS4A1 (CD20), which has four hydrophobic transmembrane regions. Binding of rituximab to CD20 is highly dependent on the presence of alanine at position 170 and proline at position 172 in the extracellular loop of CD20 [35,36]. Studies of the interaction of rituximab with soluble recombinant CD20 [37] also demonstrate that the binding of rituximab is dependent upon the oxidation state of cysteines in the extracellular domain of the CD20 protein, *i.e.* binding is ablated for reduced and alkylated CD20, but further structural studies are strongly awaited.

Overall, these structural data show that VH and particularly its CDR3-IMGT rather than V-KAPPA contribute to antibody/antigen interaction, particularly because more hydrogen bonds are created with this VH domain. Based on these observations, therapeutic antibodies follow the general rule of antibodies.

4. Variable domain genetic analysis

The variable domains of the antibodies were analysed using IMGT/3Dstructure-DB [22] for the amino acid sequences and 3D structures and IMGT/V-QUEST [38] for the nucleotide sequences (IMGT®, the international ImMunoGeneTics Information System®, <http://imgt.cines.fr> (Founder and director: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, France)) [39]. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/V-QUEST identify the closest V, (D) and J genes and delimit the FR-IMGT and CDR-IMGT delimitations (Fig. 2A and Table 3). IMGT/V-QUEST compares the nucleotide sequences with the IMGT mouse or human germline reference directory, which comprises one reference sequence for each gene and allele of the mouse (IMGT Repertoire) or human [7] repertoires from IMGT/GENE-DB; <http://imgt.cines.fr> [40].

The variable domains of the chimeric antibodies, cetuximab and rituximab, were compared to the IMGT murine reference directory (Table 2). The cetuximab VH derives from the mouse *IGHV2-2*02*, *IGHD2-4*01* and *IGHJ3*01* genes and the rituximab VH derives from the mouse *IGHV1-12*01*, *IGHD1-2*01* and *IGHJ1*01* genes (Table 3). Concerning the light chains, the cetuximab V-KAPPA derives from the mouse *IGKV5-48*01* and *IGKJ5*01* genes, and the rituximab V-KAPPA derives from the mouse *IGKV4-72*01* and *IGKJ2*01* genes (Table 3).

The comparison of the V-REGION of the VH and V-KAPPA nucleotide sequences with the IMGT/V-QUEST germline sequences allows the identification of residues that result from somatic hypermutations that occurred in the donor mouse. Cetuximab is highly mutated since there are seven somatic hypermutations in the IGH V-REGION, all of them leading to amino acid (aa) changes (1 in CDR1-IMGT, 1 in CDR2-IMGT and 5 in FR3-IMGT) and five mutations in the *IGK* V-REGION, four of them leading to aa changes (1 in FR1-IMGT, 1 in CDR1-IMGT and 2 in CDR3-IMGT). Interestingly, six of the aa replacements (3 in VH and 3

Table 3
IMGT V, (D) and J genes involved in the building of rmAbs used in oncology

Antibodies	IMGT/3Dstructure-DB			VH		V-KAPPA	
	IMGT protein name	Fab	Fab in complex	IGHV, IGHD and IGHJ genes	CDR-IMGT lengths	IGKV and IGHJ genes	CDR-IMGT lengths
Chimeric antibodies: comparison with mouse (<i>Mus musculus</i>) germline V, (D) and J genes							
cetuximab (Erbix [®])	Fab C225, IMC-225	1yy8	1yy9 (with EGFR)	<i>IGHV2-2*02</i> (92.78%) (55.10% human <i>IGHV3-33</i>), <i>IGHD2-4*01 IGHJ3*01</i> (93.33%) (80% human <i>IGHJ4</i>)	[8.7.13]	<i>IGKV5-48*01</i> (95.79%) (66.32% human <i>IGKV6-21</i>), <i>IGKJ5*01</i> (91.66%) (75% human <i>IGKJ2</i>)	[6.3.9]
rituximab (MabThera [®] , Rituxan [®])	IDEC-C2B8	^a	^a	<i>IGHV1-12*01</i> (92.70%) (72.45% human <i>IGHV1-46</i>), <i>IGHD1-2*01 IGHJ1*01</i> (82.35%) (64.70% human <i>IGHJ2</i>)	[8.8.14]	<i>IGKV4-72*01</i> (95.79%) (61.46% human <i>IGKV3-20</i>), <i>IGKJ2*01</i> (91.66%)(83.33% human <i>IGKJ2</i>)	[5.3.9]
Humanized antibodies: comparison with human (<i>Homo sapiens</i>) germline V and J genes. The IGHD genes are derived from mouse or rat and are not shown							
alemtuzumab (MabCampath [®])	CAMPATH-1H	1bey	1ce1 (with CD52 mimotope)	<i>IGHV4-59*01</i> (73%), <i>IGHJ4*01</i> (92.86%)	[8.10.12]	<i>IGKV1-33*01</i> (86.32%), <i>IGKJ1*01</i> (91.66%)	[6.3.9]
bevacizumab (Avastin [®])	Fab-12		1bj1 (with VEGF)	<i>IGHV7-4-1*02</i> (72.40%), <i>IGHJ2*01</i> (82.35%)	[8.8.16]	<i>IGKV1-33*01</i> (87.40%), <i>IGKJ1*01</i> (100%)	[6.3.9]
trastuzumab (Herceptin [®])	Herceptin, 4D5v8		1n8z (with ERBB2)	<i>IGHV3-66*01</i> (81.63%), <i>IGHJ6*01</i> (76.47%)	[8.8.13]	<i>IGKV1-39*01</i> (86.32%), <i>IGKJ1*01</i> (91.66%)	[6.3.9]
Fully human antibody: comparison with human (<i>Homo sapiens</i>) germline V, D and J genes							
panitumumab (Vectibix [®])	ABX-EGF E7.6.3	^b	^b	<i>IGHV4-61*01</i> (86.84%) ^b , <i>IGHD3-3*01</i> or <i>*02 IGHJ3*02</i> (93.75%)	[10.7.11]	<i>IGKV1-33*01</i> (94.73%) ^b , <i>IGKJ4*01</i> (91.66%)	[6.3.9]

Percentage of identity was calculated by comparison of the amino acid sequences with the closest mouse or human V-REGION and J-REGION. V-REGIONS were compared from position 1 to 106 for VH and from position 1 to 111 for V-KAPPA, using IMGT/DomainGapAlign at the IMGT Home page, <http://imgt.cines.fr>. Given the short length of the J-REGION (12–17 amino acids), the percentages are only given as an indication.

^a There is no 3D structure available for rituximab Fab. Sequences are from IMGT/LIGM-DB: AX556949 (heavy chain) and AX556951 (κ chain).

^b There is no 3D structure available for panitumumab. Sequences are from IMGT/LIGM-DB: DD214915 (VH) and DD214916 (V-KAPPA). Note that the N-terminal 23 and 19 amino acids (and codons) are missing in the VH and V-KAPPA sequences, respectively and in the patents and could not be analysed.

in V-KAPPA) correspond to serine to asparagine (S>N) change.

For rituximab, there are 20 mutations in the IGH V-REGION, affecting 16 codons, and leading to 10 aa changes (5 in FR1-IMGT, 3 in FR2-IMGT and 2 in FR3-IMGT) and 5 mutations in the IGK V-REGION, 4 of them leading to aa changes (2 in FR2-IMGT, 1 in FR3-IMGT and 1 in CDR3-IMGT).

This kind of somatic mutation analysis is not meaningful with humanized antibodies because of their construction. However it is interesting to compare the humanized genes with the closest human genes, using IMGT/DomainGapAlign. In their present form, the humanized antibodies alemtuzumab, bevacizumab and trastuzumab IGH V-REGIONS have a percentage of identity at the amino acid level of 73%, 72% and 81% with the closest germline human *IGHV4-59*01*, *IGHV7-4-1*02* and *IGHV3-66*01*, respectively (Table 3). The three humanized antibodies IGK V-REGIONS have a similar percentage of identity of 86–87% at the amino acid level with the closest germline human *IGKV1-33*01* for alemtuzumab and bevacizumab, and with *IGKV1-39*01* for trastuzumab (Table 3).

Deciphering the genetic origin of VH and V-KAPPA domains were successful for each rmAb studied, nicely illustrating the fundamental processes of repertoire maturation. The potential divergence of these newly generated sequences from their human germline counterparts also raise the question of their potential immunogenicity.

5. Immunogenicity

The comparison of the murine V-REGION and J-REGION sequences of VH and V-KAPPA from chimeric antibodies with the IMGT human reference directory is shown in Table 3. The percentages of identity are significantly lower than those obtained when compared with the IMGT mouse reference directory, and illustrate the inter-species divergence at the level of the variable domains. For a more precise evaluation of the inter-species differences between the frameworks, we compare the amino acid sequences of the four FR-IMGT (FR1-IMGT: positions 1–26, FR2-IMGT: 39–55, FR3-IMGT: 66–104, and FR4-IMGT: 118–128 for VH or 127 for V-KAPPA) of each murine V domain with the closest human sequence found (Table 3). We used IMGT/DomainGapAlign (<http://imgt.cines.fr>) at the IMGT Home page for comparison of the FR1-, FR2- and FR3-IMGT, and the Alignment of alleles IGHJ and IGKJ (Overview) in IMGT Repertoire for comparison of the FR4-IMGT. We observed 59.34% (54/91 aa) and 70.78% (63/89 aa) identity for the four FR-IMGT of the cetuximab VH and V-KAPPA domains, respectively, and 74.72% (68/91 aa) and 67.41% (60/89 aa) identity for the four FR-IMGT of the rituximab VH and V-KAPPA domains, respectively. Despite this sequence divergence in the FR that could reinforce immunogenicity of the idiotype itself, these two antibodies are not

really immunogenic in cancer patients [41]. This could be due to the fact that their immune system is compromised and/or that they may be receiving cytotoxic drugs. In fact, human anti-chimeric antibodies (HACA) are observed in a higher percentage of patients receiving rituximab for an autoimmune disease [42]. Nevertheless, it should be mentioned that only some patients develop HACA. Since many factors external to the drug itself have been described to influence immunogenicity [43], it is therefore difficult to assign to any threshold of dissimilarity between the murine and human rmAbs proteins a role in the induction of a neutralizing response. When information will be available from large cohorts of patients, particularly from clinical studies comparing different rmAbs administered to similar patients, with identical regimens, it could become possible to find some correlation between the immunogenicity of a given rmAb and the global percentage of identity and physico-chemical characteristics of amino acids exposed at the surface of VH and VL domains in comparison to those truly expressed in humans, taking into account mutations observed in expressed repertoires [44]. The variability of anti-drug responses in patients depends on both accessibility of B cell epitopes and the processing of T cell epitopes by the highly polymorphic HLA class II molecules. Potential T cell epitopes within rmAbs primary sequences and their interaction with HLA class II molecules can now be mapped *in silico*, and this approach could be in an attempt to predict rmAbs immunogenicity [45].

Very logically, when VH and V-KAPPA sequences from humanized antibodies are compared with the IMGT human reference directory the percentage of identity appears higher than when chimeric rmAbs are analysed with the same directory (Table 3). When comparing the four FR-IMGT of the humanized sequence with the closest human sequences found, as described above, we observed, for the VH and V-KAPPA, respectively, 84.61% (77/91 aa) and 97.75% (87/89 aa) for alemtuzumab, 74.72% (68/91 aa) and 92.13% (82/89 aa) for bevacizumab, and 90.10% (82/91 aa) and 93.25% (83/89 aa) for trastuzumab. It is worthwhile to note that, whereas the FR percentage of identity is superior to 90% for four of six domains, this percentage is 84.61% for the alemtuzumab VH and only 74.72% for the bevacizumab VH, a percentage similar to that observed in the chimeric rituximab.

The humanized rmAbs are also weekly immunogenic in cancer patients [46], as are chimeric antibodies. Several studies have shown that humanization decreases but does not eliminate immunogenicity problems [47,48]. However, a rigorous comparison between a chimeric antibody and its humanized counterpart in humans in terms of immunogenicity remains crucially lacking.

In a first step, IMGT standardized criteria for statistical analysis, based on the definition of 11 IMGT amino acid chemical characteristics classes, have provided IMGT Colliers de Perles statistical profiles for the human expressed IGHV and IGKV repertoires [44]. Amino acid assignment of the chimeric and humanized rmAbs IMGT Colliers de Perles (Fig. 4) to IMGT aa chemical classes was compared

to the FR-IMGT positions which define the human IGHV and IGKV chemical profiles (41 and 59 positions at >80% threshold, respectively, see Plate 3 in [44]). Despite marked differences in the percentage of similarity as discussed earlier, there are no marked differences in IMGT chemical classes for the VH of humanized (0: trastuzumab; 1: bevacizumab; 2: alemtuzumab) and chimeric (1: cetuximab; 2: rituximab) antibodies. Similarly, the V-KAPPA of the three humanized rmAbs show only one (trastuzumab, alemtuzumab) or two (bevacizumab) changes in IMGT chemical classes. In contrast, the V-KAPPA of the chimeric cetuximab and rituximab have 6 and 8 changes in IMGT aa chemical classes, respectively. The comparison of domain sequences with the IMGT Colliers de Perles statistical profiles will be useful to identify potential immunogenic residues at given positions.

In conclusion, analysing the variable domains of rmAbs currently approved for cancer treatment by using the IMGT/3Dstructure-DB database and the IMGT/V-QUEST tool has proven to be particularly useful to interpret further their antigen binding properties and their genetic origin. Jumping from this analysis to the prediction of immunogenicity of chimeric or humanized rmAbs is not currently possible. Nevertheless, the IMGT standards provide the means to analyse and compare the chemical and genetic properties of different rmAbs and thus represent a first and crucial step in the evaluation of immunogenicity. Future approaches will have to take into account the genetic polymorphisms in humans, particularly in MHC molecules and factors modulating immune response in patients.

Reviewers

Jin Lu, Ph.D., Principal Research Scientist in Bioinformatics, Centocor Inc. (A Johnson and Johnson Company), 145 King of Prussia Road, Radnor, PA 19087, USA.

Thierry Wurch, Ph.D., Head, Cellular and Molecular Biology Unit, Institut de Recherche Pierre Fabre, 5, Avenue Napoleon III, BP 497, F-74164 St Julien-en-Genevois, France.

Acknowledgements

We are grateful to the IMGT team for helpful discussion, Prof. P. Bardos and Mrs. D. Degenne for their critical reading of the manuscript and La Fondation Langlois and l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) for their support. IMGT is a registered Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) mark. IMGT is a National RIO Bioinformatics Platform since 2001 (CNRS, INSERM, CEA, INRA). IMGT was funded in part by the BIOMED1 (BIOCT930038), Biotechnology BIOTECH2 (BIO4CT960037) and 5th PCRDT Quality of Life and Management of Living Resources (QLG2-2000-01287) programmes of the European Union and received

subventions from ARC. IMGT is currently supported by the CNRS, the MENESR (Université Montpellier II Plan Pluri-Formation), BIOSTIC-LR2004, Région Languedoc-Roussillon, ACI-IMPBIO IMP82-2004, the Réseau National des Génopoles RNG, GIS-AGENAE, Agence Nationale de la Recherche ANR (BIOSYS06.135457) and the European Union ImmunoGrid project (IST-2004-0280069).

References

- [1] Mol CD, Fabbro D, Hosfield DJ. Structural insights into the conformational selectivity of STI-571 and related kinase inhibitors. *Curr Opin Drug Discov Dev* 2004;7(5):639–48.
- [2] Brehmer D, Greff Z, Godt K, et al. Cellular targets of gefitinib. *Cancer Res* 2005;65:379–82.
- [3] Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1995;1:1311–8.
- [4] Albanell J, Codony J, Rovira A, Mellado B, Gascon P. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. *Adv Exp Med Biol* 2003;532:253–68.
- [5] Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* 2004;104:2635–42.
- [6] Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, Ferguson KM. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* 2005;7:301–11.
- [7] Lefranc M-P, Lefranc G. The immunoglobulin FactsBook. London, UK: Academic Press; 2001. p. 1–458.
- [8] Saphire EO, Parren PW, Pantophlet R, et al. Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science* 2001;293(5532):1155–9.
- [9] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 1996;14, 33–8, 27–8.
- [10] Li J, Sai T, Berger M, et al. Human antibodies for immunotherapy development generated via a human B cell hybridoma technology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:3557–62.
- [11] Yousfi Monod M, Giudicelli V, Chaume D, Lefranc M-P. IMGT/JunctionAnalysis: the first tool for the analysis of the immunoglobulin and T cell receptor complex V-J and V-D-J JUNCTIONS. *Bioinformatics* 2004;20:1379–85.
- [12] Chothia C, Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* 1987;196:901–17.
- [13] Lefranc M-P, Pommié C, Ruiz M, et al. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev Comp Immunol* 2003;27:55–77.
- [14] Muller YA, Chen Y, Christinger HW, et al. VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface. *Structure* 1998;6:1153–67.
- [15] Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 1988;332:323–7.
- [16] Winter G, Harris WJ. Humanized antibodies. *Immunol Today* 1993;14:243–6.
- [17] Poul M-A, Lefranc M-P. Structural correspondences between mouse and human immunoglobulin VH genes: application to the humanization of mouse monoclonal antibodies. *Ann NY Acad Sci* 1995;764:47–9.
- [18] Kabat EA, et al. Sequences of proteins of immunological interest. Washington, DC: NIH Publication; 1991. p. 91–3242.
- [19] Lefranc M-P. Unique database numbering system for immunogenetic analysis. *Immunol Today* 1997;18:509.
- [20] Lefranc M-P. The IMGT unique numbering for Immunoglobulins, T cell receptors and Ig-like domains. *Immunologist* 1999;7:132–6.

- [21] Cheetham GM, Hale G, Waldmann H, Bloomer AC. Crystal structures of a rat anti-CD52 (CAMPATH-1) therapeutic antibody Fab fragment and its humanized counterpart. *J Mol Biol* 1998;284:85–99.
- [22] Kaas Q, Ruiz M, Lefranc M-P. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/StructuralQuery, a database and a tool for immunoglobulin, T cell receptor and MHC structural data. *Nucl Acids Res* 2004;32:D208–10.
- [23] Jilani I, Keating M, Giles FJ, O'Brien S, Kantarjian HM, Albitar M. Alemtuzumab: validation of a sensitive and simple enzyme-linked immunosorbent assay. *Leuk Res* 2004;28:1255–62.
- [24] Lefranc M-P, Pommié C, Kaas Q, et al. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains. *Dev Comp Immunol* 2005;29:185–203.
- [25] Ruiz M, Lefranc M-P. IMGT gene identification and Colliers de Perles of human immunoglobulin with known 3D structures. *Immunogenetics* 2002;53:857–83.
- [26] Qian J, Liu T, Yang L, Daus A, Crowley R, Zhou Q. Structural characterization of N-linked oligosaccharides on monoclonal antibody cetuximab by the combination of orthogonal matrix-assisted laser desorption/ionization hybrid quadrupole-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and sequential enzymatic digestion. *Anal Biochem* 2007;364:8–18.
- [27] Jefferis R. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol Progr* 2005;21:11–6.
- [28] Cho HS, Mason K, Ramyar KX, et al. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 2003;421:756–60.
- [29] Franklin MC, Carey KD, Vajdos FF, Leahy DJ, de Vos AM, Sliwkowski MX. Insights into ERBB signaling from the structure of the ERBB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* 2004;5:317–28.
- [30] Codony-Servat J, Albanell J, Lopez-Talavera JC, Arribas J, Baselga J. Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Res* 1999;59:1196–201.
- [31] Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:4744–9.
- [32] Yuan CX, Lasut AL, Wynn R, et al. Purification of Her-2 extracellular domain and identification of its cleavage site. *Protein Exp Purif* 2003;29:217–22.
- [33] James LC, Hale G, Waldmann H, Bloomer AC. 1.9 Å structure of the therapeutic antibody CAMPATH-1H Fab in complex with a synthetic peptide antigen. *J Mol Biol* 1999;289:293–301.
- [34] Schulz H, Winkler U, Staak JO, Engert A. The monoclonal antibodies Campath-1H and rituximab in the therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Onkologie* 2000;23:526–32.
- [35] Polyak MJ, Deans JP, Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure. *Blood* 2002;99:3256–62.
- [36] Teeling JL, Mackus WJ, Wiegman LJ, et al. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J Immunol* 2006;177:362–71.
- [37] Ernst JA, Li H, Kim HS, Nakamura GR, Yansura DG, Vandlen RL. Isolation and characterization of the B-cell marker CD20. *Biochemistry* 2005;44:15150–8.
- [38] Giudicelli V, Chaume D, Lefranc M-P. IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V–J and V–D–J rearrangement analysis. *Nucl Acids Res* 2004;32:W435–40.
- [39] Lefranc M-P, Giudicelli V, Kaas Q, et al. IMGT, the international ImMunoGeneTics Information System®. *Nucl Acids Res* 2005;33:D593–7.
- [40] Giudicelli V, Chaume D, Lefranc M-P. IMGT/GENE-DB: a comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes. *Nucl Acids Res* 2005;33:D256–61.
- [41] Maeda T, Yamada Y, Tawara M, et al. Successful treatment with a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, rituximab) for a patient with relapsed mantle cell lymphoma who developed a human anti-chimeric antibody. *Int J Hematol* 2001;74:70–5.
- [42] Looney RJ, Anolik JH, Campbell D, et al. B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis Rheum* 2004;50:2580–9.
- [43] Pendley C, Schantz A, Wagner C. Immunogenicity of therapeutic monoclonal antibodies. *Curr Opin Mol Ther* 2003;5:172–9.
- [44] Pommié C, Levadoux S, Sabatier R, Lefranc G, Lefranc M-P. IMGT standardized criteria for statistical analysis of immunoglobulin V-REGION amino acid properties. *J Mol Recogn* 2004;17:17–32.
- [45] Van Walle I, Gansemans Y, Parren PW, Stas P, Lasters I. Immunogenicity screening in protein drug development. *Expert Opin Biol Ther* 2007;7:405–18.
- [46] Hale G, Rebello P, Brettman LR, et al. Blood concentrations of alemtuzumab and antiglobulin responses in patients with chronic lymphocytic leukemia following intravenous or subcutaneous routes of administration. *Blood* 2004;104:948–55.
- [47] Benjamin RJ, Cobbold SP, Clark MR, Waldmann H. Tolerance to rat monoclonal antibodies. Implications for serotherapy. *J Exp Med* 1986;163:1539–52.
- [48] Isaacs JD, Watts RA, Hazleman BL, et al. Humanised monoclonal antibody therapy for rheumatoid arthritis. *Lancet* 1992;340:748–52.
- [49] Goldstein NI, Giorgio NA, Jones ST, Saldanha JW. Antibody and antibody fragments for inhibiting the growth of tumours. WO9640210; 1996.
- [50] Anderson DR, Rastetter WH, Hanna N, Leonard JE, Newman RA, Reff ME. Therapeutic application of chimeric and radiolabeled antibodies to human B lymphocyte restricted differentiation antigen for treatment of B cell lymphoma. WO9411026; 1994.
- [51] Waldmann H, Clark MR, Winter GP, Riechmann L. Antibodies to the antigen CAMPATH-1. US5846534; 1998.
- [52] Baca M, Wells JA, Presta LG, Lowman HB, Chen Y. Anti-VEGF antibodies. EP1325932; 1998.
- [53] Carter PJ, Presta LG. Immunoglobulin variants. US5821337; 1998.
- [54] Jakobovits A, Yang X-D. Human monoclonal antibodies to epidermal growth factor receptor. WO9850433; 1998.

Biographies

Charlotte Magdelaine-Beuzelin, PharmD, lecturer in Immunology at the Université François-Rabelais de Tours, EA 3853 IPGA (Immuno-Pharmaco-Genetic of therapeutic Antibodies) and the Immunology department of the Hospital of Tours, France. She is preparing her PhD and is specialized in analysis of antibody immunogenicity.

Quentin Kaas, PhD, has developed IMGT/3Dstructure-DB (<http://imgt.cines.fr>), the database specialized on the analysis of the three-dimensional structures of the immunoglobulins, the T cell receptors and of the major histocompatibility complex. He is presently a postdoc in the University of Queensland, Brisbane, Australia, where he focuses his research on protein structure prediction methods and on molecular dynamics of protein/membrane interactions.

Vanessa Wehbi has worked to the data collection about recombinant monoclonal antibodies for IPGA (Immuno-Pharmaco-Genetics of therapeutic Antibodies), Tours, France. She is at present PhD student of biology at the

Department of Reproductive and behavioural Physiology, INRA-CNRS (UMR 6175), Université François-Rabelais de Tours, Haras Nationaux, Tours Research Centre, Nouzilly, France.

Marc Ohresser, PhD, is a Research Engineer at the Université François-Rabelais de Tours, EA 3853 IPGA (Immuno-Pharmaco-Genetic of therapeutic Antibodies), France. He is specialized in molecular biology and protein modelling.

Roy Jefferis, PhD in chemistry moved into the Medical School to began his studies of the structure and function of antibody molecules, in health and disease. These studies led to a DSc (Doctor of Science) in immunology and FRCPath (Fellow of the Royal College of Pathologists) and more than 250 publications. In recent years there has been an emphasis on the effector functions of IgG antibodies and particularly the differential activity of multiple glycoforms. The studies are particularly relevant to the production and application of monoclonal antibody therapeutics.

Marie-Paule Lefranc, PhD, is Professor Classe Exceptionnelle at the University Montpellier II, Senior member

of the Institut Universitaire de France, Chair of Immunogenetics and Immunoinformatics, Head of the Laboratoire d'ImmunoGénétique Moléculaire (LIGM) that she created with Gérard Lefranc, in 1982 at Montpellier, the lab being now located within the Institut de Génétique Humaine, UPR CNRS 1142. She has authored over 210 scientific publications in international journals on the molecular immunogenetics of immunoglobulins, T cell receptors, antibody engineering, and in human genetics and immunoinformatics. She received the ROSEN prize of Cancerology in 1988. She is director of IMGT[®], the international ImMunoGeneTics Information System[®] (<http://imgt.cines.fr>), that she founded in 1989, at Montpellier, France.

Hervé Watier, MD, PhD, is professor of Immunology at the Université François-Rabelais de Tours, France. He is leading the research team IPGA, “Immuno-Pharmaco-Genetic of therapeutic Antibodies” whose aim is to identify immunological, pharmacological and genetic factors influencing the variability of clinical effects of recombinant monoclonal antibodies, in order to optimise their therapeutic use if they are already registered and to help design the drugs of the future.

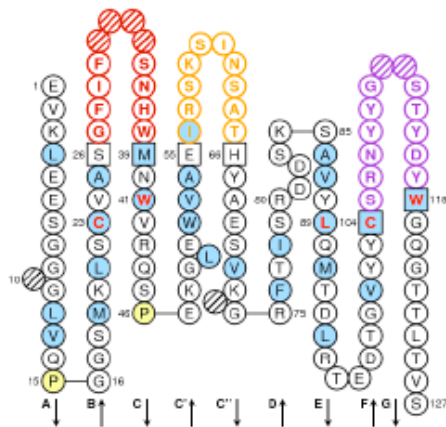
3-2-2 Analyse structurale des domaines variables des anticorps thérapeutiques ciblant le TNF- α

3-2-2-1 Analyse IMGT des séquences peptidiques de l'infliximab, du certolizumab pegol et de l'adalimumab

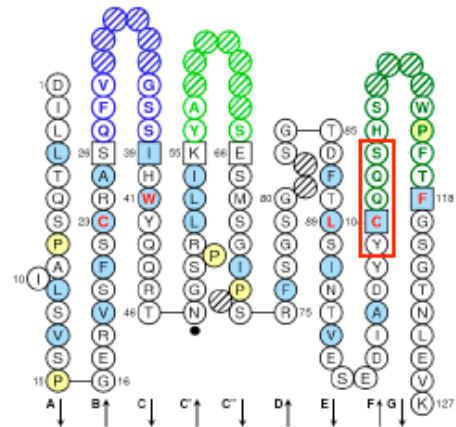
Les séquences peptidiques des domaines VH et V-KAPPA de l'infliximab, du certolizumab pegol et de l'adalimumab ont été alignées (Figure 17). L'utilisation des outils et de la nomenclature IMGT permet de localiser leurs régions FR-IMGT et CDR-IMGT (Lefranc *et al.*, 2003). Seul l'infliximab présente un site de N-glycosylation sur ses domaines variables, localisé en position 47 sur le FR2-IMGT du domaine V-KAPPA (Figure 17). La séquence consensus de N-glycosylation (Asn-X-Thr/Ser, où X peut être n'importe quel acide aminé sauf une proline) peut être portée par les domaines variables des chaînes légères κ ou λ comme par les domaines variables de chaîne lourde. Nous avons également identifié cette séquence sur les domaines variables d'autres anticorps thérapeutiques, en particulier sur les domaines VH et V-KAPPA du cetuximab (article n°4). La plupart du temps, cette séquence consensus semble être le résultat de mutations somatiques et serait donc absente des séquences germinales (Jefferis, 1993). Cependant, dans le cas de l'infliximab, la comparaison de la séquence peptidique de son domaine V-KAPPA au répertoire murin germinale des produits de gènes IGKV (puisque l'infliximab porte des domaines variables d'origine murine) montre que le gène IGKV le plus proche en termes d'homologie de séquence (Tableau XIII) présente déjà ce site. Celui-ci interagit sans doute peu avec le site de liaison à l'antigène, puisque qu'il se situe sur le côté opposé au paratope, comme le montre la représentation du domaine V-KAPPA de l'infliximab en Collier de Perles (Figure 18). Il s'agit finalement d'un site putatif puisqu'aucun glycanne ne l'occupe (Jefferis et Watier, données non publiées).

Colliers de perles – one layer

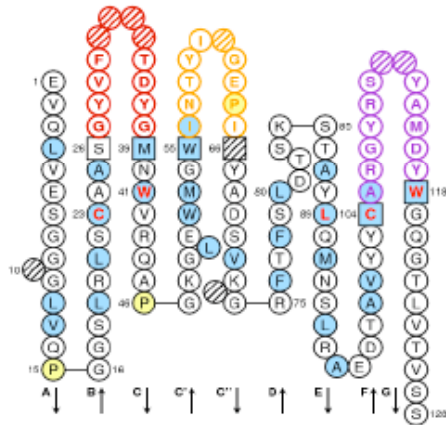
Infliximab VH



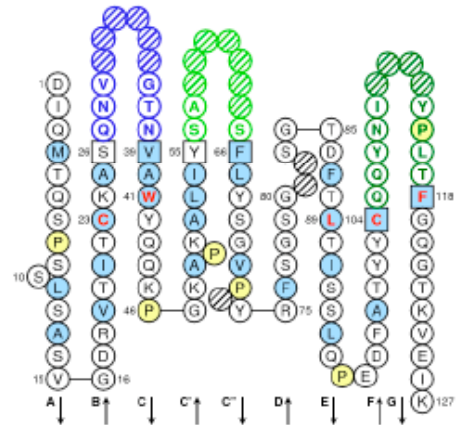
Infliximab V-KAPPA



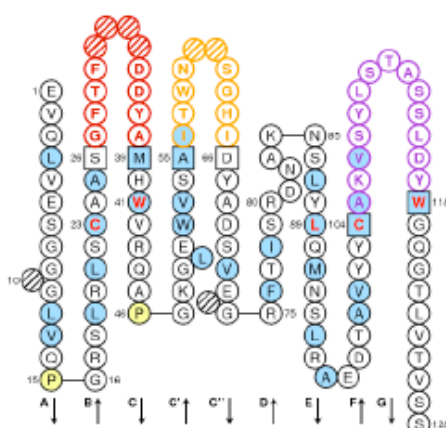
Certolizumab pegol VH



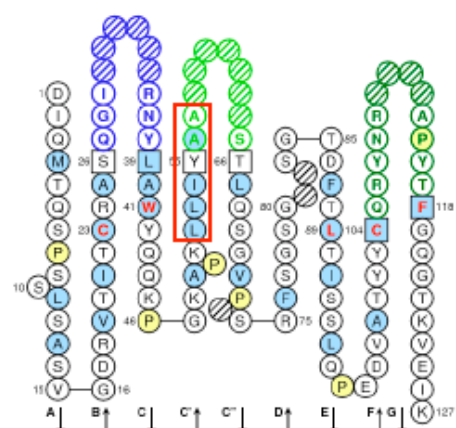
Certolizumab pegol V-KAPPA



Adalimumab VH

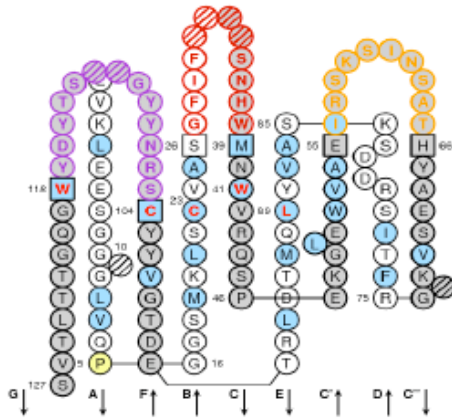


Adalimumab V-KAPPA

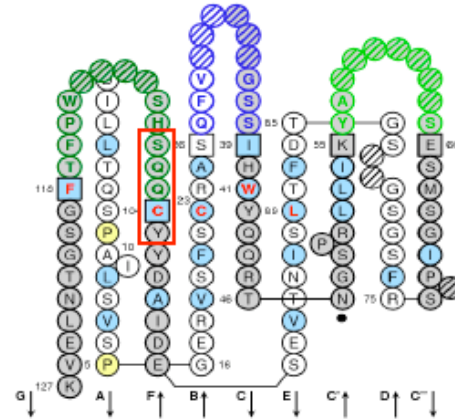


Colliers de perles – two layers

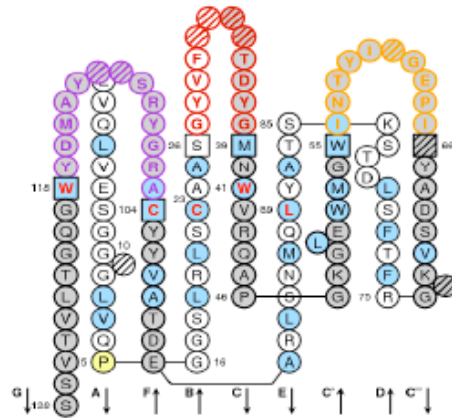
Infliximab VH



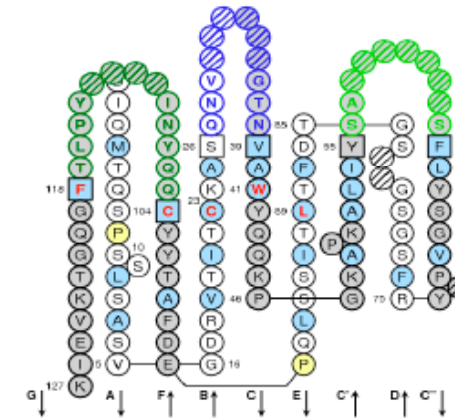
Infliximab V-KAPPA



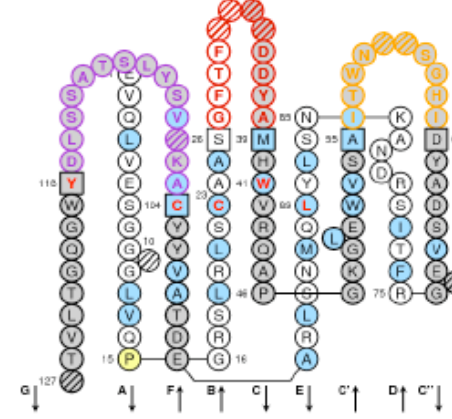
Certolizumab pegol VH



Certolizumab pegol V-KAPPA



Adalimumab VH



Adalimumab V-KAPPA

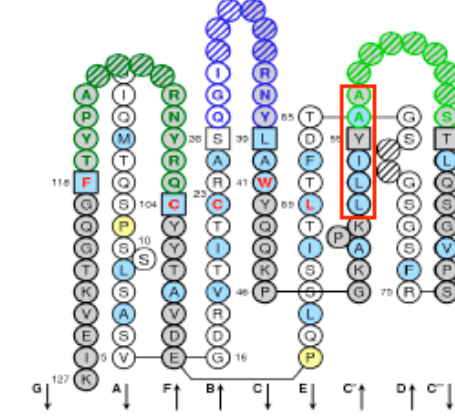


Figure 18 : Colliers de Perles IMGT des domaines VH et V-KAPPA de l'infliximab, du certolizumab pegol et de l'adalimumab. Les Colliers de Perles IMGT sont représentés en une (one layer) ou deux couches (two layers) et les acides aminés sont indiqués par leur code à une lettre. Les positions pour lesquelles des acides aminés hydrophobes (I, V, L, F, C, M, A) et le tryptophane (W) sont retrouvés dans plus de 50% des séquences analysées sont figurées en bleu. Toutes les prolines sont figurées en jaune. Les CDR1-IMGT (boucle BC), CDR2-IMGT (boucle C'C'') et CDR3-IMGT (boucle FG) sont limités par des positions d'ancrage, représentées par des perles carrées, appartenant aux FR-IMGT flanquants. Les flèches indiquent la direction des feuillets béta. Pour les domaines VH, les CDR1-IMGT sont en rouge, les CDR2-IMGT en orange et les CDR3-IMGT en violet. Pour les domaines V-KAPPA, les CDR1-IMGT sont en bleu, les CDR2-IMGT en vert et les CDR3-IMGT en vert émeraude (Ruiz *et al.*, 2002). Les Colliers de Perles IMGT en deux couches montrent au premier plan les feuillets GFCC'C'' et au second les feuillets ABED. Les perles hachurées représentent les positions manquantes selon la numérotation IMGT (Lefranc *et al.*, 03). Les points noirs marquent sur les représentations du domaine V-KAPPA de l'infliximab l'asparagine (N) du motif de N-glycosylation (voir aussi Figure 17). Les séquences encadrées en rouge sur les domaines V-KAPPA de l'infliximab et de l'adalimumab correspondent aux motifs d'agrégation (voir aussi Figure 17).

L'alignement des séquences (Figure 17) permet également de calculer l'homologie entre anticorps chimérique et humanisé, humanisé et complètement humain et enfin chimérique et complètement humain. En raison de la grande homologie qui existe entre les séquences FR-IMGT du certolizumab pegol et de l'adalimumab (85% pour VH et 92% pour V-KAPPA) due à leur construction, les séquences des FR-IMGT (Tableau XII) des domaines VH de l'infliximab sont aussi proches du certolizumab pegol (76%) que de l'adalimumab (74%). La même observation peut être faite à propos des domaines V-KAPPA : 57% versus 61% respectivement. En revanche, les pourcentages d'homologie obtenus pour les séquences entières sont un peu plus faibles que ceux observés pour les FR-IMGT en raison de la variabilité des séquences des CDR-IMGT (Tableau XII).

Tableau XII : Homologie des séquences des trois anticorps anti-TNF- α avec ou sans les régions CDR-IMGT

Comparaison	% d'homologie (acides aminés identiques/acides aminés totaux)			
	Séquences entières		Séquences FR-IMGT uniquement	
	VH	V-KAPPA	VH	V-KAPPA
infliximab / certolizumab pegol	64% (76/120aa)	55% (59/108aa)	76% (69/91aa)	57% (51/89aa)
certolizumab pegol / adalimumab	71% (85/120aa)	84% (91/108aa)	85% (77/91aa)	92% (82/89aa)
infliximab / adalimumab	62% (74/120aa)	56% (60/108aa)	74% (67/91aa)	61% (54/89aa)

La base de données IMGT permet de comparer les séquences des domaines variables d'anticorps à différents répertoires (IMGT/DomainGapAlign et IMGT/V-QUEST (Brochet *et al.*, 2008 ; Ehrenmann *et al.*, 2010)). Ces répertoires de référence, d'origine murine et humaine en ce qui concerne les anticorps thérapeutiques utilisés en médecine, correspondent aux gènes IGHV, IGHD et IGHJ d'une part et IGKV, IGKJ d'autre part, non réarrangés. Les résultats de cette comparaison sont montrés dans le tableau XIII où sont donnés les gènes les plus vraisemblablement impliqués dans la construction des trois anticorps d'intérêt. Les domaines variables de l'anticorps chimérique, c'est-à-dire l'inflximab, sont comparés au répertoire murin. Son domaine VH dérive des gènes IGHV6-6*02 (89,0% d'identité), IGHD1-1*01 et IGHJ2*01 (92,3%) et son domaine V-KAPPA dérive des gènes IGKV5-48*01 (93,7%) et IGKJ4*01 (83,3%) (Tableau XIII).

Tableau XIII : Gènes IMGT V, (D) et J impliqués dans la construction des anticorps thérapeutiques ciblant le TNF- α humain

Anticorps	VH		V-KAPPA	
	Gènes IGHV, IGHD et IGHJ	CDR-IMGT	Gènes IGKV et IGHJ	CDR-IMGT
Anticorps chimérique : comparaison avec la lignée germinale des gènes V, (D) et J de la souris (<i>Mus musculus</i>).				
infiximab (Remicade®)	IGHV6-6*02 (89,0%) (IGHV3-72*01 humain 70%) IGHD1-1*01 IGHJ2*01 (92,3%) (IGHJ6*01 humain 72,2%)	[8.10.11]	IGKV5-48*01 (93,7%) (IGKV6-21*01 humain 67,4%) IGKJ4*01 (83,3%) (IGKJ2*01 humain 66,7%)	[6.3.9]
Anticorps humanisé : comparaison avec la lignée germinale des gènes V et J de l'homme (<i>Homo sapiens</i>). Les gènes IGHD, d'origine murine, ne sont pas mentionnés.				
certolizumab pegol (Cimzia®)	IGHV3-48*01 (76,5%) IGHJ6*01 (73,7%)	[8.8.11]	IGKV1-16*01 (85,3%) IGKJ1*01 (100%)	[6.3.9]
Anticorps complètement humain : comparaison avec la lignée germinale des gènes V, D et J de l'homme (<i>Homo sapiens</i>).				
adalimumab (Humira®)	IGHV3-9*01 (93,9%) IGHD6-6*01 IGHJ4*01 (92,9%)	[8.8.14]	IGKV1-27*01 (95,8%) IGKJ2*01 (91,7%)	[6.3.9]

Les pourcentages d'identité sont calculés par comparaison des séquences peptidiques des domaines VH et V-KAPPA des anticorps, avec les V-REGION et J-REGION les plus proches des répertoires murin et humain. Les V-REGION sont comparées entre les positions 1 et 106 pour VH et entre 1 et 111 pour V-KAPPA, grâce à l'outil IMGT/DomainGapAlign (<http://www.imgt.org> ; Ehrenmann *et al.*, 2010). Les pourcentages affectant les gènes IGHJ et IGKJ ne sont qu'indicatifs étant donnée la faible taille de ces séquences.

La comparaison des séquences des V-REGIONs de VH et VL de l'infliximab aux gènes IGHV et IGKV de la lignée germinale murine les plus proches, avec IMGT/V-QUEST, permet l'identification des acides aminés résultant d'hypermutations somatiques survenues chez la souris : elle montre que l'infliximab est fortement muté. Quatorze mutations (2 sur CDR1-IMGT, 4 CDR2-IMGT, 7 sur FR3-IMGT et 1 sur CDR3-IMGT) sont répertoriées sur le domaine VH dont une, seulement, est silencieuse. Le domaine V-KAPPA de l'infliximab présente 9 mutations dont 1 est silencieuse (4 sur CDR1-IMGT, 1 sur FR2-IMGT, 2 sur FR3-IMGT et 2 sur CDR3-IMGT).

En ce qui concerne le certolizumab pegol, anticorps humanisé, la recherche des mutations n'est pas réalisable en raison de la double origine murine et humaine de ses domaines variables. Cependant, il est possible de comparer ces séquences au répertoire humain, analyse intéressante pour les gènes codant les régions humaines de VH et VL, c'est-à-dire les gènes V et J (Tableau XIII). Les homologies relevées montrent 76,5% d'identité avec IGHV3-48*01 et 73,7% avec IGHJ6*01 en ce qui concerne VH, 85,3% avec IGKV1-16*01 et 100% avec IGKJ1*01 pour VL. La même analyse réalisée pour l'adalimumab montre des pourcentages d'identité plus élevés que ceux obtenus pour le certolizumab pegol : 91,7%-95,8% pour IGHV3-9*01, IGHJ4*01, IGKV1-27*01 et IGKJ2*01. La recherche de mutations par rapport aux gènes IGHV et IGKV les plus proches dans la lignée germinale humaine, montre 15 (3 sur FR1-IMGT, 2 sur FR2-IMGT, 4 sur CDR2-IMGT, 5 sur FR3-IMGT et 1 sur CDR3-IMGT) et 13 mutations (3 sur FR1-IMGT, 3 sur CDR1-IMGT, 3 sur FR2-IMGT, 1 sur FR3-IMGT et 3 sur CDR3-IMGT) respectivement pour l'adalimumab. Sept sur 15 mutations sont silencieuses pour IGHV et 8 sur 13 pour IGKV.

3-2-2-2 Analyse des séquences peptidiques des domaines VH et VL en tant que source d'immunogénicité.

3-2-2-2-1 Divergence inter-espèce

En raison de sa structure chimérique, le seul anticorps anti-TNF- α humain qui puisse se prêter à une analyse permettant d'évaluer la divergence inter-espèce est l'infliximab. Il est possible d'analyser ses séquences peptidiques VH et VL, en les comparant virtuellement au

répertoire germinale humain (IMGT/DomainGapAlign). Cela revient finalement à rechercher les gènes V, (D) et J issus de la lignée germinale humaine qui auraient pu être impliqués dans la construction de l'infliximab, si celui-ci avait été complètement humain. Les pourcentages d'homologie obtenus (Tableau XIII) sont plus faibles (66,7%-72,2%) que ceux observés avec le répertoire murin (83,3%-93,7%), illustrant la divergence entre les deux répertoires humain et murin. Cette observation est confirmée par la comparaison des séquences des FR-IMGT des trois anticorps (Tableau XII) montrant que ces séquences pour un chimérique sont aussi éloignées de celles d'un anticorps humanisé que d'un anticorps complètement humain.

Il est également possible d'analyser les FR-IMGT, séquences beaucoup plus conservées que les CDR-IMGT par définition, en comparant leurs séquences au répertoire humain des IgG et de mesurer ce que Pelat et collaborateurs ont appelé l'index de germinalité (*germinality index*, Pelat *et al.*, 2008) (Tableau XIV). Il s'agit de mesurer la proportion d'acides aminés conservés sur les 8 FR-IMGT, entre la séquence d'intérêt et le gène V de la lignée germinale humaine le plus homologue. Ces auteurs proposent que cet index soit prédictif de la tolérance pour l'anticorps.

Tableau XIV : Index de germinalité de l'infliximab, du certolizumab pegol et de l'adalimumab. Pour chaque anticorps et chacun de leur 8 FR-IMGT figurent le nombre d'acides aminés différents entre la séquence des FR-IMGT et les gènes V et J les plus proches dans le répertoire humain ainsi que le nombre total d'acides aminés par FR-IMGT (n/n'). L'index de germinalité correspond au rapport entre le nombre de résidus conservés pour les domaines VH et VL et le nombre total de résidus des 8 FR-IMGT, soit $\Sigma(n'-n)/\Sigma n'$.

Anticorps	VH				VL				Index de germinalité
	FR1-IMGT	FR2-IMGT	FR3-IMGT	FR4-IMGT	FR1-IMGT	FR2-IMGT	FR3-IMGT	FR4-IMGT	
infiximab	5/25 aa	5/17 aa	9/38 aa	8/10 aa	11/26 aa	6/17 aa	9/36 aa	3/10 aa	0,687
certolizumab pegol	0/26 aa	3/17 aa	7/39 aa	1/11 aa	1/26 aa	3/17 aa	3/36 aa	0/10 aa	0,901
adalimumab	0/25 aa	1/17 aa	3/38 aa	0/11 aa	0/26 aa	1/17 aa	0/36 aa	1/10 aa	0,966

L'index de germinalité est d'autant plus élevé que l'anticorps anti-TNF- α est humain (Tableau XIV) ce qui laisserait penser que l'adalimumab (0,966) est beaucoup moins immunogène que l'infiximab (0,687). Cependant, l'adalimumab comme l'infiximab sont connus pour induire une réponse de type anti-anticorps thérapeutiques chez certains patients

auxquels ils sont administrés. En ce qui concerne le certolizumab pegol, les résultats de l'index de germinalité (0,901) et du pourcentage d'homologie avec le répertoire germinale humain (76,5% pour IGHV) sont surprenants et un peu contradictoires.

3-2-2-2-2 Motifs d'agrégation

A l'aide des motifs recensés par Wang et collaborateurs (Wang *et al.*, 2009), nous avons pu localiser sur la séquence du domaine variable de chaîne légère de l'infliximab, une région de 5 acides aminés chevauchant le FR3-IMGT et le CDR3-IMGT (Figures 17 et 18). De même, un motif de 6 acides aminés a été identifié sur le domaine variable de chaîne légère de l'adalimumab chevauchant FR2-IMGT et CDR2-IMGT (Figures 17 et 18). En revanche, aucune région propice à l'agrégation n'a été retrouvée sur le domaine VL du certolizumab pegol ainsi que sur les séquences des trois domaines VH des trois anticorps.

3-3 Analyse de facteurs génétiques candidats pouvant influencer l'inmunogénicité de l'infliximab

3-3-1 Article n°5 : IgG1 heavy chain-coding gene polymorphism (G1m allotypes) and development of antibodies-to-infliximab

Charlotte Magdelaine-Beuzelin, Séverine Vermeire, Margaret Goodall, Filip Baert, Maja Noman, Gert Van Assche, Marc Ohresser, Danielle Degenne, Jean-Michel Dugoujon, Roy Jefferis, Paul Rutgeerts, Marie-Paule Lefranc, Hervé Watier. *Pharmacogenet Genomics* 2009, 19, 383-387.

IgG1 heavy chain-coding gene polymorphism (G1m allotypes) and development of antibodies-to-infliximab

Charlotte Magdelaine-Beuzelin^{a,b,c}, Séverine Vermeire^f, Margaret Goodall^h, Filip Baert^g, Maja Noman^f, Gert Van Assche^f, Marc Ohresser^{a,b}, Danielle Degenne^{b,c}, Jean-Michel Dugoujon^d, Roy Jefferis^h, Paul Rutgeerts^f, Maire-Paule Lefranc^e and Hervé Watier^{a,b,c}

Objective The chimeric anti-tumor necrosis factor- α antibody infliximab is known to induce antibodies-to-infliximab (ATI) in some treated patients. Immunogenicity in murine variable domains is expected; however, constant domains of its human heavy $\gamma 1$ chain may also be implicated as it expresses G1m1 and G1m17 allotypes. This allelic form may be immunogenic in patients that are homozygous for the G1m3 allotype commonly expressed in Caucasoid populations.

Methods As G1m allotypic divergence may explain the presence of ATI or may influence their concentration, a genotyping method was developed and validated to determine antithetical (i.e. mutually exclusive) G1m3 and G1m17 allotypes (amino acid 120 of CH1 according to the international ImMunoGeneTics information system unique numbering) at the IGHG1 gene level (CH1 359g/a nucleotide polymorphism). Two hundred forty-five blood donors and 118 previously described patients suffering from Crohn's disease, treated with infliximab, and having developed ATI in 73 of them, were genotyped.

Results The IGHG1 CH1 359g/a polymorphism does not depart from the Hardy-Weinberg equilibrium in the control population, and allele frequencies were similar in controls and patients. No association was found between the patient G1m allotypes and the presence of ATI or their

concentration. It remains possible that anti-Gm1 antibodies are not well detected by the enzyme-linked immunosorbent assays used for ATI detection and/or that the G1m allotypes are minor antigens on IgG1.

Conclusion The IGHG1 polymorphism does not seem to play a major role in the induction of ATI. Further analyses will be required to determine whether it is also the case for humanized or fully human antibodies bearing the same G1m allotypes. *Pharmacogenetics and Genomics* 00:000–000 © 2009 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Pharmacogenetics and Genomics 2009, 00:000–000

Keywords: antibodies-to-infliximab, G1m allotypes, IGHG1, international ImMunoGeneTics information system, infliximab

^aUniversité François Rabelais de Tours, ^bCNRS, UMR, ^cCHRU de Tours, Laboratoire d'Immunologie and Pilot centre for Therapeutic Antibodies Monitoring (PiTAM), Tours, ^dAnthropologie Moléculaire et Imagerie de Synthèse, FRE 2960 CNRS, Université Paul Sabatier, Toulouse, ^eIMGT, Université Montpellier 2, Institut de Génétique Humaine UPR CNRS, Montpellier, France, ^fUniversity Hospital Gasthuisberg, Department of Gastroenterology, Leuven, ^gH.-Hartziekenhuis, Roeselare, Belgium and ^hUniversity of Birmingham, Birmingham, UK

Correspondence to Professor Hervé Watier, MD, PhD, Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine, 10 boulevard Tonnellé, Tours Cedex 37032, France
Tel: +33 247 47 38 74; fax: +33 234 38 94 12; e-mail: watier@med.univ-tours.fr

Received 25 August 2008 Accepted 5 February 2009

Introduction

The impact of infliximab immunogenicity in the form of increased risk of infusion reactions and reduced duration of therapeutic response was first demonstrated by some of us in 2003 [1]. In this cohort of Crohn's disease (CD) patients, antibodies-to-infliximab (ATI) were detected in about 61% of them after the fifth injection. Other studies showed that 13 [2] to 36% [3,4] of CD patients and up to 47% of rheumatoid arthritis patients developed ATI [5–7]. It is therefore obvious that only a proportion of treated patients developed an immune response to infliximab.

Infliximab immunogenicity probably results from the presence of murine variable domains within this chimeric anti-tumor necrosis factor- α IgG1 κ antibody [8]. However,

in early animal experiments, it was noticed that polymorphisms in the constant regions (allotypes) also contributed to immunogenicity of chimeric antibodies [9]. Allotypes of heavy $\gamma 1$ chains are defined as G1m allotypes (Table 1 and Fig. 1) and those of the light κ chains as Km allotypes [14]. From its published sequences [15], it can be deduced that infliximab $\gamma 1$ chains probably bear the G1m1, 17 and Km3 allotypes [14]. Although the Km3 allotype is very common in Caucasoid populations (0.90) [14], the G1m1, 17 allotype is much less frequent (0.15–0.35) than G1m3 (0.65–0.85) (Table 1) [14,16]. As a consequence, it is expected that, in a Caucasoid population, 42–72% of the patients are homozygous for the G1m3 allotype and are administered with a therapeutic IgG1 antibody bearing the antithetical G1m1, 17 allotype.

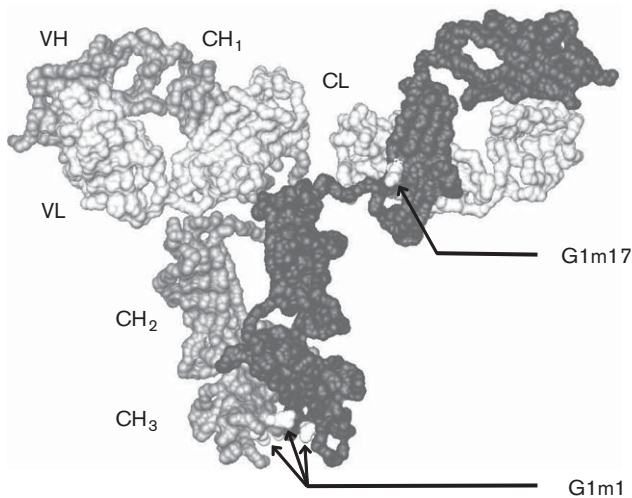
Table 1 Human IG γ 1 chain (G1m) allotypes and corresponding IGHG1 alleles

G1m allotypes	IGHG1 allele names	Amino acid positions ^a		
		CH1 ^b	CH3 ^b	
		120 (97) 214	12 (16) 356	14 (18) 358
G1m1, 17	IGHG1*01	Lys K	Asp D	Leu L
	IGHG1*02	aaa	gat	ctg
G1m3	IGHG1*03	Arg R	Glu E	Met M
		aga	gag	atg

^aAmino acid numbering in bold is according to international ImMunoGeneTics information system unique numbering for C-domain [10] (IMGT Repertoire, <http://www.imgt.org>), between parentheses: exon numbering [11] and in italics: EU numbering [11].

^bCH1 Lys 120 determines the G1m17 allotype, whereas CH3 Asp 12 and Leu 14 determine the G1m1 allotype (present on G1m1, 17 γ 1 chains). CH1 Arg 120 determines the G1m3 allotype (present on G1m3 γ 1 chains) [9]. Nucleotides highlighted in bold in codon 120 are those characterized by the IGHG1 CH1 359g/a genotyping method used in this study.

Fig. 1



Localization of the amino acids corresponding to the G1m1 and G1m17 allotypes on three-dimensional structure of a human IgG1 κ . Space-filling representation of the monoclonal antibody b12 directed against the HIV envelope glycoprotein gp210 [12] (Protein Data Bank and international ImMunoGeneTics information system (IMGT)/3Dstructure-DB, <http://www.imgt.org> 1 hzh). Figure generated with VMD software [13]. The two identical heavy γ 1 chains, indicated in grey and black have one variable domain VH and three constant domains CH1, CH2, and CH3, and the two identical light κ chains in pale-grey have one variable domain VL and one constant domain CL. Heavy and light chains are linked together with disulfide bonds. The analysis of the sequence suggests that the heavy γ 1 chains of this IgG1 κ bear G1m1, 17 allotypes. The corresponding amino acids are colored in white: the lysine at position 120 of CH1 according to the IMGT unique numbering [10] corresponds to the G1m17 allotype [9] (Table 1). The asparagine and the leucine at positions 12 and 14, respectively of CH3 according to the IMGT unique numbering [10] correspond to the G1m1 allotype [9] (Table 1).

We therefore hypothesized that the risk to develop ATI could be dependent on G1m allotypes. To avoid interferences with circulating infliximab, which would affect the patients G1m serological determination, we first developed a genotyping method for the determination of the G1m3 and G1m17 allotypes. The method is based on the IGHG1 CH1 nucleotide (nt) polymorphism at position 359g/a (Table 1

and Fig. 1). We then analysed the patients G1m allotypes in relation with the presence of ATI or their concentration. An in-house enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) developed for ATI determination was also evaluated for its ability to detect anti-G1m allotypes.

Methods

Patients and controls

One hundred eighteen CD patients from the cohort already described by Baert *et al.* [1] were genotyped. Two hundred forty-five blood donors (from the Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique, Tours, France) were also included in this study. All of them were genotyped and the sera of 44 of them were subjected to G1m allotyping by serological methods. Six control sera containing anti-G1m allotype antibodies were obtained from the Centre d'Anthropologie in Toulouse (France): four displayed anti-G1m1 specificity and low-to-high hemagglutination titers, and two others displayed anti-G1m17 specificity and low titers.

G1m allotype serological determination

G1m allotype serological determination of therapeutic IgG1 monoclonal antibodies

Infliximab and alemtuzumab (Schering-Plough, Levallois-Perret, France), basiliximab (Novartis, Hunningue, France), daclizumab, rituximab, trastuzumab (Roche, Neuilly, France), and cetuximab (Merck, Lyon, France) were subjected to allotype determination by inhibition of hemagglutination (HAI). Briefly, sheep red blood cells (srbc) were coated with a purified preparation of IgG1 myeloma protein of either G1m3 or G1m1, 17 allotype using chromium chloride [17]. The monoclonal antibodies HP 6027 anti-G1m3 (The Medical School, University of Birmingham, Birmingham, UK) [18], HP 6184 anti-G1m1, and HP 6189 anti-G1m17 (Central Laboratory of The Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service, Amsterdam, The Netherlands) [19] were titrated against the coated srbc and the end point was determined as the highest dilution where agglutination was still obvious, or minimum hemagglutinating dose. The therapeutic antibodies were each titrated from 50 μ g/ml in a series of 11 doubling dilutions. Twice the concentration of monoclonal antibodies (2 minimum hemagglutinating dose) and the diluted therapeutic antibodies or control were added in each well before srbc. The plates were then allowed to settle at room temperature. If HAI had occurred, the srbc would fall into a button; no inhibition would resemble the control of a carpet of agglutinated cells over the bottom of the well. The results were very obvious with either total agglutination or tight buttons.

G1m allotype serological determination on blood donor sera

Forty-four sera samples among the 245 obtained from blood donors were tested for G1m allotypes at the Centre d'Anthropologie in Toulouse, France, using the standard method of inhibition of agglutination [20].

IGHG1 CH1 359g/a genotyping method

In this multiplex allele-specific PCR, the 20 µl reaction mixture contained the following: 50 ng genomic DNA, 1 mmol/l MgCl₂ (Eurobio, Les Ulis, France), 200 µmol/l of each deoxyribonucleotide triphosphate (MBI Fermentas, Mundolsheim, France), 20 pmol of sense primer 20-mer, 5'-CCCCTGGCACCCCTCCTCCAA-3' (IGHG1 CH1 codons 6–12, nt 16–35 according to the international ImMunoGeneTics information system unique numbering [10]) (Proligo, Paris, France); 4 pmol of 359g-antisense primer 19-mer, 5'-GCTGGCCTCTCACCAACTC-3' (nt 359 in bold) (Proligo); 10 pmol of 359a-antisense primer 37-mer, 5'-TAATAAAATACITTTTATACTGGCCTCTCACCAACTT-3' (non-IG sequence added for primer length extension, in italics) (Proligo), 0.5 U of EurobioTaq DNA polymerase (Eurobio) in its buffer (67 mmol/l Tris-HCl, pH 8.8; 16 mmol/l (NH₄)₂SO₄; 0.01% Tween 20). The PCR amplification profile was as follows: initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 65.6°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min. This amplification was performed on Bio-Rad thermocycleur (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France). The PCR products were separated in an 8% precast polyacrylamide gel (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and visualized after ethidium bromide staining. The observed PCR products of 281 and 299 base pairs long correspond to G1m3 (amplified with the 359g-antisense primer) and to G1m17 (amplified with the 359a-antisense primer), respectively (Table 1).

Enzyme-linked immunosorbent assays

Detection and quantification of antibodies-to-infliximab

Quantification of ATI in serum was based on a 'double antigen format' ELISA. As described earlier [1], ATI in patients sera were detected by an ELISA from Prometheus Laboratories (San Diego, USA) calibrated with affinity-purified polyclonal rabbit anti-mouse IgG F(ab)'₂. The cut-off value was determined at 1.69 µg/ml.

An in-house double antigen format ELISA was also developed. Briefly, microtiter plates (Nunc-Immuno Plate Maxisorp surface, Brand Products, Illkirch, France) were coated with infliximab, and the presence of ATI in tested sera was revealed by horseradish peroxidase-labeled infliximab (labeling by Protéogénix, Oberhausbergen, France). Calibration was based on a mouse anti-human IgG all subclasses monoclonal antibody (provided by M.G.). Ortho-phenylene diamine (Sigma-Aldrich, Lyon, France), substrate of horseradish peroxidase is added and the microplate is read at 492 and 620 nm.

Evaluation of the detection of anti-G1m1 and anti-G1m17 antibodies

To evaluate whether the in-house ELISA developed for ATI was detecting anti-G1m1 and anti-G1m17 antibodies, which may arise as part of the ATI in patients with Gm3 allotypes, control sera with anti-G1m1 or

anti-G1m17 specificities (provided by JMD) were tested in the ELISA assay.

Statistical methods

Exact tests (GENEPOP software [21]) were used to test departure at the Hardy-Weinberg equilibrium, genic and genotypic differentiation of various populations and subpopulations studied. Significance threshold of *P* value was fixed at 0.05.

Results

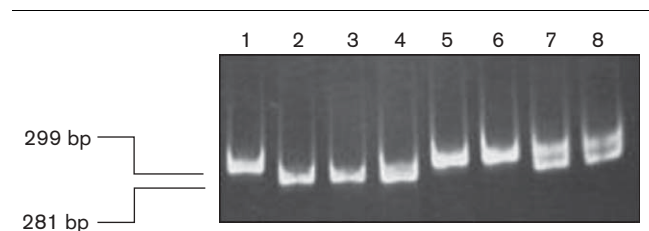
The G1m allotypes, G1m1, G1m3, and G1m17, were determined for seven IgG1 therapeutic antibodies by HAI (Table 2). Four of them bear G1m1, 17 allotypes (alemtuzumab, daclizumab, infliximab, and rituximab), two are G1m3 positive (basiliximab and cetuximab). Trastuzumab has only the G1m17 allotype, in agreement with the G1m1 allotype being engineered out [22].

Determination of G1m allotypes in sera from 44 blood donors by HAI was 100% concordant with IGHG1 CH1 359g/a genotyping from the same blood donors. IGHG1 CH1 359g/a genotyping therefore performed in 201 other blood donors (245 total) (Fig. 2 and Table 3) showed that the expected frequencies of each genotype, 50.7, 41.0,

Table 2 Serological G1m allotype determination of therapeutic IgG1 monoclonal antibodies

	HP 6027 anti-G1m3	HP 6184 anti-G1m1	HP 6189 anti-G1m17
Therapeutic antibodies			
Alemtuzumab	–	+	+
Basiliximab	+	–	–
Cetuximab	+	–	–
Daclizumab	–	+	+
Infliximab	–	+	+
Rituximab	–	+	+
Trastuzumab	–	–	+
Positive controls			
IgG1m3	+	–	–
IgG1m1, 17	–	+	+

Fig. 2



IGHG1 CH1 359g/a genotyping results for some healthy blood donors. Polyacrylamide gel (8%) electrophoresis of PCR products from seven healthy blood donors (*n*=44) with annealing at 65.6°C and 1 mmol/l of MgCl₂. Blood donors in lanes 1, 5, and 6 are homozygous IGHG1 CH1 359a/a, in lanes 2, 3, and 4 are homozygous IGHG1 CH1 359g/g, and in lanes 7 and 8 are heterozygous IGHG1 CH1 359g/a, expressing G1m17 or G1m3 or G1m3 and G1m17 on their IgG1, respectively.

Table 3 IGHG1 CH1 359g/a genotyping in 118 Crohn's disease patients treated with infliximab

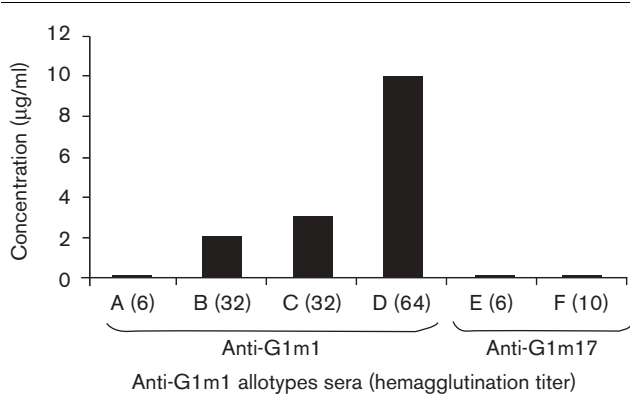
Patients	HWE ^a	IGHG1 CH1-359 genotype (G1m phenotype)				Alleles frequencies		
		g/g (3/3) (%)	g/a (3/17) (%)	a/a (17/17) (%)	p ^b	g (%)	a (%)	p ^b
Blood donors (n=245)	NS	127 (51.8)	95 (38.8)	23 (9.4)	0.675	71.2	28.8	0.659
Crohn's patients (n=118)	NS	60 (50.8)	44 (37.3)	14 (11.9)		69.5	30.5	
ATI negative (n=45)	NS	25 (55.5)	16 (35.5)	4 (8.9)	0.416	73.3	26.7	0.378
ATI positive (n=73)	NS	35 (47.9)	28 (38.3)	10 (13.7)		67.1	32.9	
ATI <8 mg/ml (n=32)	NS	16 (50.0)	12 (37.5)	4 (12.5)	0.744	68.8	31.2	0.725
ATI >8 mg/ml (n=41)	NS	19 (46.3)	16 (39)	6 (14.6)		65.9	34.1	

ATI, antibodies-to-infliximab; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium; NS, Non significant.

^aExact test for the Hardy-Weinberg equilibrium.

^bExact test for populations differentiation.

Fig. 3



Evaluation of the detection of anti-G1m1 and anti-G1m17 antibodies from control sera. Six control sera with anti-G1m antibodies were tested in the in-house enzyme-linked immunosorbent assays developed for antibodies-to-infliximab: four contained anti-G1m1 antibodies (A, B, C, and D) and two anti-G1m17 antibodies (E and F). The capture of anti-G1m antibodies on coated infliximab and horseradish peroxidase-labeled infliximab in a 'double antigen format' assay was observed for three anti-G1m1 sera with high hemagglutination titers (serums B, C, and D). Sera with low hemagglutination titers (one anti-G1m1 and the two anti-G1m17) were undetectable (serums A, E, and F).

and 8.3% for IGHG1 CH1 359g/g, 359g/a, and 359a/a, respectively, were very similar to the observed frequencies (Table 3), indicating that this population was in the Hardy-Weinberg equilibrium for these genotypes. Very similar genotype and allele frequencies were also observed in the cohort of 118 CD patients. This cohort was then divided into two groups, based on the presence or absence of ATI [1], and the ATI positive patients were further divided into two subgroups based on the ATI concentration (with a threshold of 8 µg/ml, defined as clinically relevant [1]). As shown in Table 3, no difference in IGHG1 genotype frequency was observed whatever the presence of ATI. There was also no difference when the ATI concentration was considered. The frequency of ATI and their mean concentrations were also similar whether patients were IGHG1 CH1 359g/g homozygotes (that is bearing the G1m3 allotype, antithetical to the infliximab G1m17 allotype) or IGHG1 CH1 359a carriers (not shown).

To evaluate whether the in-house ELISA developed for ATI was detecting anti-G1m1 and anti-Gm17 antibodies which may arise as part of the ATI in patients with Gm3 allotypes, six control sera, four containing anti-G1m1 antibodies, and two containing anti-G1m17 antibodies were tested in the ELISA assay (Fig. 3). The three sera, which gave a significant signal in ELISA were those characterized by an anti-G1m1 specificity but also by high hemagglutination titers ($\geq 1:32$). The two anti-G1m17 sera did not provide any signal.

Discussion

IGHG1 appears as a good candidate gene influencing infliximab immunogenicity because this drug bears the G1m1, 17 allotypes, which are present at low frequency in Caucasoid populations (Table 1). We studied 245 healthy blood donors among whom 44 allowed us to validate the G1m3/17 (IGHG1 CH1 359g/a) genotyping method and then a cohort of 118 patients suffering from CD previously studied for their ATI status [1]. None of the considered groups departs from the Hardy-Weinberg equilibrium. The comparison of 'healthy blood donors' versus the whole cohort of treated patients, 'ATI negative' versus 'ATI positive', 'ATI of less than 8 µg/ml' versus 'ATI of greater than 8 µg/ml', with an exact test for population differentiation does not show a significant difference in genotype distribution or alleles frequencies (Table 3). The statistical tests adapted to the limited numbers in each group or subgroup did not reveal any tendency to an association between IGHG1 polymorphism and ATI production suggesting that enlarging the cohort would not modify the results. The first explanation to the fact that no association was found between the presence of ATI or their concentrations and G1m allotypes could be the inability of the ATI double-antigen ELISA to detect anti-allotype antibodies [1]. The evaluation of the in-house ELISA for the detection of anti-G1m1 and anti-G1m17 antibodies shows that control sera containing anti-G1m1 antibodies gave positive results, provided that they were at high hemagglutination titers. In contrast, three control sera, one anti-G1m1 and two anti-Gm17, which had low hemagglutination titers gave negative results. Although these negative results may be explained

by the low titers, they might also be because of epitope masking or to steric hindrance owing, for example to the localization of the Gm17 allotype on CH1.

Another explanation for the lack of association between the presence of ATI or their concentrations and G1m allotypes could be that the G1m17 allotype, which corresponds to one amino acid change in the IGHG1 CH1 domain (Table 1, Fig. 1 and [9]) behaves as a minor antigenic determinant when compared with the infliximab variable domains which likely dominate the ATI response. In contrast, it has been suggested that the two amino acid changes in the CH3 domain that characterize the G1m1 allotype is a possible helper T cell epitope [23] which could be hypothesized to favor the development of antibodies directed against any part of the therapeutic antibody, comprising in the variable domains. This study shows that it is probably not the case. However, allotypes remain potential immunogenic B cell and T cell epitopes, particularly for humanized or human therapeutic antibodies. In this context, it has to be noted that trastuzumab has been engineered with two amino acid changes IGHG1 CH3 D12 > E, L14 > M (Tables 1 and 2) to convert the G1m1 allotype to the iso-allotype nG1m1, the resulting γ 1 chain being Gm17, nG1m1, in an attempt to reduce the risk of anti-G1m1 antibodies interfering with therapy [22]. Whether IGHG1 polymorphism is a genetic factor influencing immunogenicity of anti-tumor necrosis factor- α antibodies and other therapeutic antibodies needs therefore to be carefully studied in other cohorts of patients.

Acknowledgements

Authors are deeply grateful to Gérard Lefranc (Montpellier, France) for helpful discussion. This study is carried out with the support of the Fondation Langlois.

References

- 1 Baert F, Noman M, Vermeire S, Van Assche G, D' Haens G, Carbonez A, *et al.* Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med* 2003; **348**:601–608.
- 2 Hanauer SB. Review article: safety of infliximab in clinical trials. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; **13** (Suppl 4):16–22.
- 3 Farrell RJ, Alsahli M, Jeen YT, Falchuk KR, Peppercorn MA, Michetti P. Intravenous hydrocortisone premedication reduces antibodies to infliximab in Crohn's disease: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2003; **124**:917–924.
- 4 Miele E, Markowitz JE, Mamula P, Baldassano RN. Human antichimeric antibody in children and young adults with inflammatory bowel disease receiving infliximab. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; **38**:502–508.
- 5 Bendtzen K, Geborek P, Svenson M, Larsson L, Kapetanovic MC, Saxne T. Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor α inhibitor infliximab. *Arthritis Rheum* 2006; **54**:3782–3789.
- 6 Haraoui B, Cameron L, Ouellet M, White B. Anti-infliximab antibodies in patients with rheumatoid arthritis who require higher doses of infliximab to achieve or maintain a clinical response. *J Rheumatol* 2006; **33**:31–36.
- 7 Wolbink GJ, Vis M, Lems W, Voskuyl AE, De Groot E, Nurmohamed MT, *et al.* Development of anti-infliximab antibodies and relationship to clinical response in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; **54**:711–715.
- 8 Anderson PJ. Tumor Necrosis Factor inhibitors: clinical implications of their different immunogenicity profiles. *Semin Arthritis Rheum* 2005; **34**:19–22.
- 9 Bruggemann M, Winter G, Waldmann H, Neuberger MS. The immunogenicity of chimeric antibodies. *J Exp Med* 1989; **170**:2153–2157.
- 10 Lefranc MP, Pommié C, Kaas Q, Duprat E, Bosc N, Guiraudou D, *et al.* IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains. *Dev Comp Immunol* 2005; **29**:185–203.
- 11 Lefranc G, Lefranc M-P. *The Immunoglobulin FactsBook*. London: Academic Press; 2001.
- 12 Saphire EO, Parren PW, Pantophlet R, Zwick MB, Morris GM, Rudd PM, *et al.* Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science* 2001; **293**:1155–1159.
- 13 Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 1996; **14**:27–28, 33–38.
- 14 Lefranc G and Lefranc M-P. Allotypes. In IMGT Repertoire (IG and TR) <http://imgt.org/textes/IMGTrepertoire/Proteins/#D>. [Accessed 19 April 2007]
- 15 Daddona PE, Ghayeb J, Knight DM, Le J, Siegel SA, Vilcek J. Monoclonal and chimeric antibodies specific for human tumor necrosis factor. Patent WO9216553. 1992.
- 16 Grubb R. Advances in human immunoglobulin allotypes. *Exp Clin Immunogenet* 1995; **12**:191–197.
- 17 Ling NR, Bishop S, Jefferis R. Use of antibody coated red cells for the sensitive detection of antigen and in rosette tests for cells bearing surface immunoglobulins. *J Immunol Methods* 1977; **15**:279–289.
- 18 Jefferis R, Reimer CB, Skvaril F, de Lange G, Ling NR, Lowe J, *et al.* Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG subclasses: results of an IUIS/WHO collaborative study. *Immunol Lett* 1985; **10**:223–252.
- 19 Jefferis R, Reimer CB, Skvaril F, de Lange GG, Goodall DM, Bentley TL, *et al.* Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG subclasses: results of the 2nd IUIS/WHO collaborative study. *Immunol Lett* 1992; **31**:143–168.
- 20 Field LL, Dugoujon JM. Immunoglobulin allotyping GM, KM of GAW5 families. *Genet Epidemiol* 1989; **6**:31–34.
- 21 Raymont M, Rousset F. GENEPOP (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 1995; **86**:248–249.
- 22 Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, *et al.* Humanization of an anti-p185^{HER2} antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci* 1992; **89**:4285–4289.
- 23 Stickler MM, Reddy A, Xiong JM, Hinton PR, Harding FA. The G1m(a) haplotype associates with CD4 + T cell responses to a highly conserved constant region peptide. In: Salfeld JG, Wittrup KD, editors. *Antibodies as drugs: from basic biology to the clinic*. Colorado: Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology; 2007. p. 52.

3-3-2 Résultats complémentaires : polymorphisme *FCGR3A-158V/F* et développement des ATI

Le second polymorphisme d'intérêt *FCGR3A-158V/F* a été largement étudié par notre équipe (Gruel *et al.*, 2004 (Annexe n°1)). Nous avons réalisé le génotypage *FCGR3A-158V/F* sur la même cohorte de patients belges que celle précédemment décrite et analysé la fréquence de ces génotypes en fonction du statut ATI des patients (Tableau XV). Les fréquences d'allèles sont strictement comparables entre les témoins et les patients de l'étude, soit 40,0% pour l'allèle V et 60,0% pour l'allèle F. De la même façon, il n'y a pas de différence de fréquence de génotype entre les sujets, qu'ils aient développé des ATI ou non, et quelle que soit la concentration d'ATI produite.

Tableau XV : Patients développant des ATI en fonction du génotype *FCGR3A*

Patients	HWE	Génotype <i>FCGR3A-158</i>				Fréquences des allèles		
		V/V (%)	V/F (%)	F/F (%)	p	V (%)	F (%)	p
Témoins (n=206)	NS	34 (16,5)	100 (48,5)	72 (35,0)	0,64	40,8	59,2	0,91
Patients Crohn (n=120)	NS	16 (13,3)	64 (53,3)	40 (33,3)		40,0	60,0	
ATI négatifs (n=46)	NS	6 (13,0)	23 (50,0)	17 (37,0)	0,80	38,0	62,0	0,69
ATI positifs (n=74)	NS	10 (13,5)	41 (55,4)	23 (31,1)		41,2	58,8	
ATI<8mg/mL (n=33)	NS	4 (12,1)	18 (54,6)	11 (33,3)	0,91	39,4	60,6	0,81
ATI>8mg/mL (n=41)	NS	6 (14,6)	23 (56,1)	12 (29,3)		42,7	57,3	

NS : il n'existe pas d'écart à l'équilibre d'Hardy-Weinberg (HWE)

3-4 Discussion

Nous avons analysé les séquences des domaines variables des anticorps thérapeutiques anti-cancéreux et anti-TNF- α afin d'en évaluer l'immunogénicité pour l'homme, puisque cela n'est pas quantifiable en clinique. C'est pourquoi nous avons mesuré la divergence théorique de ces séquences par rapport au répertoire humain germlinal des gènes IGHV, IGHD et IGHJ d'une part, IGKV et IGKJ d'autre part. L'extraction des séquences peptidiques des domaines variables VH et V-KAPPA des brevets pour chacun de ces anticorps a permis leur analyse selon la nomenclature et les outils IMGT (<http://www.imgt.org>).

L'analyse des séquences des six anticorps anti-cancéreux et des trois anti-TNF- α a permis une description fine des séquences peptidiques de leurs domaines variables en identifiant leurs CDR, FR, sites de N-glycosylation et hypermutations somatiques, mais également d'explorer leur origine génétique. L'évaluation de la divergence des séquences nucléotidiques de ces domaines variables par rapport à la lignée germinale humaine ne permet pas d'affirmer l'immunogénicité de ces anticorps. Cependant, un point intéressant de l'analyse est qu'elle pondère l'idée reçue selon laquelle les anticorps humanisés sont par essence moins immunogènes que leurs homologues chimériques. En ce qui concerne les anti-cancéreux, cette analyse a révélé que leurs domaines variables présentent avec les séquences d'origine humaine les plus proches, une homologie de 55 à près de 80% pour les anticorps chimériques, et de 72 à 100% pour les anticorps humanisés. De fait, les divergences observées pour des anticorps de structure différente (chimériques versus humanisés) ne sont pas si nettes. Cette observation est moins franche avec les anticorps anti-TNF- α . En effet, les pourcentages d'homologie obtenus avec le répertoire humain, pour les séquences des domaines variables du certolizumab pegol varient entre 74 et 100%, et entre 67 et 72% lorsque les séquences correspondantes pour l'infliximab sont comparées à ce même répertoire humain.

La localisation des hypermutations somatiques dans les domaines variables murins des anticorps chimériques révèlent 11, 14 et 21 changements d'acides aminés pour le cétuximab, le rituximab et l'infliximab, respectivement. Ce nombre de mutations est particulièrement élevé pour l'infliximab : si dans la base IMGT, l'identification du gène IGHV murin ayant participé à l'élaboration de l'anticorps est possible au prix de nombreuses mutations, cela pourrait suggérer que le gène réellement impliqué soit absent de cette base. Cependant, la répartition des mutations sur les domaines VH des anticorps chimériques montre que

curieusement ce sont les FR3-IMGT du cétuximab et de l'infliximab qui recensent le plus grand nombre de mutations (5 sur 7 et 7 sur 14 mutations, respectivement) et que les autres sont situées sur des CDR-IMGT. En ce qui concerne le rituximab, les mutations affectant ses domaines VH se répartissent uniquement sur les FR-IMGT mais de façon un peu plus homogène que pour les deux autres anticorps. Si la base IMGT est exhaustive, cette remarque pourrait mettre en évidence l'influence structurale particulière des FR3-IMGT des domaines VH dans l'affinité du paratope pour l'antigène cible, influence probablement en relation avec l'orientation de la boucle CDR3-IMGT voisine, elle-même élément très important du paratope.

Nous avons remarqué que l'index de germinalité du certolizumab pegol (0,901 pour l'ensemble VH et VL et 0,881 pour VH seul) n'est pas corrélé à son pourcentage d'homologie avec le répertoire humain (76,5% pour IGHV). L'index de germinalité compare les FR-IMGT de l'anticorps et des gènes V et J humains les plus proches, alors que le pourcentage d'homologie évalue l'identité entre la séquence du gène IGHV de l'anticorps et le gène IGHV le plus proche dans le répertoire humain. Cette observation suggère que les FR-IMGT du certolizumab pegol sont très proches de la lignée germinale humaine, et que ce sont les CDR-IMGT qui supportent toute la variabilité, à la manière d'un anticorps complètement humain. C'est un anticorps qui a donc été correctement humanisé, les CDR murines s'étant bien adaptées aux régions charpentes humaines. Cependant, dans le cas de l'adalimumab, le pourcentage d'homologie (94% pour IGHV) et l'index de germinalité (0,966) concordent malgré la variabilité attribuée aux CDR-IMGT. Ceci pourrait signifier que les anticorps humanisés ont des CDR1 et des CDR2-IMGT très différentes du répertoire germinale humain en comparaison des anticorps complètement humains, plus qu'elles ne le seraient du seul fait des hypermutations somatiques.

Nous n'avons pu, par ailleurs identifier les résidus impliqués dans l'interaction des trois anticorps avec le TNF- α , car nous ne disposons d'aucune structure tridimensionnelle de ces molécules, contrairement aux anticorps anti-cancéreux. L'identification de motifs d'agrégation sur les séquences des anticorps thérapeutiques n'est pas un argument permettant actuellement d'expliquer leur immunogénicité, mais présente une piste intéressante de recherche.

Il est impossible d'essayer de rapprocher ces résultats que ce soit les pourcentages d'homologie ou les index de germinalité évaluant l'immunogénicité des anticorps anti-TNF- α , de la proportion de patients développant des anticorps induits par ces molécules. Les raisons en sont multiples : même en considérant l'utilisation de ces anticorps anti-TNF- α dans une seule indication (en rhumatologie ou en gastroentérologie), les posologies peuvent varier d'un protocole clinique à l'autre et surtout les techniques de dépistage des anticorps induits sont loin d'être comparables. Il en résulte des proportions de patients immunisés toutes aussi fluctuantes. La seule certitude à ce propos est qu'une fraction seulement des patients traités développe une réponse immunitaire vis-à-vis des anticorps anti-TNF- α .

La recherche de facteurs génétiques pouvant contribuer à la variabilité inter-individuelle de survenue des anticorps induits par l'infliximab dans la maladie de Crohn, nous a conduit à envisager deux gènes candidats *IGHG1* et *FCGR3A*. Le premier polymorphisme, *IGHG1*-359G/A code les allotypes G1m3/G1m17 situés sur les domaines CH1 de la chaîne lourde d'IgG1. Notre hypothèse de travail est que les régions constantes de l'infliximab peuvent, comme ses domaines variables murins, être source d'immunogénicité. La fréquence des génotypes *IGHG1* de la cohorte belge de 118 patients traités par infliximab (Baert *et al.*, 2003) ne diffère pas selon le statut ATI des patients, ni la concentration produite. Nous avons envisagé la possibilité que la technique de dépistage des ATI soit dans l'incapacité de détecter les anticorps anti-G1m sans pouvoir la vérifier puisque le firme américaine Prometheus qui a réalisé le dosage des ATI ne communique pas sur les performances de sa technique, qui n'est par ailleurs pas publiée. Une autre explication pourrait être que les allotypes seraient des sites antigéniques mineurs ce qui contraste avec les données actuelles et en particulier le choix délibéré de modifier les allotypes portés par le trastuzumab pour le rendre potentiellement moins immunogène (Carter *et al.*, 1992).

Bien que le génotype *FCGR3A*-158V/V soit associé à une meilleure réponse biologique au traitement par infliximab (Louis *et al.*, 2004), nous montrons ici que le polymorphisme *FCGR3A* n'est pas lié à l'incidence des ATI chez les patients traités. Ainsi, l'hypothèse selon laquelle le Fc γ RIIIA-158V fixerait plus de complexes immuns TNF- α -influximab, ce qui sur les cellules dendritiques augmenterait la capture de ces complexes et favoriserait ainsi la présentation de peptides issus de l'influximab et les réponses ATI, ne semble donc pas se vérifier. Du fait que plusieurs arguments expérimentaux impliquent la portion Fc des immunoglobulines (Reitan & Hannestad, 2002) ainsi que les récepteurs Fc γ R (Whitmer *et al.*, 1997) dans l'induction d'une réponse anti-anticorps, il se peut que des

récepteurs FcγR autres que le FcγRIIIA soient impliqués dans la capture des IgG et des complexes immuns par les cellules dendritiques. En effet, c'est en l'absence de FcγRIA que la capture des complexes immuns et la présentation des antigènes dérivant de ces complexes semblent fortement compromises chez la souris (Barnes *et al.*, 2002). Malheureusement aucun polymorphisme fonctionnel du *FCGR1A* humain (codant FcγRIa) n'est actuellement décrit pour tester cette hypothèse.

Bien que nos gènes candidats se soient révélés sans influence sur la survenue des ATI, d'autres pistes de recherche s'annoncent très prometteuses : c'est le cas des polymorphismes du promoteur de l'IL-10. Il est en effet connu que certains polymorphismes du promoteur de l'IL-10, cytokine impliquée dans la formation des anticorps sont associés au développement des anticorps induits par le facteur VIII recombinant, biomédicament du traitement de l'hémophilie A (Astermark *et al.*, 2006). S'inspirant de ces travaux, Bartelds et collaborateurs ont très récemment analysé la survenue des anticorps induits par l'adalimumab chez 192 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Ils ont confronté ces résultats aux génotypes des patients pour les polymorphismes -2849A/G, -1082G/A et -819T/C du promoteur de l'IL-10 et ont montré que le génotype -1082A/A est fortement associé à une diminution significative de la fréquence des anticorps anti-adalimumab. Ils ajoutent que l'haplotype AGC est associé quant à lui, à la formation de ces anticorps (Bartelds *et al.*, 2009). Il serait intéressant de confirmer ces données, mais également de compléter l'étude des facteurs génétiques influençant la production des ATI par l'analyse de ces polymorphismes.

4- Pharmacocinétique et biodistribution des anticorps thérapeutiques : exemple de l'ophtalmologie

4-1 Introduction

A l'aide des anticorps anti-TNF- α , nous avons envisagé dans cette thèse les facteurs liés à la structure de ces IgG et quelques aspects de leurs interactions avec le système immunitaire afin de mieux comprendre les éléments qui sous-tendent leur immunogénicité, elle-même impliquée dans la variabilité PK de ces biomédicaments. Cependant, il semble que d'autres paramètres, eux-mêmes directement liés à la PK des IgG soient à prendre en compte, et le FcRn paraît être un bon candidat. C'est pourquoi, nous nous proposons, pour terminer le chapitre des résultats, de retourner à la clinique et aux enseignements théoriques que nous pouvons tirer de l'utilisation des anticorps thérapeutiques, en ophtalmologie en particulier.

Cet article rapporte des données historiques concernant la sérothérapie oculaire mais aussi des notions contemporaines de structure (nomenclature IMGT), d'ingénierie et de PK des anticorps recombinants, permettant de les comparer. L'ophtalmologie qui par le passé a pu traiter certaines formes oculaires de diphtérie par sérothérapie, bénéficie depuis 2006 d'un anticorps monoclonal recombinant pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge. En effet, l'utilisation d'un fragment Fab d'IgG anti-VEGF administré en intra-vitréal (ranibizumab, Lucentis®) dans cette indication a révolutionné la prise en charge de la maladie. Cependant, l'efficacité oculaire également observée avec l'IgG entière correspondante (bévacizumab, Avastin®) soulève beaucoup de questions quant à la PK et à la bio-distribution des IgG et leur passage à travers la barrière hémato-oculaire ainsi que le rôle joué par FcRn.

4-2 Therapeutic antibodies in ophthalmology: old is new again (article n°6)

Charlotte Magdelaine-Beuzelin, Coralie Pinault, Gilles Paintaud, Hervé Watier. *Article accepté le 15 janvier 2010 pour publication dans la revue mAbs.*

Therapeutic antibodies in ophthalmology

Old is new again

Charlotte Magdelaine-Beuzelin,^{1,2,3} Coralie Pinault,³ Gilles Paintaud,^{1,2,3} and Hervé Watier,^{1,2,3,*}

¹Université François-Rabelais de Tours; ²CNRS, UMR 6239; ³CHRU de Tours, Pilot centre for Therapeutic Antibody Monitoring (PiTAM), Tours, France.

More than a century after the first successful use of serotherapy, antibody-based therapy has been renewed by the availability of recombinant monoclonal antibodies. As in the past, current clinical experience has prompted new pharmacological questions and induced much debate among practitioners, notably in the field of ophthalmology.

An examination of the history of antibodies as treatments for ocular disorders reveals interesting parallels to the modern era. The fact that a treatment administered by a systemic route could be efficacious in a local disease was not widely accepted and the “chemical” nature of antibodies was not clearly understood in the late 19th century. Clinical studies by Henry Coppez, a Belgian ophthalmologist, established in 1894 that anti-diphtheric antitoxins could be used to treat conjunctival diphtheria. Nearly 20 years later, Coppez and Danis described age-related macular degeneration, a disorder which today benefits from ranibizumab therapy. The product, a locally-administered recombinant monoclonal Fab fragment, is directed against vascular endothelial growth factor A. Interestingly, its full-size counterpart, bevacizumab, which is approved for the treatment of solid tumors, has also demonstrated efficacy in age-related macular degeneration when administered either intravenously or locally, which raises new questions about antibody pharmacology and biodistribution.

In order to shed some light on this debate, we recount the early history of serotherapy applied to ophthalmology,

review the exact molecular differences between ranibizumab and bevacizumab, and discuss what is known about IgG and the blood-retina barrier, and the possible role of FcRn, an IgG transporter.

Historical Perspective

The recent emergence of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) antibodies for the treatment of age-related macular degeneration (AMD) revives an old tradition of successful serotherapy for ocular diseases. In the 19th century, conjunctival diphtheria was an uncommon form of ocular disease, but the infection was particularly severe in children and could cause eye loss. The infectious agent, the Löffler-Klebs bacillus (*Corynebacterium diphtheriae*), and its toxin induced a profuse exudation in the conjunctivae that tended to coagulate, leading to necrosis of infiltrated tissues.

In February 1894, Roux, Martin and Chaillou observed that the recently discovered anti-diphtheritic serum used to treat croup also cured its ocular manifestations.¹ Later that year, Henri Coppez, a Belgian ophthalmologist (Fig. 1), was the first to use anti-diphtheritic antitoxins to treat conjunctival diphtheria in two young children, and he concluded that clinical results were spectacular: “*Sous l’effet de l’injection, les fausses membranes semblent fondre comme un flocon de neige dans un rayon de soleil*”^{2,3} translated as “Under the effect of injection, the false membranes seem to melt like a snow flake in a ray of sunshine”. This new treatment rapidly spread through-out Europe and beyond,

Key words: serotherapy, ranibizumab, bevacizumab, anti-VEGF monoclonal antibodies, pharmacology, FcRn

Abbreviations: AMD, age-related macular degeneration; CDRs, complementarity determining regions; Fab, antigen binding fragment; FcRn, neonatal Fc receptor; mAbs, monoclonal antibodies; PK, pharmacokinetic; VEGF, vascular endothelial growth factor; VH, variable heavy domain; VL, variable light domain

Submitted: 12/08/09

Accepted: 01/14/10

Previously published online:
www.landesbioscience.com/journals/
mabs/article/11205

*Correspondence to: Hervé Watier;
Email: watier@med.univ-tours.fr



Figure 1. Henri Coppez, a history. Henri Coppez was born in Brussels on September 9, 1869 and died in the same city on August 26, 1946. His father, Prof. Jean-Baptiste Coppez (1840–1930) founded the ophthalmology's rostrum in the Université de Bruxelles where Henri obtained his M.D. degree in 1893. Coppez specialized in ophthalmology in Vienna with Fuchs, in Utrecht with Snellen, and in Brussels with his father, serving as an assistant from 1894 to 1897. He obtained the special doctorate in 1897 with a thesis on the natural history and treatment of pseudomembraneous conjunctivitis, with special emphasis to serotherapy. Coppez entered the Brugmann hospital in 1922, succeeded to Gallemaerts in 1925, and was appointed as professor in 1927. When he retired in 1930, he worked in the *Institut Coppez* that he founded in 1913. Henry Coppez died in 1946 while preparing a speech on the scientific activities of the *Belgian Ophthalmology Society* for the celebration of the 50th anniversary of this society that he founded in 1897. Coppez wrote approximately 200 scientific papers, all of them in the field of clinical ophthalmology, including neuro-ophthalmology (e.g., hysteria, tabes, beri-beri, cerebral tumours, etc.,) and more particularly nystagmus. With Marcel Danis, he first described exsudative senile macular degeneration in 1922. He was a member of the *French Belgian Academy of Medicine* and of the *International Council of Ophthalmology*.

e.g., Italy,⁴ England,⁵ Germany⁶ and Russia.⁷ All initial case reports described therapeutic successes.⁴⁻¹⁰

The first “clinical trial” using the new therapy was published in 1895 by Ernest Aubineau, a French ophthalmologist (Fig. 2). At the time, double-blind placebo-controlled trials were not standard, and



Figure 2. Ernest Aubineau, a history. Ernest Aubineau was born on January 13th, 1871 and died on October 1st, 1951. He began his medical studies in Nantes, France and specialized in ophthalmology, first with Prof. Dianoux in Nantes, and then with Prof. de Wecker in Paris where he discovered the usefulness of serotherapy. In 1895, he obtained his M.D. degree with a thesis entitled “*Essai sur l'application de la sérothérapie dans le traitement de la diphtérie conjonctivale*”. Although he decided to work in private practice, first in Brest and, from 1913, in his native region, he continued to make substantial scientific endeavors, regularly publishing at the congresses of the French Society of Ophthalmology, of which he was member since 1897, and in journals specializing in ophthalmology.

so a noncomparative study in 10 consecutive children (newborn to 8 years) who suffered from conjunctival diphtheria as demonstrated by the presence of Löffler bacillus was performed.¹¹ Clinical efficacy was observed in all patients, with regression consistently occurring 24–48 hours after treatment. This success even prompted Aubineau to propose anti-diphtheritic serotherapy as a diagnostic test of diphtheria in infectious conjunctivitis. The results are all the more remarkable because different sources and preparations of anti-diphtheritic antitoxins were used, with inevitable variations in terms of quality and quantity (antitoxic titer). In the following years, the worldwide needs of serum were met by an increase in the number of “bacteriology institutes” that prepared anti-diphtheritic sera according to several methods.

Serotherapy of ocular diseases was also revolutionary because antitoxins were administered through a systemic route, whereas ocular treatments were traditionally applied locally. Indeed, Aubineau¹¹ and Coppez¹³ used, respectively, subcutaneous and intramuscular injections for the treatment of croup. Parents of sick children, as well as the physicians, did not fully understand why a therapeutic effect could be obtained away from the site of the injection.¹¹ The “chemical” nature of the antitoxins was indeed mysterious because nothing was known about immunoglobulins, their half-life and their distribution in the organism at that time.

Coppez suggested that the antitoxin may also be administered locally by intra-conjunctival infusions in order to protect the cornea from the deleterious action of toxin;¹³ however, the immunogenicity of horse serum proteins and immunoglobulins was then also unknown. Interestingly, Coppez noted that certain symptoms, e.g., exanthemas, localised oedemas, arthralgia, became more frequent after serotherapy was introduced and happened thirteen days after the first injection.¹³ This syndrome was referred to as serum sickness by Clemens von Pirquet and Bela Schick in 1905,¹⁴ long before its pathophysiology was understood.

Recombinant Antibodies in Ophthalmology: Ranibizumab and Bevacizumab

In addition to being a pioneer of serotherapy in ophthalmology, Henri Coppez is also linked to modern antibody therapy because he and Marcel Danis were the first to describe exsudative senile macular degeneration in 1923.¹⁵ This disease, now known as AMD, is currently treated with recombinant antibodies, a modern form of serotherapy. Donald Gass suggested in 1967¹⁶ that the neovascular proliferation may play a primary role in the pathobiology of the disciform lesion reported in AMD. With the identification of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) as a key agent in neovascularization and vascular leakage in AMD,^{17,18} anti-VEGF “antitoxins” targeting this endogenous “toxin” (or “autotoxin”) began to be developed. Polyclonal antibodies of animal origin

VH domain	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-117)	FR4-IMGT (118-128)
	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120						
bevacizumab	EVQLVESGG. GLVQPGGSLRLSCAAS	<u>GYTF</u> ... <u>TNYG</u>	MNWVRQAPGKGLEWVGW	INTY...TGEP	TYAADFK. RRFTPSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC	<u>AKYPHYGSS</u> HWYFDV	WGQGLTVTVSS
ranibizumab	EVQLVESGG. GLVQPGGSLRLSCAAS	<u>GYDF</u> ... <u>THYG</u>	MNWVRQAPGKGLEWVGW	INTY...TGEP	TYAADFK. RRFTPSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC	<u>AKYPYYGT</u> SHWYFDV	WGQGLTVTVSS
V-KAPPA domain	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-117)	FR4-IMGT (118-128)
	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120						
bevacizumab	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSAS	<u>QDI</u> <u>SNY</u>	LNWYQKPGKAPKVLII	FT.....S	SLHSGVP. SRFSGSG..SGTDFTLTISLQPEDFATYYC	<u>QQYST</u> ...VPWT	FGQGTKVEIK.
ranibizumab	DIQLTQSPSSLSASVGRVTITCSAS	<u>QDI</u> <u>SNY</u>	LNWYQKPGKAPKVLII	FT.....S	SLHSGVP. SRFSGSG..SGTDFTLTISLQPEDFATYYC	<u>QQYST</u> ...VPWT	FGQGTKVEIK.

Figure 3. IMGT Protein displays of the VH and V-KAPPA domains of the bevacizumab and ranibizumab antibodies. Amino acid sequences are from 1bj1 (bevacizumab) and 1cz8 (ranibizumab). FR-IMGT and CDR-IMGT delimitations and gaps, represented by dots, are defined according to the IMGT unique numbering for V-DOMAIN. The five (of a total of six) amino acid differences between the bevacizumab and ranibizumab sequences, localized on the variable domains of their heavy chains (VH) and on the variable domains of their light chain (V-KAPPA) are underlined. The numbers 121 in the VH CDR3-IMGT numbering correspond to the additional positions 111.1, 112.2 and 112.1, respectively.²⁷

are no longer necessary because molecular biology and protein engineering techniques can now be used to produce monoclonal antibodies (mAbs) that are largely humanized,¹⁹ but the principle and the goal remain identical.

Bevacizumab and Ranibizumab Development

Genentech developed humanized mAbs targeting VEGF, although the initial application was for cancer, not AMD. First, the murine anti-VEGF mAb A.4.6.1 with neutralizing activity on all VEGF isoforms,^{20,21} was selected and cloned. The humanization of muMAb VEGF A.4.6.1 consisted of the transfer of the six complementarity determining regions (CDRs) from muMAb VEGF A.4.6.1 to a consensus human framework used in previous humanizations. Several framework residues in the humanized variable heavy (VH) domain and one framework residue in the humanized variable light (VL) domain were changed from human to murine to achieve binding equivalent to muMAb VEGF A.4.6.1.^{20,21} The resulting Fab (Fab-12) was used to synthesize a full-length IgG1k humanized mab (rhuMAb-VEGF or Fab-12 IgG1) now known as bevacizumab (Avastin®) ($K_d = 433$ pM).^{22,23}

Bevacizumab, administered intravenously, was first approved for marketing in 2004 and is currently used in the

treatment of certain advanced or metastatic forms of colorectal, breast, lung and kidney cancer. At the time, it was thought that bevacizumab could not be used in the treatment of AMD because comparisons of the intravitreal injection of another full-length antibody (trastuzumab, Herceptin®) with its Fab indicated that only the latter allowed full retinal penetration, whereas the full-length antibody did not penetrate the retina.²⁴ This was consistent with the observation that molecules larger than 77 kDa do not freely diffuse across fixed human retina.²⁵

These observations led Genentech to develop an anti-VEGF Fab by selection of an affinity-improved variant of Fab-12, rhuFabV2, which is now called ranibizumab (Lucentis®).²⁶ To obtain this increase in binding affinity and allow inhibition of VEGF with its monovalent Fab format, the original Fab was genetically engineered through a process of CDRs random mutagenesis and affinity selection (Fab Y0317 mutant, $K_d = 19.8$ pM²³). The resulting ranibizumab (a Fab) differs from the corresponding part in bevacizumab by six amino acids. Five differences are in the variable domains, as exemplified in the IMGT Protein displays (Fig. 3) and by comparison of the IMGT Colliers de Perles of 1cz8 and 1bj1, respectively, available in IMGT/3Dstructure-DB (<http://www.imgt.org>). Four differences are in the VH, two in the CDR1-

IMGT (T29>D, N36>H) and two in the CDR3-IMGT (H109>Y, S112.2>T), and one difference is in the V-KAPPA domain (M4>L). The sixth difference is in the hinge region (T10>L). Most of the mutations take place in the ranibizumab antigen binding site, i.e., its paratope, according to IMGT unique numbering.²⁷ As a Fab, ranibizumab has a total molecular mass of 48.39 kDa; it is not glycosylated and can be easily produced in *E. coli*. On the other hand, bevacizumab, which is a full-size IgG1k, has a molecular mass of 149 kDa, is *N*-glycosylated in its Fc region, and requires mammalian cell lines CHO DP-12,²⁰ for production. Due to its simpler structure and its higher affinity for VEGF, ranibizumab requires lower molar amounts than bevacizumab to neutralize an equal amount of VEGF.

Despite preliminary data suggesting that a full-length antibody would not be efficient for intravitreal injections, the earlier commercial availability of bevacizumab compared to ranibizumab led ophthalmologists to try the former as an AMD treatment. As a result, bevacizumab was used by intravitreal injection with success,²⁸ and came to be an attractive alternative because of its lower cost compared to ranibizumab.²⁹ As intravitreal injection of bevacizumab is an off-label indication of AMD treatment, little is known about the product's pharmacokinetics (PK) in the eye, which needs to be studied before

dosing regimens can be optimized and its safety assessed. Several studies have provided some answers by analysing the PK of Fab or full-length antibodies after their intravitreal injection.^{24,26,30,31} Bakri and associates injected bevacizumab³⁰ or ranibizumab³¹ in one of the two eyes of rabbits and measured their concentration in vitreous humor, aqueous humor of the two eyes, and serum. The intravitreal half-life of bevacizumab was estimated at 4.3 days and the antibody was detectable in the serum, as in the uninjected eye, at a very low concentration. Although Mordenti and associates studied another full-length antibody, trastuzumab, with another protocol in another animal model, they reported a similar half-life of 5.6 days in the eyes of monkeys.²⁴ PK studies of intravitreal ranibizumab reported a half-life of 2.6 days²⁶ (monkey) or 2.88 days³¹ (rabbit). The Fab was detected in the serum of monkeys, but not in serum or uninjected eyes of rabbits.

Although the systemic route of administration was less studied in AMD, efficacy of bevacizumab was reported and authors suggested that this more comfortable route of administration may be used for AMD treatment.³² Unsurprisingly, the question of how a full-length antibody crosses the blood-retina barrier was discussed. In 2003, Saishin and associates showed that the subcutaneous administration of a fusion protein comprising ligand binding elements taken from the extracellular domains of VEGF receptors 1 (FLT1) and 2 (KDR) fused to the Fc portion of IgG1 (VEGF-TRAP_{R1R2} or aflibercept) significantly inhibited subretinal neovascularization in transgenic mice that express VEGF in photoreceptors. VEGF-TRAP_{R1R2} reduced the breakdown of the blood-retina barrier in two such models of VEGF-induced rupture.³³ These observations are consistent with the presence of neonatal Fc receptor (FcRn) in rat eyes and particularly on the blood-retina barrier.³⁴ FcRn is known to modulate IgG transport and protect against their catabolism, resulting in their long serum half-life as compared with other proteins. The presence of FcRn may explain why VEGF-TRAP_{R1R2} was able to cross the blood-retina barrier, i.e., its IgG1 Fc portion interacted with FcRn. Such a mechanism may also explain why

bevacizumab, an IgG1, is efficient in AMD when administered by a systemic route.

Conclusion

One century apart, the story of serotherapy in conjunctival diphtheria and that of anti-VEGF mAbs in AMD show important similarities, particularly due to the fact that clinical experience, which remains in a large part empirical, raises many questions about the pharmacology of therapeutic antibodies. It is also increasingly clear that the pre-clinical in vivo models are not necessarily relevant to the human situation,³⁵ particularly for antibodies that are now largely humanized or human. This is probably the reason why the clinical experience sometimes breaks established dogmas, and sends researchers back to the bench. This is particularly true concerning IgG and protein trafficking across the blood-retina barrier.

Acknowledgements

Prof Hervé Watier had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

We thank Prof. Monique Cordonnier and Prof. André Zanen, from the Brussels University. We are highly indebted to Mrs. Anne-Marie Coppez, granddaughter of Prof. Henri Coppez, as well as to Mrs. Françoise Ruault de Courchamp and Mr. Marc Aubineau, niece and cousin of Dr. Ernest Aubineau, respectively, for providing us family documents and giving us the authorisation to publish their photographs. They agreed to be acknowledged here.

Financial disclosures

None for C.M.B., C.P. and H.W. For G.P.: Consulting fees or paid advisory boards (per year, for the past two years or the known future) ≤USD 10,000 with Roche Pharma and ≤USD 10,000 with LFB; Equity ownership/stock options: none; Lecture fees when speaking at the invitation of a commercial sponsor (per year, for the past two years or the known future): ≤USD 10,000 with Pierre Fabre Pharma; No commercial sponsor for this study; No grant support from industry;

No patents and/or royalties, do not serve as expert witness.

References

- Roux E, Martin L, Chaillou A. Trois cents cas de diphtérie traités par le sérum antidiphtérique. *Ann de l'Inst Pasteur* 1894; 8:640-61.
- Coppez H. Un cas de diphtérie oculaire guéri par la sérothérapie. *Journal med et chir* 1894; 42:665-70.
- Coppez H. Un second cas de diphtérie oculaire traité par la sérothérapie. *Journal med et chir* 1894; 47:745-54.
- Pes O. Sulla etiologia e sulla cura de alcune congiuntiviti pseudo-membranose. *Gior. d. r. Accad di med di Torino* 1895; 1:393-418.
- Jessop W. Two cases of membranous conjunctivitis in which Loeffler's bacillus was found; treatment by anti-toxin. *Trans Oph Soc UK* 1895; 55-64.
- Hoppe J. Mittheilungen aus der Praxis über die Heilserumbehandlung der Diphtherie; ein Fall von Augen- und Rachendiphtherie, behandelt mit Behring'schem Heilserum *Deutsche Med Wochenschr* 1895; 12:199-200.
- Ewertzky T. Ueber die Bindehautdiphtherie und ihre Behandlung mit Heilserum. *Berliner klin Wochenschr* 1896; 33:685-9.
- Desseaux J. Une petite épidémie de diphtérie à St-Vaast-du-Val. *Normandie méd* 1895; 11:1-8.
- Gayet A. Un essai d'application de la sérothérapie à la diphtérie conjonctivale. *Arch d'ophth* 1895; 137-43.
- Morax V. La conjonctivite diphtérique: son traitement par le sérum antitoxique. *Ann d'ocul* 1895; 113:238-55.
- Aubineau E. Essai sur l'application de la sérothérapie dans le traitement de la diphtérie conjonctivale. *Paris: H Jouve* 1895; 1-59.
- Funck M. Manuel de sérothérapie antidiphtérique. *Paris:Carré* 1895; 1-161.
- Coppez H. Des conjonctivites pseudo-membraneuses; histoire, formes cliniques, traitement (Thèse de Doctorat spécial). *Bruxelles: H. Lamertin* 1897; 1-239.
- von Pirquet C, Schick B. *Die Serumkrankheiten*. Leipzig & Wien: F. Deuticke 1905; 1-144.
- Coppez H, Danis M. Rétinite exsudative maculaire sénile. *Arch D'ophth* 1923; 129-46.
- Gass JD. Pathogenesis of disciform detachment of the neuroepithelium III. Senile disciform degeneration. *Am J Ophthalmol* 1967; 63:617-44.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246:1306-9.
- Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 1991; 53:217-39.
- Magdelaine-Beuzelin C, Kaas Q, Wehbi V, Ohresser M, Jefferis R, Lefranc M-P, et al. Structure-function relationships of the variable domains of monoclonal antibodies approved for cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 64:210-25.
- Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997; 57:4593-9.
- Muller YA, Chen Y, Christinger HW, Li B, Cunningham BC, Lowman HB, et al. VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface. *Structure* 1998; 6:1153-67.
- Chen Y, Wiesmann C, Fuh G, Li B, Christinger HW, McKay P, et al. Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *J Mol Biol* 1999; 293:865-81.

23. Kaiser PK. Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular diseases. *Am J Ophthalmol* 2006; 142:660-8.
24. Mordenti J, Cuthbertson RA, Ferrara N, Thomsen K, Berleau L, Licko V, et al. Comparisons of the intraocular tissue distribution, pharmacokinetics and safety of ¹²⁵I-labeled full-length and Fab antibodies in rhesus monkeys following intravitreal administration. *Toxicol Pathol* 1999; 27:536-44.
25. Jackson TL, Antcliff RJ, Hillenkamp J, Marshall J. Human retinal molecular weight exclusion limit and estimate of species variation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:2141-6.
26. Gaudreault J, Fei D, Rusit J, Suboc P, Shiu V. Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rh-FabV2) after a single intravitreal administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:726-33.
27. Lefranc M-P, Pommié C, Ruiz M, Giudicelli V, Foulquier E, Truong L, et al. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev Comp Immunol* 2003; 27:55-77.
28. Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for neovascularization age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Laser Imaging* 2005; 36:331-5.
29. Steinbrook R. The price of sight—ranibizumab, bevacizumab and the treatment of macular degeneration. *N Engl J Med* 2006; 355:1409-12.
30. Bakri SJ, Snyder MR, Reid JM, Pulido JS, Singh RJ. Pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab (Avastin). *Ophthalmology* 2007; 114:855-9.
31. Bakri SJ, Snyder MR, Reid JM, Pulido JS, Ezzat MK, Singh RJ. Pharmacokinetics of intravitreal ranibizumab (Lucentis). *Ophthalmology* 2007; 114:2179-82.
32. Bolz M, Michels S, Geitzenauer W, Prager F, Schmidt-Erfurth U. Effect of systemic bevacizumab therapy on retinal pigment epithelial detachment. *Br J Ophthalmol* 2007; 91:785-9.
33. Saishin Y, Saishin Y, Takahashi K, Lima e Silva R, Hylton D, Rudge JS, et al. VEGF-TRAP(R1R2) suppresses choroidal neovascularization and VEGF-induced breakdown of the blood-retinal barrier. *J Cell Physiol* 2003; 195:241-8.
34. Kim H, Fariss RN, Zhang C, Robinson SB, Thill M, Csaky KG. Mapping of the neonatal Fc receptor in the rodent eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49:2025-9.
35. Loisel S, Ohresser M, Pallardy M, Daydé D, Berthou C, Cartron G, et al. Relevance, advantages and limitations of animal models used in the development of monoclonal antibodies for cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 62:34-42.

©2010 Landes Bioscience.
Do not distribute.

4-3 Discussion

Bien que l'usage du bévacizumab ne soit autorisé que pour le traitement de certains cancers colo-rectaux, il est largement utilisé dans le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, pour des raisons économiques. Cependant, plusieurs publications ont rapporté très récemment la survenue de réactions inflammatoires à l'injection intra-vitréale de cette IgG1 entière (Mansour *et al.*, 2009 ; Sato *et al.*, 2009). Cependant, l'incontestable efficacité de cet anticorps en ophtalmologie fait avancer les hypothèses et de fait, nos connaissances sur la perméabilité des barrières physiologiques vis-à-vis des immunoglobulines. Dans le contexte des anticorps thérapeutiques, l'intérêt actuel pour le FcRn oriente tout naturellement les recherches sur ce récepteur comme transporteur d'IgG possible dans les structures oculaires. Son expression est avérée sur la barrière hémato-rétinienne et son implication dans la PK oculaire des IgG vient d'être explorée. En effet, Kim et collaborateurs ont étudié le passage d'IgG entières injectées en intra-vitréal à travers la barrière hémato-rétinienne, ainsi que leur élimination. Les auteurs rapportent que les IgG injectées diffusent dans les structures profondes des rétines de rat normales ou photocoagulées, artifice connu pour augmenter l'expression de FcRn. En revanche, les IgG ne traversent pas cette barrière lorsqu'elles sont injectées dans l'humeur vitrée de souris n'exprimant pas FcRn. Ils ajoutent que les IgG sont éliminées à travers la barrière hémato-rétinienne dans la circulation sanguine alors que les IgY de poulet, utilisées comme contrôle ne le sont pas. Ils remarquent que cette élimination est plus rapide sur les rétines photocoagulées suggérant un rôle important de FcRn dans l'élimination des IgG (Kim *et al.*, 2009).

Les anticorps thérapeutiques sont à la fois des biomédicaments et des outils d'exploration chez l'homme. Grâce aux questions qu'ils soulèvent en clinique, ils constituent une occasion exceptionnelle de nous intéresser à nouveau à des mécanismes fondamentaux comme la PK des IgG et de ce fait de revisiter des modèles physiologiques. Dans ce contexte, le FcRn constitue une voie de recherche passionnante. Son exploration a d'ores et déjà mis en évidence certains de ces polymorphismes génétiques (Sachs *et al.*, 2006) mais leurs implications dans la variabilité PK observée avec les anticorps thérapeutiques restent encore à prouver.

DISCUSSION

Bien que l'efficacité de la sérothérapie, dès la fin du XIX^{ème} siècle soit en pratique une avancée majeure en termes de prise en charge des patients, il n'en demeure pas moins qu'elle souleva d'un point de vue théorique encore plus de questions et ouvrit aux scientifiques le champ de l'exploration du système immunitaire. En un siècle, la curiosité des chercheurs a stimulé les progrès technologiques, mettant à leur disposition des outils de plus en plus performants. A l'inverse, ces outils leur ont permis de développer de nouvelles idées pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui font nos défenses immunitaires ou traiter les maladies associées à leur défaillance. La sérothérapie a profité de ces améliorations et s'est progressivement muée en thérapie ciblée avec le développement d'anticorps monoclonaux de plus en plus humanisés afin d'éviter de déclencher une réponse immunitaire chez les patients traités. Cependant, les questions se rapportant à la structure, l'immunogénicité, la pharmacocinétique et les mécanismes d'action de ces molécules, et que se posaient déjà les précurseurs de la discipline sont plus que jamais d'actualité et nos travaux de recherche s'inscrivent totalement dans cette dynamique.

Les études cliniques auxquelles nous avons participé analysent essentiellement la PK de deux anti-TNF- α , l'infliximab et l'adalimumab. Ils montrent que le suivi pharmacocinétique des patients est indispensable à l'optimisation des traitements, en raison de la grande variabilité inter-individuelle à laquelle ils sont sujets. De plus, les résultats de dosage des anticorps induits par ces biomédicaments, confrontés à leur PK montrent pour la première fois en gastro-entérologie, que les ATI et possiblement les anticorps anti-adalimumab en accélèrent l'élimination (Articles n°2 et 3). Si l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques influence leur PK, l'inverse est sans doute également vrai. En effet, une trop faible dose d'anticorps thérapeutique pourrait favoriser son immunogénicité. Maini et collaborateurs ont rapporté que les patients traités par infliximab à la dose de 1 mg/kg développent plus d'ATI que les patients recevant 10 mg/kg (Maini *et al.*, 1998). De fait, certains patients souffrent d'une polyarthrite rhumatoïde très active associée à des concentrations élevées de TNF- α , nécessitant une concentration d'infliximab plus élevée pour le neutraliser. Ce serait la sous-exposition à l'infliximab qui participerait à sa plus grande immunogénicité chez ces patients (Maini *et al.*, 1998 ; Bartelds *et al.*, 2009).

La variabilité inter-individuelle d'immunogénicité des anticorps anti-TNF- α associée à sa participation à leur variabilité PK (rapportée par ailleurs, pour nombre d'anticorps thérapeutiques) nous a amené à rechercher des facteurs, qu'ils soient liés à la structure des IgG ou à leur interaction avec le système immunitaire des patients qui pourraient contribuer à cette immunogénicité. L'analyse structurale des domaines variables des anti-TNF- α montre

que les anticorps thérapeutiques chimériques analysés divergent un peu plus du répertoire humain que les anticorps humanisés. A l'inverse, ces derniers présentent un degré d'homologie avec ce même répertoire ne permettant pas de les distinguer aussi clairement des anticorps chimériques que le disent les firmes pharmaceutiques qui les développent, et ce malgré leur humanisation poussée. Finalement, nous confirmons indirectement ici que c'est l'humanisation de la portion Fc des anticorps qui a fait gagner à la fois en tolérance et en efficacité les anticorps recombinants développés, bien plus que celle des domaines variables qui de toutes façons auront toujours la particularité de porter un paratope, et donc un idiotype, qui leur est propre. Bien qu'elle ne remette pas forcément en cause la poursuite du traitement, la survenue d'anticorps induits observée pour chaque génération d'anticorps (chimériques, humanisés et complètement humains) ne fait que renforcer ces observations. Il est bien évident que ces arguments structuraux ne prétendent pas supplanter une analyse clinique de la différence d'immunogénicité des anticorps, mais devant l'impossibilité de mener une telle étude ils constituent une étape importante permettant de l'apprécier. Ils ne se veulent pas plus un frein au progrès des biotechnologies tentant d'en réduire l'immunogénicité, mais ils constituent certainement un élément de poids pour orienter le développement de futurs anticorps thérapeutiques vers des molécules de structure différente à l'image de l'éta nercept (Enbrel®), protéine recombinante de fusion anti-TNF- α .

Les allotypes que nous supposons être impliqués dans l'immunogénicité de l'infliximab ne semblent pas être des déterminants antigéniques majeurs ni même un facteur génétique prédisposant les patients à produire des ATI, pas plus que les polymorphismes du Fc γ RIIIA. Des travaux menés actuellement à Grenoble (Dr Thullier) sur l'humanisation de l'infliximab devraient permettre d'identifier la cible antigénique des ATI sur l'infliximab et de savoir s'ils sont dirigés contre l'idiotype et/ou les régions charpentes murines de l'anticorps. Par ailleurs, le rôle des molécules du CMH dans la réponse immunitaire est transposable à la réponse anti-infliximab, seuls certains travaux suggèrent que des marqueurs génétiques de réponse clinique à l'infliximab existent dans le CMH (Martinez *et al.*, 2004). Par exemple, le TNF- α , cible antigénique de l'infliximab est codé par le gène *TNFA* appartenant aux gènes du CMH de classe III. Plusieurs équipes ont travaillé sur les polymorphismes portés par ce gène ou son promoteur influençant la production de la protéine mais aucune étude n'a pu montrer de façon formelle d'association avec la réponse clinique à l'infliximab (Louis *et al.*, 2002 ; Martinez *et al.*, 2004 ; Mascheretti & Schreiber, 2004). Le CMH de classe I et II reste cependant un bon candidat pour expliquer cette variabilité inter-individuelle d'immunogénicité et la recherche d'épitopes T *in silico* en est la meilleure

preuve. Le grand polymorphisme des molécules du CMH est à l'origine d'une présentation propre à chaque individu d'épitopes T, issus de la protéine d'intérêt. Cartographier ces épitopes qualifiés d'épitopes « régulateurs » ou « effecteurs » sur les anticorps thérapeutiques est un outil supplémentaire pour mieux appréhender leur immunogénicité dans le but de la minimiser.

En qui concerne l'infliximab, son immunogénicité est une des sources inter-individuelles de variabilité de sa PK, mais dans le contexte plus large des anticorps thérapeutiques, toutes ne sont pas clairement identifiées. La maladie traitée, la charge antigénique de même que les caractères démographiques (sexe, poids) sont autant de covariables pouvant interférer (Article n°3 ; Bendtzen *et al.*, 2006), cependant les données cliniques disponibles sont contradictoires (Berinstein *et al.*, 1998 ; Regazzi *et al.*, 2005). L'hypothèse est que nous pouvons formuler est que la variabilité PK dépend également du terrain génétique des patients et que l'identification de facteurs génétiques associés aux paramètres PK individuels augmenterait notre connaissance des mécanismes d'élimination et de bio-distribution des anticorps thérapeutiques et pourrait servir de base à une personnalisation des doses et de la posologie. Dans ce contexte, le meilleur gène candidat semble être *FCGRT*, codant la chaîne α de FcRn.

Au sein d'une même espèce, le gène *FCGRT* ne montre pas de variations dans sa séquence codante (Sachs *et al.*, 2006 ; Laegreid *et al.*, 2002). Cependant, des variations ont été décrites dans les régions non codantes (régions régulatrices, introns, ...) du *FCGRT* humain (Sachs *et al.*, 2006) et bovin (Laegreid *et al.*, 2002). Ces variations génétiques sont suspectes d'influencer l'expression de FcRn et donc la demi-vie et la biodistribution des IgG. En effet, Sachs et collaborateurs ont mis en évidence une région *VNTR*, *variable number of tandem repeat* de 37 paires de bases localisé dans l'intron 1. Les auteurs ont décrit cinq allèles VNTR1, VNTR2, VNTR3, VNTR4 et VNTR5 correspondant à la répétition du motif une, deux, trois ou quatre fois. VNTR3 est l'allèle plus fréquemment rencontré dans la population caucasienne que VNTR2. De plus, ils ont comparé la quantité de transcrits produits entre les homozygotes VNTR3/VNTR3 et les hétérozygotes VNTR2/VNTR3, montrant que chez les premiers, les transcrits sont 1,66 fois plus nombreux que chez les seconds. Ces résultats suggèrent que l'allèle VNTR3 est associé à une meilleure transcription de FcRn que l'allèle VNTR2 (Sachs *et al.*, 2006).

Dans ce contexte, nous avons d'ores et déjà initié un projet intitulé POLYPHAR, *Polymorphismes FCGRT et variabilité pharmacocinétique des anticorps anti-cancéreux*

visant à explorer le rôle que pourrait jouer FcRn dans la variabilité PK des anticorps thérapeutiques utilisés dans le traitement des cancers et qui s'articule selon trois objectifs. Le premier est de chercher une association entre polymorphismes *FCGRT* et paramètres PK déterminés sur des cohortes de patients traités par cetuximab ou rituximab. Le second est de chercher une relation entre les polymorphismes *FCGRT* et le niveau d'expression du FcRn sur les monocytes de donneurs sains (relation génotype/expression *in vitro*) afin de vérifier les résultats publiés par Sachs. Le troisième est d'analyser la relation génotype/phénotype en terme de variabilité PK du rituximab et du bévacizumab sur des souches de souris syngéniques, caractérisées par un haplotype *fcgrt* donné.

Si notre hypothèse est confirmée, c'est-à-dire qu'il existe une association entre les génotypes de *FCGRT* et les paramètres PK des anticorps analysés, ces résultats auront un impact très important, tant sur les modalités de prescription des anticorps thérapeutiques déjà disponibles que sur la stratégie des firmes de biotechnologie. D'un point de vue clinique, ce sera une grande avancée vers des traitements personnalisés. Plusieurs études prospectives seront alors nécessaires pour démontrer, par exemple, que l'ajustement des doses *a priori*, en fonction du polymorphisme *FCGRT*, conduit à une moindre variabilité inter-individuelle de la PK et à une meilleure efficacité.

D'un point de vue industriel, de telles données cliniques permettront de définir une stratégie de développement d'anticorps IgG optimisés dans leur interaction avec le FcRn. Dans ce contexte, il serait très intéressant de démontrer une relation génotype/expression du FcRn *in vitro*. De telles données quantitatives pourraient non seulement appuyer les résultats cliniques mais aussi être intégrées dans des modèles mathématiques de PK et ainsi augmenter notre connaissance du rôle du FcRn chez l'homme. L'analyse de la pertinence de ces résultats *in vivo* sera néanmoins compliquée par la nature des cellules étudiées. En effet, les cellules endothéliales seraient en théorie plus pertinentes, mais celles-ci sont généralement collectées à partir de cordons ombilicaux (organe qui n'est pas forcément le plus représentatif !) et requièrent plusieurs jours de culture. Les monocytes fraîchement purifiés, déjà utilisés par d'autres équipes (Sachs *et al.*, 2006 ; Zhu *et al.*, 2001) sont le meilleur compromis, bien qu'il existe un risque que le polymorphisme de *FCGRT* ne modifie l'expression de FcRn que dans les cellules endothéliales.

Si aucune association entre le polymorphisme de *FCGRT* et la PK des anticorps n'est trouvée, plusieurs explications pourront être avancées. En effet, si un même polymorphisme se révèle jouer un rôle dans un autre contexte clinique, comme les syndromes néphrotiques,

et/ou si nous mettons en évidence une relation *in vitro* avec le niveau d'expression du FcRn, la conclusion sera que ce polymorphisme fonctionnel de *FCGRT* contribue faiblement à la variabilité de la PK des anticorps, au moins dans ces cohortes de patients. Par exemple, le rôle de la masse antigénique pourrait masquer l'effet des polymorphismes de *FCGRT*. Une telle conclusion serait de toutes façons d'un grand intérêt en clinique et justifierait de mieux définir ce paramètre avant de traiter les patients. Finalement, si nous ne trouvons ni association ni relation génotype/expression *in vitro*, la conclusion sera qu'il n'y a probablement pas de polymorphisme fonctionnel dans le gène *FCGRT* et que l'approche pharmacogénétique utilisée n'est pas valide pour étudier ce gène chez l'homme.

Quels que soient les résultats cliniques, les expériences animales menées chez la souris devraient nous fournir de nouvelles informations. Tout d'abord, en utilisant des souches syngéniques dont les haplotypes *fcgrt* sont connus, nous multiplions nos chances d'identifier un polymorphisme *fcgrt* fonctionnel. De plus, le rôle joué par les polymorphismes *fcgrt* sera distingué des autres paramètres influençant la demi-vie des anticorps thérapeutiques grâce à l'analyse PK du bévacizumab et du rituximab sur 3 souches de souris connues pour avoir le même haplotype *fcgrt* : ceci permettra de s'affranchir de facteurs confondants chez les patients tels que la masse tumorale et permettra en outre d'identifier les souches de souris les plus appropriées en terme de polymorphisme de *fcgrt* pour les études précliniques. Si nous sommes en mesure d'identifier deux souches de souris pour lesquelles les PK du bevacizumab et du rituximab sont très différentes (la meilleure et la moins bonne pour un paramètre donné), le modèle présentera alors un grand intérêt pour explorer non seulement le rôle des variations d'expression du FcRn dans l'activité des anticorps thérapeutiques (en présence de tumeurs) mais aussi la biodistribution des IgG.

En effet, la biodistribution des IgG et en particulier le passage de certaines barrières physiologiques comme le placenta est une autre facette également très intéressante des fonctions associées à FcRn. L'utilisation des anticorps thérapeutiques, notamment des anti-TNF- α pour traiter des maladies auto-immunes s'adresse en partie à des femmes en âge de procréer. Bien qu'ils ne soient pas tératogènes chez l'animal, leur inocuité pendant la grossesse n'est pas clairement établie. Se pose alors la question de poursuivre ou non ces traitements pendant la grossesse et l'allaitement. Deux articles analysent chez quelques patientes, le passage placentaire et dans le lait maternel d'IgG ou molécule apparentée anti-TNF- α en s'appuyant sur leurs concentrations à la fois dans le sérum des mères et des enfants et dans le lait.

Kane et collaborateurs rapportent l'étude de trois couples mère/enfant dont les mères sont traitées par infliximab pour une maladie de Crohn. Elles ont reçu l'anticorps jusqu'à la trentième semaine de grossesse et le traitement a été repris entre 3 et 14 jours après l'accouchement : leur lait et leur sérum ainsi que celui du nouveau-né (2 enfants/3) ont été prélevés en post-partum (10, 15 et 57 jours après l'accouchement qui a eu lieu à 38, 39 et 36 semaines de grossesse, respectivement). Bien que l'infliximab soit dosable chez les mères en post-partum à des concentrations comparables à celles observées chez des femmes non enceintes, il reste indétectable chez les enfants et dans le lait. Si ces résultats confirment ce qui a été rapporté par ailleurs quant au passage de l'infliximab dans le lait (Mahadevan *et al.*, 2005), en revanche, l'absence d'infliximab dans le sérum des enfants est plus controversée (Vasiliauskas *et al.*, 2006). Les auteurs proposent que les différences observées soient dues au délai variable d'une étude à l'autre, entre la dernière perfusion d'infliximab pendant la grossesse et le prélèvement en post-partum. Cependant, ils suggèrent que l'infliximab ne passe pas la barrière placentaire ni dans le lait maternel, résultats qui selon eux, devraient encourager les mères traitées à allaiter leur petit (Kane *et al.*, 2009).

Par ailleurs, Murashima et collaborateurs ont analysé les concentrations sériques d'une protéine de fusion anti-TNF- α (récepteur du TNF- α couplé à la portion Fc d'une IgG1), l'étanercept (Enbrel®) administré à une femme enceinte atteinte de polyarthrite rhumatoïde. Ils montrent que ces concentrations sont stables pendant la grossesse et que chez l'enfant juste après l'accouchement, la concentration dans le sang de cordon représente le trentième de la concentration maternelle. Le suivi dans le mois qui suit la naissance montre une diminution rapide des concentrations néonatales d'étanercept malgré l'allaitement et la présence du biomédicament dans le lait. Ces résultats suggèrent qu'il y a eu passage trans-placentaire mais pas de passage d'étanercept avec l'allaitement (Murashima *et al.*, 2009).

Bien que ces travaux et ceux qui les ont précédés (Mahadevan *et al.*, 2005 ; Vasiliauskas *et al.*, 2006) n'aient analysé que de petits effectifs, leurs résultats *a priori* discordants ne permettent de les envisager que comme des analyses préliminaires qui mériteraient d'être confirmées par des études de plus grande envergure. De plus, leurs résultats sont difficilement comparables puisque les anticorps analysés ont des concentrations et des posologies différentes, des PK qui leur sont propres et que les protocoles d'injections et de prélèvements n'ont pas été conçus de la même façon. Bien que l'objectif des auteurs ne soit pas ici de comprendre les mécanismes du passage placentaire des IgG, l'utilisation des anti-TNF- α pendant la grossesse apporte des informations intéressantes qui mériteraient d'être explorées avec une approche plus pharmacologique. De fait, le rôle de FcRn que l'on

sait être impliqué dans le passage placentaire des IgG depuis Brambell, n'est pas du tout discuté et mériterait pourtant de l'être.

Notre équipe s'intéresse actuellement au passage des IgG de la mère à son petit et à l'influence des polymorphismes affectant les régions non codantes du gène *FCGRT*. En effet, le fœtus ne fabrique pas ses propres immunoglobulines : au cours de la grossesse, il bénéficie du passage trans-placentaire des IgG de sa mère, grâce au FcRn exprimé par ce tissu. Nous nous proposons d'utiliser ce modèle physiologique dans le protocole PEPIT', *Protocole d'étude du passage des immunoglobulines par voie transplacentaire* pour évaluer l'influence du génotype de FcRn sur le rapport IgG nouveau-né/IgG maternelles. Les objectifs secondaires sont d'une part d'évaluer l'influence du génotype de FcRn sur le rapport IgG nouveau-né/IgG maternelles pour les différentes sous-classes d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) et d'autre part d'évaluer l'influence des variations allotypiques du fragment Fc des IgG1 maternelles sur le ratio IgG nouveau-né/IgG maternelles. Afin d'enrichir les informations tirées de ce modèle, ont été ajouté le dosage de l'albumine qui est également prise en charge par FcRn ainsi que celui des IgA, des IgM, de la transferrine et de l'haptoglobine qui à l'inverse en sont indépendantes (Anderson *et al.*, 2006). Les analyses sont actuellement en cours, mais si l'implication des polymorphismes de *FCGRT* étudiés dans le niveau d'expression de FcRn se révèle être vraie, ils pourraient influencer le passage des IgG naturelles d'un compartiment à l'autre et certainement leur PK. Ces informations fondamentales viendraient compléter les données actuellement disponibles sur FcRn et seraient largement exploitables pour d'une part expliquer la PK des anticorps thérapeutiques mais également contribuer à l'optimisation des propriétés des anticorps en développement.

A la manière des barrières oculaire et placentaire pour lesquelles la contribution de FcRn dans les mécanismes de transfert d'IgG d'un compartiment à l'autre est fortement envisagée, la barrière hémato-méningée est explorée pour comprendre les mécanismes qui régissent les concentrations d'IgG dans le système nerveux central. En effet, en raison de leur poids moléculaire élevé, les IgG ne peuvent franchir la barrière hémato-méningée depuis la circulation sanguine. Les travaux de Zhang et Pardridge montrent que les IgG produites par les lymphocytes B à l'intérieur même du tissu cérébral subissent un efflux les chassant vers la circulation sanguine et que ce mécanisme unidirectionnel impliquerait un récepteur FcR (Zhang & Pardridge, 2001). En 2002, Schlachetzki et collaborateurs ont montré par microscopie confocale que le FcRn est exprimé sur les capillaires endothéliaux du cerveau de rat, suggérant qu'il puisse être le récepteur d'IgG impliqué dans cette transcytose (Schlachetzki *et al.*, 2002). De plus, la vaccination par la protéine β -amyloïde, neuropeptide

impliqué dans la formation de plaques responsables de la maladie d'Alzheimer, bénéficierait de ce transport. En effet, les IgG produites forment avec la protéine β -amyloïde des complexes dont l'élimination du système nerveux central serait facilitée par le FcRn exprimé par la barrière hémato-méningée (Deane *et al.*, 2005). Cependant, ces résultats ne font pas l'unanimité. Garg et Balthasar ont récemment publié une analyse de la PK d'un anticorps monoclonal injecté à des souris déficientes en FcRn ainsi qu'à des souris contrôle. Ils ne montrent pas de différence significative entre les rapports de concentration de l'anticorps dans le cerveau et le plasma, pour les deux groupes de souris, suggérant que FcRn ne participe pas à la faible exposition du cerveau aux IgG, pas plus qu'il ne contribue à la barrière physiologique empêchant leur entrée dans le cerveau des souris (Garg & Balthasar, 2009). Quoi qu'il en soit, les mécanismes qui régulent la biodistribution des IgG à travers la barrière hémato-méningée gagnent à être mieux connus afin d'envisager le développement de futures neurothérapies. De fait, si FcRn joue un rôle dans ce mécanisme, l'utilisation de traitements locaux par des radiopharmaceutiques couplés à des anticorps devrait avoir un intérêt limité s'ils sont rapidement éliminés du système nerveux central.

Bien que nous ayons montré que l'immunogénicité d'un anticorps peut influencer sa PK, beaucoup d'éléments y participant restent encore à identifier. Les avancées qui concernent un anticorps ne sont pas immédiatement extrapolables à l'ensemble de la classe thérapeutique, trop hétérogène sur de nombreux critères allant des molécules en elles-même aux patients qui les reçoivent et contraignant pharmacologues et immunologistes à les analyser au cas par cas. Le FcRn, qui fait une nouvelle fois se rejoindre les deux disciplines est une des pistes de recherche passionnante à la fois sur le plan des mécanismes fondamentaux de la pharmacologie des IgG naturelles et sur celui des anticorps thérapeutiques. En effet, l'engouement des firmes pharmaceutiques pour ce récepteur, les améliorations qu'elles en attendent pour leurs anticorps en développement, nécessite que l'on explore précisément son rôle, son métabolisme, sa régulation quelle soit génétique et/ou dépendante du contexte immunitaire (cytokines, interféron, facteurs de transcription...), mais aussi son interaction moléculaire avec les IgG.

BIBLIOGRAPHIE

A

AALBERSE RC, SCHUURMAN J. IgG4 breaking the rules. *Immunology.*, 2002, 105, 9-19.

AINSWORTH MA, BENDTZEN K, BRYNSKOV J. Tumor necrosis factor-alpha binding capacity and anti-infliximab antibodies measured by fluid-phase radioimmunoassays as predictors of clinical efficacy of infliximab in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.*, 2008, 103, 944-948.

ALBERT D, DUNHAM J, KHAN S, STANSBERRY J, KOLASINSKI S, TSAI D, PULLMAN-MOOAR S, BARNACK F, STRIEBICH C, LOONEY RJ, PRAK ET, KIMBERLY R, ZHANG Y, EISENBERG R. Variability in the biological response to anti-CD20 B cell depletion in systemic lupus erythaematosus. *Ann Rheum Dis.*, 2008, 67, 1724-1731.

ALMAGRO JC, HERNANDEZ I, RAMIREZ MC, VARGAS-MADRAZO E. Structural differences between the repertoires of mouse and human germline genes and their evolutionary implications. *Immunogenetics.*, 1998, 47, 355-363.

ANDERSON CL, CHAUDHURY C, KIM J, BRONSON CL, WANI MA, MOHANTY S. Perspective - FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine. *Trends Immunol.*, 2006, 27, 343-348.

ANDERSON PJ. Tumor necrosis factor inhibitors: clinical implications of their different immunogenicity profiles. *Semin Arthritis Rheum.*, 2005, 34, 19-22.

ARTHUS M. Injections répétées de serum du cheval chez le lapin. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et ses filiales*, 1903, 55, 817- 820.

ASHKENAZI A, CAPON DJ, WARD RH. Immunoadhesins. *Int. Rev. Immunol.*, 1993, 10, 219-227.

ASTERMARK J, OLDENBURG J, PAVLOVA A, BERNTORP E, LEFVERT AK; MIBS Study Group. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood.*, 2006, 107, 3167-3172.

ATHWAL DS, BROWN DT, WEIR ANC, POPPLEWELL AG, CHAPMAN AP, KING DJ. Biological products. US2003026805, 2003.

B

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, 601-608.

BARNES N, GAVIN AL, TAN PS, MOTTRAM P, KOENTGEN F, HOGARTH PM. FcgammaRI-deficient mice show multiple alterations to inflammatory and immune responses. *Immunity.*, 2002, 16, 379-389.

BARTELDS GM, WIJBRANDTS CA, NURMOHAMED MT, STAPEL S, LEMS WF, AARDEN L, DIJKMANS BA, TAK PP, WOLBINK GJ. Clinical response to adalimumab: relationship to anti-adalimumab antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.*, 2007, 66, 921-926.

BARTELDS GM, WIJBRANDTS CA, NURMOHAMED MT, WOLBINK GJ, DE VRIES N, TAK PP, DIJKMANS BA, CRUSIUS JB, VAN DER HORST-BRUIJNSMA IE. Anti-adalimumab antibodies in rheumatoid arthritis patients are associated with interleukin-10 gene polymorphisms. *Arthritis Rheum.*, 2009, 60, 2541-2542.

BARTELDS GM, WIJBRANDTS CA, NURMOHAMED MT, STAPEL SO, LEMS WF, AARDEN L, DIJKMANS BA, TAK PP, WOLBINK GJ. Anti-infliximab and anti-adalimumab antibodies in relation to response to adalimumab in infliximab switchers and anti-TNF naive patients: a cohort study. *Ann Rheum Dis.*, 2009, sous presse.

BECK A, WAGNER-ROUSSET E, WURCH T, CORVAIA N. Anticorps thérapeutiques et dérivés : une palette de structures pour une pléthore d'indications. Quel format et quelle glycosylation choisir ? Pour quelles applications ? *Med Sci.*, 2009, 25, 1024-1032.

BEENHOUWER DO, YOO EM, LAI CW, ROCHA MA, MORRISON SL. Human immunoglobulin G2 (IgG2) and IgG4, but not IgG1 or IgG3, protect mice against *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun.*, 2007, 75, 1424-1435.

BENDER NK, HEILIG CE, DRÖLL B, WOHLGEMUTH J, ARMBRUSTER FP, HEILIG B. Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. *Rheumatol Int.*, 2007, 27, 269-274.

BENDTZEN K, GEBOREK P, SVENSON M, LARSSON L, KAPETANOVIC MC, SAXNE T. Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor alpha inhibitor infliximab. *Arthritis Rheum.*, 2006, 54, 3782-3789.

BENJAMIN RJ, COBBOLD SP, CLARK MR, WALDMANN H. Tolerance to rat monoclonal antibodies : implications for serotherapy. *J Exp Med.*, 1986, 163, 1539-1552.

BERINSTEIN NL, GRILLO-LOPEZ AJ, WHITE CA, BENICE-BRUCKLER I, MALONEY D, CZUCZMAN M, GREEN D, ROSENBERG J, MCLAUGHLIN P, SHEN D. Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*, 1998, 9, 995-1001.

BITONTI AJ, DUMONT JA. Pulmonary administration of therapeutic proteins using an immunoglobulin transport pathway. *Adv Drug Deliv Rev.*, 2006, 58, 1106-1118.

BOLZ M, MICHELS S, GEITZENAUER W, PRAGER F, SCHMIDT-ERFURTH U. Effect of systemic bevacizumab therapy on retinal pigment epithelial detachment. *Br J Ophthalmol.* 2007, 91, 785-789.

BRAMBELL FWR. The transmission of immune globulins from the mother to the foetal and newborn young. *Proc. Nutr. Soc.*, 1969, 28, 35-41.

BROCHET X, LEFRANC M-P, GIUDICELLI V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucl. Acids Res.*, 2008, 36, W503-508.

BRÜGGEMAN M, WINTER G, WALDMANN H, NEUBERGER MS. The immunogenicity of chimeric antibodies. *J Exp Med.*, 1989, 170, 2153-2157.

BRUHNS P, IANNASCOLI B, ENGLAND P, MANCARDI DA, FERNANDEZ N, JORIEUX S, DAËRON M. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood.*, 2009, 113, 3716-3725.

BUGELSKI PJ, HERZYK DJ, REHM S, HARMSSEN AG, GORE EV, WILLIAMS DM, MALEEFF BE, BADGER AM, TRUNEH A, O'BRIEN SR, MACIA RA, WIER PJ, MORGAN DG, HART TK. 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.

BURTON DR, WOOF JM. Human antibody effector function. *Adv Immunol.*, 1992, 51, 1-84.

C

CALABRESI PA, GIOVANNONI G, CONFAVREUX C, GALETTA SL, HAVRDOVA E, HUTCHINSON M, KAPPOS L, MILLER DH, O'CONNOR PW, PHILLIPS JT, POLMAN CH, RADUE EW, RUDICK RA, STUART WH, LUBLIN FD, WAJGT A, WEINSTOCK-GUTTMAN B, WYNN DR, LYNN F, PANZARA MA; AFFIRM and SENTINEL Investigators. The incidence and significance of anti-natalizumab antibodies: results from AFFIRM and SENTINEL. *Neurology.*, 2007, 69, 1391-1403.

CANFIELD SM, MORRISON SL. Structural and functional characterization of disulfide isoforms of the human IgG2 subclass. *J. Exp. Med.*, 1991, 173, 1483–1491.

CARSON DA, FREIMARK BD. Human lymphocyte hybridomas and monoclonal antibodies. *Adv Immunol.*, 1986, 38, 275-311.

CARTER P, PRESTA L, GORMAN CM, RIDGWAY JBB, HENNER D, WONG WLT, ROWLAND AM, KOTTS C, CARVER ME, SHEPARD HM. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1992, 89, 4285-4289.

CARTER P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nature.*, 2001, 1, 118-129.

CARTER PJ. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol.*, 2006, 6, 343-357.

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.

CARTRON G, BLASCO H, PAINTAUD G, WATIER H, LE GUELLEC C. Pharmacokinetics of rituximab and its clinical use: thought for the best use? *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007, 62, 43-52.

CASTILLO J, WINER E, QUESENBERRY P. Newer monoclonal antibodies for hematological malignancies. *Exp Hematol.*, 2008, 36, 755-768.

CERSOSIMO RJ. Romiplostim in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Clin Ther.*, 2009, 31, 1887-1907.

CHARTRAIN M, CHU L. Development and production of commercial therapeutic monoclonal antibodies in Mammalian cell expression systems: an overview of the current upstream technologies. *Curr Pharm Biotechnol.*, 2008, 9, 447-467.

CHUNG CH, MIRAKHUR B, CHAN E, LE QT, BERLIN J, MORSE M, MURPHY BA, SATINOVER SM, HOSEN J, MAURO D, SLEBOS RJ, ZHOU Q, GOLD D, HATLEY T, HICKLIN DJ, PLATTS-MILLS TA. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *N Engl J Med.*, 2008, 358, 1109-1117.

CHOY EH, HAZLEMAN B, SMITH M, MOSS K, LISI L, SCOTT DG, PATEL J, SOPWITH M, ISENBERG DA. 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.

CLARK M. Advantages of rat monoclonal antibodies. *Immunol Today.*, 1984, 4, 100-101.

CLARK M. Antibody humanization : a case of the “Emperor’s new clothes” ? *Immunol Today.*, 2000, 21, 397-402.

COHEN S, FREEMAN T. Metabolic heterogeneity of human gamma-globulin. *Biochem J.*, 1960, 76, 475-487.

COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE (CHMP) guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins, décembre 2007, EMEA/CHMP/BMWP/14327/2006, [référence du 15 septembre 2009], <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/biosimilar/1432706>

D

DALL'OZZO S, TARTAS S, PAINAUD G, CARTRON G, COLOMBAT P, BARDOS P, WATIER H, THIBAUT G. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of *FCGR3A* polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Research.*, 2004, 64, 4664-4669.

DAVIS TA, WHITE CA, GRILLO-LOPEZ AJ, VELASQUEZ WS, LINK B, MALONEY DG, DILLMAN RO, WILLIAMS ME, MOHRBACHER A, WEAVER R, DOWDEN S, LEVY R. Single-agent monoclonal antibody efficacy in bulky non-Hodgkin's lymphoma: results of a phase II trial of rituximab. *J Clin Oncol*, 1999, 17,1851-1857.

DEANE R, SAGARE A, HAMM K, PARISI M, LARUE B, GUO H, WU Z, HOLTZMAN DM, ZLOKOVIC BV. IgG-assisted age-dependent clearance of Alzheimer's amyloid beta peptide by the blood-brain barrier neonatal Fc receptor. *J Neurosci.*, 2005, 25, 11495-11503.

DE LANGE GG. *Monoclonal antibodies against human immunoglobulin allotypes*. Submitted for the degree of Ph. D, London Hospital College, Faculty of Science, University of London, septembre1988, 175p.

DEL VAL M, SCHLICHT HJ, RUPPERT T, REDDEHASE MJ, KOSZINOWSKI UH. Efficient processing of an antigenic sequence for presentation by MHC class I molecules depends on its neighboring residues in the protein. *Cell.*, 1991, 66, 1145-1153.

DENARDO GL, BRADT BM, MIRICK GR, DENARDO SJ. Human antiglobulin response to foreign antibodies: therapeutic benefit? *Cancer Immunol Immunother.*, 2003, 52, 309-316.

DERY JP, BRADEN GA, LINCOFF AM, KEREIAKES DJ, BROWNE K, LITTLE T, GEORGE BS, SANE DC, CINES DB, EFFRON MB, MASCELLI MA, LANGRALL MA, DAMARAJU L, BARNATHAN ES, TCHENG JE; ReoPro Readministration Registry Investigators. Final results of the ReoPro readministration registry. *Am J Cardiol.*, 2004, 93, 979-984.

DE VRIES MK, WOLBINK GJ, STAPEL SO, DE VRIEZE H, VAN DENDEREN JC, DIJKMANS BA, AARDEN LA, VAN DER HORST-BRUIJNSMA IE. Decreased clinical response to infliximab in ankylosing spondylitis is correlated with anti-infliximab formation. *Ann Rheum Dis.*, 2007, 66, 1252-1254.

DILLON TM, RICCI MS, VEZINA C, FLYNN GC, LIU YD, REHDER DS, PLANT M, HENKLE B, LI Y, DEECHONGKIT S, VARNUM B, WYPYCH J, BALLAND A, BONDARENKO PV. Structural and functional characterization of disulfide isoforms of the human IgG2 subclass. *J Biol Chem.*, 2008, 283, 16206-16215.

DREYER WJ, BENNETT JL. The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1965, 54, 864-869.

DUMONT JA, LOW SC, PETERS RT, BITONTI AJ. Monomeric Fc fusions: impact on pharmacokinetic and biological activity of protein therapeutics. *BioDrugs.*, 2006, 20, 151-160.

DUNCAN AR, WOOF JM, PARTRIDGE LJ, BURTON DR, WINTER G. Localization of the binding site for the human high-affinity FcR on IgG. *Nature.*, 1988, 332, 563-564.

DYER MJ, HALE G, HAYHOE FG, WALDMANN H. Effects of CAMPATH-1 antibodies in vivo in patients with lymphoid malignancies: influence of antibody isotype. *Blood.*, 1989, 73, 1431-1439.

E

EHRENMANN F, KAAS Q, LEFRANC MP. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF. *Nucleic Acids Res.*, 2010, 38, D301-307.

EMI AIKAWA N, DE CARVALHO JF, ARTUR ALMEIDA SILVA C, BONFA E. Immunogenicity of anti-TNF-alpha agents in autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.*, 2009, sous presse.

ESPINO-SOLIS GP, RIAÑO-UMBARILA L, BECERRIL B, POSSANI LD. Antidotes against venomous animals: state of the art and perspectives. *J Proteomics.*, 2009, 72, 183-199.

F

FAHEY JL, ROBINSON AG. Factors controlling serum 3'-globulin concentration, *J. Exp. Med.*, 1963, 118, 845-868.

FARRELL RJ, ALSAHLI M, JEEN YT, FALCHUK KR, PEPPERCORN MA, MICHETTI P. Intravenous hydrocortisone premedication reduces antibodies to infliximab in Crohn's disease: a randomized controlled trial. *Gastroenterology*, 2003, 124, 917-924.

FASANMADE AA, ADEDOKUN OJ, FORD J, HERNANDEZ D, JOHANNIS J, HU C, DAVIS HM, ZHOU H. Population pharmacokinetic analysis of infliximab in patients with ulcerative colitis. *Eur J Clin Pharmacol.*, 2009, 65, 1211-1228.

FRACASSO PM, BURRIS H 3RD, ARQUETTE MA, GOVINDAN R, GAO F, WRIGHT LP, GOODNER SA, GRECO FA, JONES SF, WILLCUT N, CHODKIEWICZ C, PATHAK A, SPRINGETT GM, SIMON GR, SULLIVAN DM, MARCELPOIL R, MAYFIELD SD, MAURO D, GARRETT CR. A phase 1 escalating single-dose and weekly fixed-dose study of cetuximab: pharmacokinetic and pharmacodynamic rationale for dosing. *Clin Cancer Res.* 2007, 13, 986-993.

FRIEND PJ, HALE G, CHATENAUD L, REBELLO P, BRADLEY J, THIRU S, PHILLIPS JM, WALDMANN H. Phase I study of an engineered aglycosylated humanized CD3 antibody in renal transplant rejection. *Transplantation.*, 1999, 68, 1632-1637.

FOSSATI G, NESBITT AM. In vitro complement-dependent cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity by the anti-TNF agents adalimumab, etanercept, infliximab, and certolizumab pegol (CDP870). *Am. J. Gastroenterol.*, 2005, 100, S287.

G

GARG A, BALTHASAR JP. Investigation of the influence of FcRn on the distribution of IgG to the brain. *AAPS J.*, 2009, 11, 553-557.

GAUDREAU J, FEI D, RUSIT J, SUBOC P, SHIU V. Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2005, 46, 726-733.

GHETIE V, HUBBARD JG, KIM J-K, TSEN MF, LEE Y, WARD ES. Abnormally short serum half-lives of IgG in α 2-microglobulin-deficient mice. *Eur J Immunol.*, 1996, 26, 690-696.

GLENNY AT, HOPKINS BE. Duration of passive immunity. *J. Hyg.*, 1923, xxi, 142.

GODFREY MP, PARSONS V, RAWSTRON JR. Rapid destruction of antitetanus serum in a patient previously sensitised to horse serum. *Lancet.*, 1960, 2, 1229-1230.

GORMAN SD, CLARK MR. Humanisation of monoclonal antibodies for therapy. *Semin Immunol.*, 1990, 6, 457-466.

GOTTLIEB AB, KANG S, LINDEN KG, LEBWOHL M, MENTER A, ABDULGHANI AA, GOLDFARB M, CHIEFFO N, TOTORITIS MC. Evaluation of safety and clinical activity of multiple doses of the anti-CD80 monoclonal antibody, galiximab, in patients with moderate to severe plaque psoriasis. *Clin. Immunol.*, 2004, 111, 28-37.

GREY HM, KUNKEL HG. H chain subgroups of myeloma proteins and normal 7S gamma-globulin. *J Exp Med.*, 1964, 120, 253-266.

GRUBB R. Advances in human immunoglobulin allotypes. *Exp Clin Immunogenet.*, 1995, 12, 191-197.

H

HALE G, REBELLO P, BRETTMAN LR, FEGAN C, KENNEDY B, KIMBY E, LEACH M, LUNDIN J, MELLSTEDT H, MORETON P, RAWSTRON AC, WALDMANN H, OSTERBORG A, HILLMEN P. Blood concentrations of alemtuzumab and antiglobulin responses in patients with chronic lymphocytic leukemia following intravenous or subcutaneous routes of administration. *Blood*, 2004, 104, 948-955.

HAMA Survey Group. Survey of methods for measuring human anti-mouse antibodies. *Clin Chim Acta.*, 1993, 215, 153-163.

HAMBURGER F, MORO E. Ueber die biologisch nach-weisbaren Veränderungen des menschlichen Blutes nach der Seruminjektion. *Wien. klin. Woch.*, 1903, xvi, 445-447.

HANAUER SB, FEAGAN BG, LICHTENSTEIN GR, MAYER LF, SCHREIBER S, COLOMBEL JF, RACHMILEWITZ D, WOLF DC, OLSON A, BAO W, RUTGEERTS P; ACCENT I Study Group. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet.*, 2002, 359, 1541-1549.

HANAUER SB, WAGNER CL, BALA M, MAYER L, TRAVERS S, DIAMOND RH, OLSON A, BAO W, RUTGEERTS P. Incidence and importance of antibody responses to infliximab after maintenance or episodic treatment in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 2004, 2, 542-553.

HARAOUI B, CAMERON L, OUELLET M, WHITE B. Antiinfliximab antibodies in patients with rheumatoid arthritis who require higher doses of infliximab to achieve or maintain a clinical response. *J Rheumatol.*, 2006, 33, 31-36.

HOOD LE. Wu and Kabat 1970: a transforming view of antibody diversity. *J Immunol*, 2008, 180, 7055-7056.

HOOGENBOOM HR, CHAMES P. Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunol Today.*, 2000, 21, 371-378.

HWANG WY, FOOTE J. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods.*, 2005, 36, 3-10.

HUMPHREY W, DALKE A, SCHULTEN K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph.*, 1996, 14, 27-28, 33-38.

I

INSTITUTE FOR INFLAMMATION RESEARCH, Rigshospitalet Univ Hosp, Copenhagen [référence du 13 novembre 2009], <http://www.inflammation.dk/iir/index.html>

ISAACS JD, WATTS RA, HAZELMAN BL, HALE G, KEOGAN MT, COBBOLD SP, WALDMANN H. Humanized monoclonal antibody therapy for rheumatoid arthritis. *Lancet.*, 1992, 340, 748-752.

ISAACS JD, WING MG, GREENWOOD JD, HAZLEMAN BL, HALE G, WALDMANN H. A therapeutic human IgG4 monoclonal antibody that depletes target cells in humans. *Clin Exp Immunol.*, 1996, 106, 427-433.

ISHIZAKA T, ISHIZAKA K, SALMON S, FUDENBERG H. Biologic activities of aggregated gamma-globulin. 8. Aggregated immunoglobulins of different classes. *J Immunol.*, 1967, 99, 82-91.

J

JAKOBOVITS A, AMADO RG, YANG X, ROSKOS L, SCHWAB G. From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nat Biotechnol.*, 2007, 25, 1134-1143.

JAZAYERI JA, CARROLL GJ. Fc-based cytokines : prospects for engineering superior therapeutics. *BioDrugs.*, 2008, 22, 11-26.

JEFFERIS R. The glycosylation of antibody molecules: functional significance. *Glycoconj J.*, 1993, 10, 358-361.

JEFFERIS R. Antibody therapeutics: isotype and glycoform selection. *Expert Opin Biol Ther.*, 2007, 7, 1401-1413.

JEFFERIS R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.*, 2009, 8, 226-234.

JEFFERIS R. The antibody paradigm: present and future development as a scaffold for biopharmaceutical drugs. In : HARDING, S (éd). *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*. Nottingham : Nottingham University Press, 2010, sous presse.

JEFFERIS R, LEFRANC M-P. Human immunoglobulins allotypes: possible implications for immunogenicity. *mAbs*, 2009, 1, 332-338.

K

KAAS Q, LEFRANC M-P. IMGT Colliers de Perles: standardized sequence-structure representations of the IgSF and MhcSF superfamily domains. *Current Bioinformatics*, 2007, 2, 21-30.

KABAT EA, WU TT, BILOFSKY H. Variable region genes for the immunoglobulin framework are assembled from small segments of DNA--a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1978, 75, 2429-2433.

KAMEDA H, PANDEY JP, KABURAKI J, INOKO H, KUWANA M. Immunoglobulin allotype gene polymorphisms in systemic sclerosis : interactive effect of MHC class II and KM genes on anticentromere antibody production. *Ann Rheum Dis.*, 1998, 57, 366-370.

KAMINSKI MS, ESTES J, ZASADNY KR, FRANCIS IR, ROSS CW, TUCK M, REGAN D, FISHER S, GUTIERREZ J, KROLL S, STAGG R, TIDMARSH G, WAHL RL. Radioimmunotherapy with iodine (131)I tositumomab for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: updated results and long-term follow-up of the University of Michigan experience. *Blood.*, 2000, 96, 1259-1266.

KANE S, FORD J, COHEN R, WAGNER C. Absence of infliximab in infants and breast milk from nursing mothers receiving therapy for Crohn's disease before and after delivery. *J Clin Gastroenterol.*, 2009, 43, 613-616.

KANEKO Y, NIMMERJAHN F, RAVETCH JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*, 2006, 313, 670-673.

KARMIRIS K, PAINAUD G, NOMAN M, MAGDELAINE-BEUZELIN C, FERRANTE M, DEGENNE D, CLAES K, COOPMAN T, VAN SCHUERBEEK N, VAN ASSCHE G, VERMEIRE S, RUTGEERTS P. Influence of through levels and immunogenicity on long-term outcome of adalimumab therapy in Crohn's disease *Gastroenterology.*, 2009, 137, 1628-1640.

KEYSTONE EC, KAVANAUGH AF, SHARP JT, TANNENBAUM H, HUA Y, TEOH LS, FISCHKOFF SA, CHARTASH EK. Radiographic, clinical, and functional outcomes of treatment with adalimumab (a human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy: a randomized, placebo-controlled, 52-week trial. *Arthritis Rheum.*, 2004, 50, 1400-1411.

KHAZAELI MB, SALEH MN, LIU TP, MEREDITH RF, WHEELER RH, BAKER TS, KING D, SECHER D, ALLEN L, ROGERS K, COLCHER D, SCHLOM J, SHOCHAT D, LOBUGLIO AF. Pharmacokinetics and immune response of ¹³¹I-chimeric mouse/human B72.3 (human gamma 4) monoclonal antibody in humans. *Cancer Res.*, 1991, 51, 5461-5466.

KHAZAELI MB, CONRY RM, LOBUGLIO AF. Human immune response to monoclonal antibodies. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.*, 1994, 15, 42-52.

KIM H, FARISS RN, ZHANG C, ROBINSON SB, THILL M, CSAKY KG. Mapping of the neonatal Fc receptor in the rodent eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2008, 49, 2025-2029.

KIM H, ROBINSON SB, CSAKY KG. FcRn receptor-mediated pharmacokinetics of therapeutic IgG in the eye. *Mol Vis.*, 2009, 15, 2803-2812.

KIND LS. Prophylactic value of tetanus antitoxin in mice previously injected with horse serum. *Br Med J*, 1957, 1, 498-499.

KLAKAMP SL, LU H, TABRIZI M, FUNELAS C, ROSKOS LK. Application of analytical detection concepts to immunogenicity testing. *Ana. Chem.*, 2007, 79, 8176-8184.

KNIGHT DM, TRINH H, LE J, SIEGE S, SHEALY D, McDONOUGH M, SCALLON B, AREVALO MOORE M, VILCEK J, DADDONA P, GHRAYEB J. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol.*, 1993, 30, 1443-1453.

KNIGHT DM, WAGNER C, JORDAN R, MCALEER MF, DERITA R, FASS DN, COLLIER BS, WEISMAN HF, GHRAYEB J. The immunogenicity of the 7E3 murine monoclonal Fab antibody fragment variable region is dramatically reduced in humans by substitution of human for murine constant regions. *Mol Immunol.*, 1995, 32, 1271-1281.

KRAPP S, MIMURA Y, JEFFERIS R, HUBER R, SONDERMANN P. Structural analysis of human IgG glycoforms reveals a correlation between oligosaccharide content, structural integrity and Fcγ-receptor affinity. *J. Mol. Biol.*, 2003, 325, 979-989.

KUUS-REICHEL K, GRAUER LS, KARAVODIN LM, KNOTT C, KRUSEMEIER M, KAY NE. Will immunogenicity limit the use, efficacy, and future development of therapeutic monoclonal antibodies? *Clin Diagn Lab Immunol.*, 1994, 1, 365-372.

L

LABRIJN AF, AALBERSE RC, SCHUURMAN J. When binding is enough: nonactivating antibody formats. *Curr Opin Immunol.*, 2008, 20, 479-485.

LABRIJN AF, BUIJSSE AO, VAN DEN BREMER ET, VERWILLIGEN AY, BLEEKER WK, THORPE SJ, KILLESTEIN J, POLMAN CH, AALBERSE RC, SCHUURMAN J, VAN DE WINKEL JG, PARREN PW. Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo. *Nat Biotechnol.*, 2009, 27, 767-771.

LAFFLY E, DANJOU L, CONDEMIN F, VIDAL D, DROUET E, LEFRANC MP, BOTTEX C, THULLIER P. Selection of a macaque Fab with framework regions like those in humans, high affinity, and ability to neutralize the protective antigen (PA) of *Bacillus anthracis* by binding to the segment of PA between residues 686 and 694. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2005, 49, 3414-3420.

LAUNOIS B, CAMPION JP, FAUCHET R, KERBAOL M, CARTIER F. Prospective randomized clinical trial in patients with cadaver kidney transplants. *Transplant Proc*, 1977, 9, 1027–1030.

LE J, VILCEK J, DADDONA P, GHRAYEB J, KNIGHT D, SIEGEL S. Anti-TNF antibodies and peptides of human tumor necrosis factor. US6277969, 2001.

LEFRANC G, LEFRANC M-P, HELAL AN, BOUKEF K, CHAABANI H, GANDOURA MS, VAN LOGHEM E. Unusual heavy chains of human IgG immunoglobulins: rearrangements of the CH domain exons. *J Immunogenet.*, 1982, 9, 1-9.

LEFRANC G, **LEFRANC M-P**. Prevalent Gm haplotypes of the human IGHG3,IGHG1 and IGHG2 alleles in different populations. Allotypes. In: IMGT Repertoire (IG and TR). IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®, [référence du 4 décembre 2009],

http://www.imgt.org/textes/IMGTrepertoire/Proteins/allotypes/human/IGH/IGHC/Hu_IGHCaIlotypes2.html

LEFRANC M-P, **LEFRANC G**. *The Immunoglobulin FactsBook*. Londres : Academic Press, 2001, 458 p.

LEFRANC M-P, POMMIE C, RUIZ M, GIUDICELLI V, FOULQUIER E, TRUONG L, THOUVENIN-CONTET V, LEFRANC G. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev Comp Immunol*, 2003, 27, 55-77.

LEFRANC M-P, GIUDICELLI V, GINESTOUX C, JABADO-MICHALOUD J, FOLCH G, BELLAHCENE F, WU Y, GEMROT E, BROCHET X, LANE J, REGNIER L, EHRENMANN F, LEFRANC G, DUROUX P. IMGT[®], the international ImMunoGeneTics information system[®]. *Nucl. Acids Res.*, 2009, 37, D1006-D1012.

LEON G, ROJAS G, LOMONTE B, GUTIERREZ JM. Immunoglobulin G and F(ab')₂ polyvalent antivenoms do not differ in their ability to neutralize hemorrhage, edema and myonecrosis induced by Bothrops asper (Terciopelo) snake venom. *Toxicon.*, 1997, 35, 1627–1637.

LITTLEWOOD AH, MANT AK, WRIGHT GP. Fatal tetanus in a boy after prophylactic tetanus antitoxin. *Br Med J*, 1954, 2, 444-445.

LOBUGLIO AF, WHEELER RH, TRANG J, HAYNES A, ROGERS K, HARVEY EB, SUN L, GHRAYEB J, KHAZAELI MB. Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1989, 86, 4220-4224.

LOFGREN JA, WALA I, KOREN E, SWANSON SJ, JING S. Detection of neutralizing anti-therapeutic protein antibodies in serum or plasma samples containing high levels of therapeutic protein. *J Immunol Methods.*, 2006, 308, 101-108.

LOFGREN JA, DHANDAPANI S, PENNUCCI JJ, ABBOTT CM, MYTYCH DT, KALIYAPERUMAL A, SWANSON SJ, MULLENIX MC. Comparing ELISA and Surface Plasmon Resonance for Assessing Clinical Immunogenicity of Panitumumab. *J. Immunol.*, 2007, 178, 7467-7472.

LOISEL S, OHRESSER M, PALLARDY M, DAYDE D, BERTHOU C, CARTRON G, WATIER H. Relevance, advantages and limitations of animal models used in the development of monoclonal antibodies for cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol.*, 2007, 62, 34-42.

LONBERG N. Fully human antibodies from transgenic mice and phage display platforms. *Curr Opin Immunol.*, 2008, 20, 450-459.

LONGCOPE WT, RACKEMANN FM. The relation of circulating antibodies to serum disease. *J Exp Med.*, 1918, 27, 341-358.

LOU D, KOHLER H. Enhanced molecular mimicry of CEA using photoaffinity crosslinked C3d peptide. *Nat Biotechnol.*, 1998, 16, 458-462.

LOUIS E, VERMEIRE S, RUTGEERTS P, DE VOS M, VAN GOSSUM A, PESCATORE P, FIASSE R, PELCKMANS P, REYNAERT H, D'HAENS G, MALAISE M, BELAICHE J. 2002, A positive response to infliximab in Crohn disease: association with a higher systemic inflammation before treatment but not with -308 TNF gene polymorphism. *Scand J Gastroenterol.*, 37, 818-824.

LOUIS E, EL GHOUL Z, VERMEIRE S, DALL'OZZO S, RUTGEERTS P, PAINTAUD G, BELAICHE J, DE VOS M, VAN GOSSUM A, COLOMBEL JF, WATIER H. Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.*, 2004, 19, 511-519.

LOUIS EJ, WATIER HE, SCHREIBER S, HAMPE J, TAILLARD F, OLSON A, THORNE N, ZHANG H, COLOMBEL JF. Polymorphism in IgG Fc receptor gene FCGR3A and response to infliximab in Crohn's disease: a subanalysis of the ACCENT I study. *Pharmacogenet Genomics.*, 2006, 16, 911-914.

LOVESLATI BY, SANCHEZ-MAZAS A, ENNAFAA H, DUGOUJON JM, LEFRANC M-P, BEN AMMAR ELGAAIED A. A study of Gm allotypes and immunoglobulin heavy gamma IGHG genes in Berbers, Arabs and sub-Saharan Africans from Jerba Island, Tunisia. *Eur J Immunogenet.*, 2001, 28, 531-538.

LOWE PJ, TANNENBAUM S, GAUTIER A, JIMENEZ P. Relationship between omalizumab pharmacokinetics, IgE pharmacodynamics and symptoms in patients with severe persistent allergic (IgE-mediated) asthma. *Br J Clin Pharmacol.*, 2009, 68, 61-76.

M

MAAS C, HERMELING S, BOUMA B, JISKOOT W, GEBBINK MF. A role for protein misfolding in immunogenicity of biopharmaceuticals. *J Biol Chem.*, 2007, 282, 2229-2236.

MAGDELAINE-BEUZELIN C, VERMEIRE S, GOODALL M, BAERT F, NOMAN M, ASSCHE GV, OHRESSER M, DEGENNE D, DUGOUJON JM, JEFFERIS R, RUTGEERTS P, LEFRANC MP, WATIER H. IgG1 heavy chain-coding gene polymorphism (G1m allotypes) and development of antibodies-to-infliximab. *Pharmacogenet Genomics.* 2009, 19, 383-387.

MAGDELAINE-BEUZELIN C, VERMEIRE S, GOODALL M, BAERT F, NOMAN M, ASSCHE GV, OHRESSER M, DEGENNE D, DUGOUJON JM, JEFFERIS R, RUTGEERTS P, LEFRANC MP, WATIER H. IgG1 heavy chain-coding gene polymorphism (G1m allotypes) and development of antibodies-to-infliximab. *Pharmacogenet Genomics.*, 2009, 19, 383-387.

MAGDELAINE-BEUZELIN C, OHRESSER M, WATIER H. FcRn, un récepteur d'IgG aux multiples facettes. *Med Sci.*, 2009, 25, 1053-1056.

MAHADEVAN U, KANE S, SANDBORN WJ, COHEN RD, HANSON K, TERDIMAN JP, BINION DG. Intentional infliximab use during pregnancy for induction or maintenance of remission in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.*, 2005, 21, 733-738.

MAINI RN, BREEDVELD FC, KALDEN JR, SMOLEN JS, DAVIS D, MACFARLANE JD, ANTONI C, LEEB B, ELLIOTT MJ, WOODY JN, SCHAIBLE TF, FELDMANN M. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1998, 41, 1552-156.

MANSOUR AM, BYNOE LA, WELCH JC, PESAVENTO R, MAHENDRADAS P, ZIEMSEN F, PAI SA. Retinal vascular events after intravitreal bevacizumab. *Acta Ophthalmol.*, 2009, sous presse.

MARASCO WA, SUI J. The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nat Biotechnol.*, 2007, 25, 1421-1434.

MARTINEZ A, SALIDO M, BONILLA G, PASCUAL-SALCEDO D, FERNANDEZ-ARQUERO M, de MIGUEL S, Balsa A, de la CONCHA E, FERNANDEZ-GUTIERREZ B. Association of the Major Histocompatibility Complex with response to infliximab therapy in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.*, 2004, 50, 1077-1082.

MASCHERETTI S, SCHREIBER S. The role of pharmacogenomics in the prediction of efficacy of anti-TNF therapy in patients with Crohn's disease. *Pharmacogenomics.*, 2004, 5, 479-486.

MASER EA, VILLELA R, SILVERBERG MS, GREENBERG GR. Association of trough serum infliximab to clinical outcome after scheduled maintenance treatment for Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 2006, 4, 1248-1254.

MATSUMIYA S, YAMAGUCHI Y, SAITO J, NAGANO M, SASAKAWA H, OTAKI S, SATOH M, SHITARA K, KATO K. Structural comparison of fucosylated and nonfucosylated Fc fragments of human immunoglobulin G1. *J. Mol. Biol.*, 2007, 368, 767-779.

MCLAUGHLIN P, GRILLO-LOPEZ AJ, LINK BK, LEVY R, CZUCZMAN MS, WILLIAMS ME, HEYMAN MR, BENCE-BRUCKLER I, WHITE CA, CABANILLAS F, JAIN V, HO AD, LISTER J, WEY K, SHEN D, DALLAIRE BK. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol.*, 1998, 16, 2825-2833.

MELMED GY, TARGAN SR, YASOTHAN U, HANICQ D, KIRKPATRICK P. Certolizumab pegol. *Nat Rev Drug Discov.*, 2008, 7, 641-642.

MICHIELS J. La réaction sérique intracutanée. *Arch. de méd. d. enf.*, 1913, xvi, 835-844.

MIELE E, MARKOWITZ JE, MAMULA P, BALDASSANO RN. Human antichimeric antibody in children and young adults with inflammatory bowel disease receiving infliximab. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 2004, 38, 502-508.

MIRICK GR, BRADT BM, DENARDO SJ, DENARDO GL. A review of human anti-globulin antibody (HAGA, HAMA, HACA, HAAHA) responses to monoclonal antibodies. Not four letter words. *Q J Nucl Med Mol Imaging.*, 2004, 48, 251-257.

MIRE-SLUIS AR, BARRETT YC, DEVANARAYAN V, KOREN E, LIU H, MAIA M, PARISH T, SCOTT G, SHANKAR G, SHORES E, SWANSON SJ, TANIGUCHI G, WIERDA D, ZUCKERMAN LA. Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. *J Immunol Methods.*, 2004, 289, 1-16.

MOXNESS M, TATAREWICZ S, WEERARATNE D, MURAKAMI N, WULLNER D, MYTYCH D, JAWA V, KOREN E, SWANSON SJ. Immunogenicity testing by electrochemiluminescent detection for antibodies directed against therapeutic human monoclonal antibodies. *Clin Chem.*, 2005, 51, 1983-1985.

MOREA V, LESK AM, TRAMONTANO A. Antibody modelling : implications for engineering and design. *Methods.*, 2000, 20, 267-279.

MORELL A, TERRY WD, WALDMANN TA. Metabolic properties of IgG subclasses in man. *J Clin Invest.*, 1970, 49, 673-680.

MORRISON SL, JOHNSON MJ, HERZENBERG LA, OI VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1984, 81, 6851-6855.

MUELLER JP, GIANNONI MA, HARTMAN SL, ELLIOTT EA, SQUINTO SP, MATIS LA, EVANS MJ. Humanized porcine VCAM-specific monoclonal antibodies with chimeric IgG2/G4 constant regions block human leukocyte binding to porcine endothelial cells. *Mol Immunol.*, 1997, 34, 441-452.

MULLEMAN D, MERIC JC, PAINTAUD G, DUCOURAU E, MAGDELAINE-BEUZELIN C, VALAT JP, GOUPILLE P. Infliximab concentration monitoring improves the control of disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.*, 2009, sous presse.

MURASHIMA A, WATANABE N, OZAWA N, SAITO H, YAMAGUCHI K. Etanercept during pregnancy and lactation in a patient with rheumatoid arthritis: drug levels in maternal serum, cord blood, breast milk and the infant's serum. *Ann Rheum Dis.*, 2009, 68, 1793-1794.

N

NASHAN B. Antibody induction therapy in renal transplant patients receiving calcineurin-inhibitor immunosuppressive regimens: a comparative review. *BioDrugs.*, 2005, 19, 39-46.

NATION NS, PIERCE NF, ADLER SJ, CHINNOCK RF, WEHRLE PF. Tetanus; the use of human hyperimmune globulin in treatment. *Calif Med*, 1963, 98, 305-307.

NESBITT A, FOSSATI G, BERGIN M, STEPHENS P, STEPHENS S, FOULKES R, BROWN D, ROBINSON M, BOURNE T. Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): in vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor alpha agents. *Inflamm Bowel Dis.*, 2007, 13, 1323-1332.

NIBLACK G, JOHNSON K, WILLIAMS T, GREEN W, RICHIE R, MACDONELL R. Antibody formation following administration of antilymphocyte serum. *Transplant Proc.*, 1987, 19, 1896-1897.

NIMMERJAHN F, RAVETCH JV. Antibodies, Fc receptors and cancer. *Curr Opin Immunol.*, 2007, 19, 239-245.

NISSIM A, CHERNAJOVSKY Y. Historical development of monoclonal antibody therapeutics. *Handb Exp Pharmacol.*, 2008, 181, 3-18.

NIWA R, NATSUME A, UEHARA A, WAKITANI M, IIDA S, UCHIDA K, SATOH M, SHITARA K. IgG subclass-independent improvement of antibody-dependent cellular cytotoxicity by fucose removal from Asn297-linked oligosaccharides. *J Immunol Methods.*, 2005, 306, 151-160.

NYGREN H, CZERKINSKY C, STENBERG M. Dissociation of antibodies bound to surface-immobilized antigen. *J Immunol Methods.*, 1985, 85, 87-95.

O

OBER RJ, RADU CG, GHETIE V, WARD ES. Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *Int Immunol.* 2001, 13, 1551-1559.

OXELIUS VA, AURIVILLIUS M, CARLSSON AM, MUSIL K. Serum Gm allotype developpement during childhood. *Scand J Immunol.*, 1999, 50 : 440-446.

P

PANDEY JP. Immunoglobulin GM and KM allotypes and vaccine immunity. *Vaccine.*, 2001, 19, 613-617.

PAPPAS DA, BATHON JM, HANICQ D, YASOTHAN U, KIRKPATRICK P. Golimumab. *Nat Rev Drug Discov.*, 2009, 8, 695-696.

PATTON A, MULLENIX MC, SWANSON SJ, KOREN E. An acid dissociation bridging ELISA for detection of antibodies directed against therapeutic proteins in the presence of antigen. *J. Immunol. Methods*, 2005, 304, 189-195.

POPE CG. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. I. True digestion of the proteins. *Br J Exp Pathol*, 1939, 20, 132-149.

PORTER RR. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J.*, 1959, 73, 119-126.

PORTER RR. The structure of the heavy chain of immunoglobulin and its relevance to the nature of the antibody-combining site. The Second CIBA Medal Lecture. *Biochem J.*, 1967, 105, 417-426.

PORTIER P, RICHEL C. De l'action anaphylactique de certains venins. *CR Séances Mém Soc Biol Paris*, 1902, 54, 170.

PRIN MATHIEU C, RENOULT E, KENNEL DE MARCH A, BENE MC, KESSLER M, FAURE GC. Serum anti-rabbit and anti-horse IgG, IgA, and IgM in kidney transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant*, 1997, 12, 2133-2139.

Q

QIAN J, LIU T, YANG L, DAUS A, CROWLEY R, ZHOU Q. Structural characterization of N-linked oligosaccharides on monoclonal antibody cetuximab by the combination of orthogonal matrix-assisted laser desorption/ionization hybrid quadrupole-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and sequential enzymatic digestion. *Anal Biochem.*, 2007, 364, 8–18.

R

RADSTAKE TR, SVENSON M, EIJSBOUTS AM, VAN DEN HOOGEN FH, ENEVOLD C, VAN RIEL PL, BENDTZEN K. Formation of antibodies against infliximab and adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.*, 2009, 68, 1739-1745.

REFF ME, CARNER K, CHAMBERS KS, CHINN PC, LEONARD JE, RAAB R, NEWMAN RA, HANNA N, ANDERSON DR. Depletion of B cells in vivo by chimeric mouse-human monoclonal antibody to CD20. *Blood*, 1994, 83, 435-445.

REGAZZI MB, IACONA I, AVANZINI MA, ARCAINI L, MERLINI G, PERFETTI V, ZAJA F, MONTAGNA M, MORRA E, LAZZARINO M. Pharmacokinetic behavior of rituximab: a study of different schedules of administration for heterogeneous clinical settings. *Ther Drug Monit*, 2005, 27, 785-792.

REICH K, NESTLE FO, PAPP K, ORTONNE JP, EVANS R, GUZZO C, LI S, DOOLEY LT, GRIFFITHS CE; EXPRESS study investigators. Infliximab induction and maintenance therapy for moderate-to-severe psoriasis: a phase III, multicentre, double-blind trial. *Lancet.*, 2005, 366, 1367-1374.

REICHERT JM. Technology evaluation: lumiliximab, Biogen Idec. *Curr Opin Mol Ther.*, 2004, 6, 675-683.

REITAN SK, HANNESTAD K. Immunoglobulin heavy chain constant regions regulate immunity and tolerance to idiotypes of antibody variable regions. *Proc Natl Acad Sci.*, 2002, 99, 7588-7593.

RIECHMANN L, CLARK M, WALDMANN H, WINTER G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature.*, 1988, 332, 323–327.

RODRIGUES EB, FARAH ME, MAIA M, PENHA FM, REGATIERI C, MELO GB, PINHEIRO MM, ZANETTI CR. Therapeutic monoclonal antibodies in ophthalmology. *Prog Retin Eye Res.*, 2009, 28, 117-144.

ROSENAU MJ, ANDERSON JF. *Bull. Hyg. Lab., U. S. P. H.*, 1908, 45.

ROSENFELD PJ, MOSHFEGHI AA, PULIAFITO CA. Optical coherence tomography 320 findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for neovascularization age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Laser Imaging.*, 2005, 36:331–335.

ROSENFELD PJ, HEIER JS, HANTSBARGER G, SHAMS N. Tolerability and efficacy of multiple escalating doses of ranibizumab (Lucentis) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology.*, 2006, 113, 623-632.

ROTHER RP, ROLLINS SA, MOJCIK CF, BRODSKY RA, BELL L. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat Biotechnol.*, 2007, 25, 1256-1264. Erratum in: *Nat Biotechnol.*, 2007, 25, 1488.

RUBBO SD, SURI JC. Passive immunization against tetanus with human immune globulin. *Br Med J.*, 1962, 2, 79-81.

RUIZ M, LEFRANC M-P. IMGT gene identification and Colliers de Perles of human immunoglobulins with known 3D structures. *Immunogenetics.*, 2002, 53, 857-883.

S

SACHS UJ, SOCHER I, BRAEUNLICH CG, KROLL H, BEIN G, SANTOSO S. A variable number of tandem repeats polymorphism influences the transcriptional activity of the neonatal Fc receptor alpha-chain promoter. *Immunology.*, 2006, 119, 83-89.

SALFELD J, ALLEN D, KAYMAKCALAN Z, LABKOVSKY B, MANKOVICH JA, MCGUINNESS BT, ROBERTS AJ, SAKORAFAS P, HOOGENBOOM HRJM,

SCHOENHAUT D, VAUGHAN TJ, WHITE M, WILTON AJ. Human antibodies that bind human TNF alpha. WO9729131, 1997.

SALFELD JG. Isotype selection in antibody engineering. *Nat Biotechnol.*, 2007, 25, 1369-1372.

SANDBORN WJ, HANAUER SB, RUTGEERTS P, FEDORAK RN, LUKAS M, MACINTOSH DG. Adalimumab for maintenance treatment of Crohn's disease: results of the CLASSIC II trial. *Gut*, 2007, 56, 1232–1239.

SANDBORN WJ, FEAGAN BG, STOINOV S, HONIBALL PJ, RUTGEERTS P, MASON D, BLOOMFIELD R, SCHREIBER S; PRECISE 1 Study Investigators. Certolizumab pegol for the treatment of Crohn's disease. *N Engl J Med.*, 2007, 357, 228-238.

SAPHIRE EO, PARREN PW, PANTOPHLET R, ZWICK MB, MORRIS GM, RUDD PM, DWEK RA, STANFIELD RL, BURTON DR, WILSON IA. Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science.*, 2001, 293, 1155-1159.

SATO T, EMI K, IKEDA T, BANDO H, SATO S, MORITA SI, OYAGI T, SAWADA K. Severe intraocular inflammation after intravitreal injection of bevacizumab. *Ophthalmology.*, 2009, sous presse.

SCALLON BJ, MOORE MA, TRINH H, KNIGHT DM, GHRAYEB J. Chimeric anti-TNF-alpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions. *Cytokine.*, 1995, 7, 251–259.

SCHLACHETZKI F, ZHU C, PARDRIDGE WM. Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) at the blood-brain barrier. *J Neurochem.*, 2002, 81, 203-206.

SCHMIDT E, HENNIG K, MENGEDE C, ZILLIKENS D, KROMMINGA A. Immunogenicity of rituximab in patients with severe pemphigus. *Clin Immunol.*, 2009, 132, 334–341.

SCHREIBER S, KHALIQ-KAREEMI M, LAWRENCE IC, THOMSEN OØ, HANAUER SB, MCCOLM J, BLOOMFIELD R, SANDBORN WJ; PRECISE 2 Study Investigators. Maintenance therapy with certolizumab pegol for Crohn's disease. *N Engl J Med.*, 2007, 357, 239-250.

SCHREIBER S, KHALIQ-KAREEMI M, LAWRENCE IC, THOMSEN OØ, HANAUER SB, MCCOLM J, BLOOMFIELD R, SANDBORN WJ. PRECISE 2 Study Investigators. Maintenance therapy with certolizumab pegol for Crohn's disease. *N Engl J Med.*, 2007, 19, 357, 239-250.

SEIFERT SA, BOYER LV. Recurrence phenomena after immunoglobulin therapy for snake envenomations: Part 1. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of immunoglobulin antivenoms and related antibodies. *Ann Emerg Med.*, 2001, 37, 189-195.

SHANKAR G, DEVANARAYAN V, AMARAVADI L, BARRETT YC, BOWSHER R, FINCO-KENT D, FISCELLA M, GOROVITS B, KIRSCHNER S, MOXNESS M, PARISH T, QUARMBY V, SMITH H, SMITH W, ZUCKERMAN LA, KOREN E. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *J Pharm Biomed Anal.*, 2008, 48, 1267-1281.

SHIH T, LINDLEY C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clin Ther.*, 2006, 28, 1779-1802.

SHIRE SJ, SHAHROKH Z, LIU J. Challenges in the development of high protein concentration formulations. *J Pharm Sci.* 2004, 93, 1390-1402.

SICKERT D, KROEGER K, ZICKLER C, CHOKOTE E, WINKLER B, GRENET JM, LEGAY F, ZAAR A. Improvement of drug tolerance in immunogenicity testing by acid treatment on Biacore. *J Immunol Methods.*, 2008, 334, 29-36.

SILVERTEIN, AM. *A History of Immunology*. United States of America: Academic Press, 1989, 530p.

SILVERSTEIN AM. Clemens Freiherr von Pirquet: explaining immune complex disease in 1906. *Nat Immunol*, 2000,1, 453-455.

SMITH RI, COLOMA MJ, MORRISON SL. Addition of a mu-tailpiece to IgG results in polymeric antibodies with enhanced effector functions including complement-mediated cytotoxicity by IgG4. *J Immunol.*, 1995, 154, 2226-2236.

SMITH HW, BUTTERFIELD A, SUN D. Detection of antibodies against therapeutic proteins in the presence of residual therapeutic protein using a solid-phase extraction with acid dissociation (SPEAD) sample treatment prior to ELISA. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2007, 49, 230-237.

SMOLENS J, STOKES J Jr, VOGT AB. Human plasmapheresis and its effect on antibodies. *J Immunol.*, 1957, 79, 434-439.

SMOLENS J, VOGT AB, CRAWFORD MN, STOKES J Jr. The persistence in the human circulation of horse and human tetanus antitoxins. *J Pediatr.*, 1961, 59, 899-902.

SPENGLER M, ADLER M, JONAS A, NIEMEYER CM. Immuno-PCR assays for immunogenicity testing. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2009, 387, 278-282.

SPIEGELBERG HL, WEIGLE WO. The catabolism of homologous and heterologous 7S gamma globulin fragments. *J Exp Med.*, 1965, 121, 323-338.

SPIEGELBERG HL, FISHKIN BG, GREY HM. Catabolism of human gammaG-immunoglobulins of different heavy chain subclasses. I. Catabolism of gammaG-myeloma proteins in man. *J Clin Invest.*, 1968, 47, 2323-2330.

SPIEGELBERG HL, GREY HM. Catabolism of human gamma-G immunoglobulins of different heavy chain subclasses. II. Catabolism of gamma-G myeloma proteins in heterologous species. *J Immunol.*, 1968, 101, 711-716.

SPIEKERMANN GM, FINN PW, WARD ES, DUMONT J, DICKINSON BL, BLUMBERG RS, LENCER WI. Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung, *J. Exp. Med.*, 2002, 196, 300–310.

STAPLETON NM, STEMERING AM, BJARNARSON S, ANDERSEN JT, VERHEUL RC, GERRITSEN J, ZHAO Y, KLEIJER M, SANDLIE I, de HAAS M, JONDSOTTIR I, van der SHOOT CE, VIDARSSON G. Extending IgG3 half-life in humans by a single iso-allotypic amino acid substitution for enhanced in vivo therapies. In : *European Journal of Immunology, Immunity for Life, Immunology for Health, 2nd European Congress of Immunology, Berlin, Germany, September 13-16, 2009*, 39, S1, S1-S808.

STARZL TE, MARCHIORO TL, HUTCHINSON DE, PORTER KA, CERILLI GJ, BRETTSCHEIDER L. The clinical use of antilymphocyte globulin in renal homotransplantation. *Transplantation*, 1967, 5, Suppl:1100-1105.

ST CLAIR EW, WAGNER CL, FASANMADE AA, WANG B, SCHAIBLE T, KAVANAUGH A, KEYSTONE EC. The relationship of serum infliximab concentrations to

clinical improvement in rheumatoid arthritis: results from ATTRACT, a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.*, 2002, 46, 1451-1459.

STEIN KE. Immunogenicity : concepts, issues, concerns. *Dev Biol.*, 2002, 109, 15-23.

SVENSON M, GEBOREK P, SAXNE T, BENDTZEN K. Monitoring patients treated with anti-TNF-alpha biopharmaceuticals: assessing serum infliximab and anti-infliximab antibodies. *Rheumatology*, 2007, 46, 1828–1834.

T

TALMAGE DW, DIXON FJ, BUKANTZ SC, DAMMIN GJ. Antigen elimination from the blood as an early manifestation of the immune response. *J Immunol*, 1951, 67, 243-255.

TANRIOVER B, CHUANG P, FISHBACH B, HELDERMAN JH, KIZILISIK T, NYLANDER W, SHAFFER D, LANGONE AJ. Polyclonal antibody-induced serum sickness in renal transplant recipients: treatment with therapeutic plasma exchange. *Transplantation*, 2005, 80, 279-281.

TAO MH, SMITH RI, MORRISON SL. Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation. *J. Exp. Med.*, 1993, 178, 661-667.

TARGAN SR, HANAUER SB, VAN DEVENTER SJ, MAYER L, PRESENT DH, BRAAKMAN T. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med.*, 1997, 337, 1029–1035.

TATUM AH, BOLLINGER RR, SANFILIPPO F. Rapid serologic diagnosis of serum sickness from antithymocyte globulin therapy using enzyme immunoassay. *Transplantation*, 1984, 38, 582-586.

TERNANT D, PAINAUD G. Pharmacokinetics and concentration-effect relationships of therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins. *Expert Opin Biol Ther*, 2005, 5 Suppl 1:S37-47.

TERNANT D, MULLEMAN D, DEGENNE D, WILLOT S, GUILLAUMIN JM, WATIER H, GOUPILLE P, PAINAUD G. An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of infliximab. *Ther Drug Monit.*, 2006, 28, 169-174.

TERNANT D, AUBOURG A, MAGDELAINE-BEUZELIN C, DEGENNE D, WATIER H, PICON L, PAINAUD G. Infliximab pharmacokinetics in inflammatory bowel disease patients. *Ther Drug Monit.*, 2008, 30, 523-529.

THEAKSTON RD, WARRELL DA, GRIFFITHS E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon.*, 2003, 41, 541-557.

THOMAS TC, ROLLINS SA, ROTHER RP, GIANNONI MA, HARTMAN SL, ELLIOTT EA, NYE SH, MATIS LA, SQUINTO SP, EVANS MJ. Inhibition of complement activity by humanized anti-C5 antibody and single-chain Fv. *Mol Immunol.*, 1996, 33, 1389-1401.

THURLINGS RM, TENG O, VOS K, GERLAG DM, AARDEN L, STAPEL SO, VAN LAAR JM, TAK PP, WOLBINK GJ. Clinical response, pharmacokinetics, development of human anti-chimeric antibodies, and synovial tissue response to rituximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.*, 2009, 69, 409-412.

U

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH, CENTER FOR VETERINARY MEDICINE. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation (May 2001), [référence du 10 septembre 2009]. Available at <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>

V

VAN ASSCHE G, MAGDELAINE-BEUZELIN C, D'HAENS G, BAERT F, NOMAN M, VERMEIRE S, TERNANT D, WATIER H, PAINAUD G, RUTGEERTS P. Withdrawal of immunosuppression in Crohn's disease treated with scheduled infliximab maintenance: a randomized trial. *Gastroenterology.*, 2008, 134, 1861-1868.

VAN DEN BEMT BJ, DEN BROEDER AA, SNIJDERS GF, HEKSTER YA, VAN RIEL PL, BENRAAD B, WOLBINK GJ, VAN DEN HOOGEN FH. Sustained effect after lowering high-dose infliximab in patients with rheumatoid arthritis: a prospective dose titration study. *Ann Rheum Dis.*, 2008, 67, 1697-1701.

VAN DE PUTTE LB, ATKINS C, MALAISE M, SANY J, RUSSELL AS, VAN RIEL PL, SETTAS L, BIJLSMA JW, TODESCO S, DOUGADOS M, NASH P, EMERY P, WALTER N, KAUL M, FISCHKOFF S, KUPPER H. Efficacy and safety of adalimumab as monotherapy in patients with rheumatoid arthritis for whom previous disease modifying antirheumatic drug treatment has failed. *Ann Rheum Dis.*, 2004, 63, 508-516.

VAN DER BIJL AE, BREEDVELD FC, ANTONI CE, KALDEN JR, KARY S, BURMESTER GR, BECKMANN C, UNNEBRINK K, KUPPER H. An open-label pilot study of the effectiveness of adalimumab in patients with rheumatoid arthritis and previous infliximab treatment: relationship to reasons for failure and anti-infliximab antibody status. *Clin Rheumatol.*, 2008, 27, 1021-1028.

VAN DER LAKEN CJ, VOSKUYL AE, ROOS JC, STIGTER VAN WALSUM M, DE GROOT ER, WOLBINK G, DIJKMANS BA, AARDEN LA. Imaging and serum analysis of immune complex formation of radiolabelled infliximab and anti-infliximab in responders and non-responders to therapy for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.*, 2007, 66, 253-256.

VASILIAUSKAS EA, CHURCH JA, SILVERMAN N, BARRY M, TARGAN SR, DUBINSKY MC. Case report: evidence for transplacental transfer of maternally administered infliximab to the newborn. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 2006, 4, 1255-1258.

VERMEIRE S, NOMAN M, VAN ASSCHE G, BAERT F, D'HAENS G, RUTGEERTS P. Effectiveness of concomitant immunosuppressive therapy in suppressing the formation of antibodies to infliximab in Crohn's disease. *Gut*, 2007, 56, 1226-1231.

VON PIRQUET C, **SCHICK B**. *Die Serumkrankheiten*. Leipzig & Wien : F. Deuticke, 1905, 144 p.

W

WADHWA M, GAINES-DAS R, THORPE R, MIRE-SLUIS A. Detection, measurement and characterization of unwanted antibodies induced by therapeutic biologicals. *Dev Biol (Basel)*., 2005, 122, 155-170.

WAGNER CL, SCHANTZ A, BARNATHAN E, OLSON A, MASCELLI MA, FORD J, DAMARAJU L, SCHAIBLE T, MAINI RN, TCHENG JE. Consequences of immunogenicity to the therapeutic monoclonal antibodies ReoPro and Remicade. *Dev Biol (Basel)*., 2003, 112, 37-53.

WANG X, DAS TK, SINGH SK, KUMAR S. Potential aggregation prone regions in biotherapeutics. A survey of commercial monoclonal antibodies. *mAbs.*, 2009, 3, 254-267.

WATIER H. De la sérothérapie aux anticorps recombinants « nus », plus d'un siècle de succès en thérapie ciblée. *Med Sci*, 2009, 25, 999-1009.

WEBER CA, MEHTA PJ, ARDITO M, MOISE L, MARTIN B, DE GROOT AS. T cell epitope: Friend or Foe? Immunogenicity of biologics in context. *Adv Drug Deliv Rev.*, 2009, 30, 965-976.

WEIL R. The analysis of serum sickness. *Proc. N. York Path. Soc.*, 1916, XVI, 68-71.

WEINBLATT ME, KEYSTONE EC, FURST DE, MORELAND LW, WEISMAN MH, BIRBARA CA, TEOH LA, FISCHKOFF SA, CHARTASH EK. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum.*, 2003, 48, 35-45. Erratum in: *Arthritis Rheum.*, 2003, 48, 855.

WHITMER KJ, ROMBALL CG, WEIGLE WO. Induction of tolerance to human gamma-globulin in FcR gamma- and Fc gammaRII-deficient mice. *J Immunol.*, 1997, 159, 644-649.

WILLOT S, VERMEIRE S, OHRESSER M, RUTGEERTS P, PAINAUD G, BELAICHE J, DE VOS M, VAN GOSSUM A, FRANCHIMONT D, COLOMBEL JF, WATIER H, LOUIS E. No association between C-reactive protein gene polymorphisms and decrease of C-reactive protein serum concentration after infliximab treatment in Crohn's disease. *Pharmacogenet Genomics.*, 2006, 16, 37-42.

WINAU F, WINAU R. Emil von Behring and serum therapy. *Microbes Infect.*, 2002, 4, 185-188.

WOLBINK GJ, VIS M, LEMS W, VOSKUYL AE, DE GROOT E, NURMOHAMED MT, STAPEL S, TAK PP, AARDEN L, DIJKMANS B. Development of anti-infliximab antibodies and relationship to clinical response in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2006, 54, 711-715.

WONG M, ZIRING D, KORIN Y, DESAI S, KIM S, LIN J, GJERTSON D, BRAUN J, REED E, SINGH RR. TNFalpha blockade in human diseases: mechanisms and future directions. *Clin Immunol.*, 2008, 126, 121-136.

WU TT, KABAT EA. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med.*, 1970, 132, 211-250.

WYPYCH J, LI M, GUO A, ZHANG Z, MARTINEZ T, ALLEN MJ, FODOR S, KELNER DN, FLYNN GC, LIU YD, BONDARENKO PV, RICCI MS, DILLON TM, BALLAND A. Human IgG2 antibodies display disulfide-mediated structural isoforms. *J Biol Chem.*, 2008, 283, 16194-16205.

X

XU Z, SEITZ K, FASANMADE A, FORD J, WILLIAMSON P, XU W, DAVIS HM, ZHOU H. Population pharmacokinetics of infliximab in patients with ankylosing spondylitis. *J Clin Pharmacol.*, 2008, 48, 681–695.

Y

YATA Y, OTSUJI E, OKAMOTO K, TSURUTA H, KOBAYASHI S, TOMA A, YAMAGISHI H. Decreased production of anti-mouse antibody after administration of human/mouse chimeric monoclonal antibody-neocarzinostatin conjugate to human. *Hepatogastroenterology.*, 2003, 50, 80-84.

YOUNT WJ, DORNER MM, KUNKEL HG, KABAT EA. Studies on human antibodies. VI. Selective variations in subgroup composition and genetic markers. *J Exp Med.*, 1968, 27, 633-646.

Z

ZHANG Y, PARDRIDGE WM. Mediated efflux of IgG molecules from brain to blood across the blood-brain barrier. *J. Neuroimmunol.*, 2001, 114, 168-172.

ANNEXES

Annexe 1

Article n°7

The homozygous FcγRIIIa-158V genotype is a risk factor for heparin-induced thrombocytopenia in patients with antibodies to heparin/platelet factor 4 complexes.

Yves Gruel, Claire Pouplard, Dominique Lasne, Charlotte Magdelaine-Beuzelin, Chloé Charroing, Hervé Watier. *Blood*. 2004;104:2791-2793.

blood

2004 104: 2791-2793
Prepublished online Jun 10, 2004;
doi:10.1182/blood-2004-01-0058

The homozygous Fc{gamma}RIIIa-158V genotype is a risk factor for heparin-induced thrombocytopenia in patients with antibodies to heparin-platelet factor 4 complexes

Yves Gruel, Claire Pouplard, Dominique Lasne, Charlotte Magdelaine-Beuzelin, Chloé Charroing and Hervé Watier

Updated information and services can be found at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/full/104/9/2791>

Articles on similar topics may be found in the following *Blood* collections:

[Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Biology](#) (2500 articles)

[Brief Reports](#) (1126 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/subscriptions/index.dtl>



Brief report

The homozygous FcγRIIIa-158V genotype is a risk factor for heparin-induced thrombocytopenia in patients with antibodies to heparin–platelet factor 4 complexes

Yves Gruel, Claire Pouplard, Dominique Lasne, Charlotte Magdelaine-Beuzelin, Chloé Charroing, and Hervé Watier

We hypothesized that Fcγ receptor IIIa (FcγRIIIa), a polymorphic receptor for the Fc portion of immunoglobulin G (IgG) other than FcγRIIa, was involved in heparin-induced thrombocytopenia (HIT). FcγRIIIa-131 and FcγRIIIa-158 genotypes were determined in 102 patients with definite HIT and in 2 control groups of patients treated by heparin (86 subjects without detectable antibodies [Abs] to

heparin–platelet factor 4 [H/PPF4], Ab[−] group; 84 patients with Abs to H/PPF4 without HIT, Ab⁺ group). There were no significant differences in genotype distribution or allele frequencies between the 3 groups for FcγRIIIa-131H/R polymorphism. In contrast, FcγRIIIa-158V homozygotes were more frequent in the HIT group than in the Ab⁺ group ($P = .02$), a difference that was more pronounced in

patients with high levels of anti-H/PPF4 Abs ($P = .01$). Since anti-H/PPF4 Abs are mainly IgG1 and IgG3, clearance of sensitized platelets may be increased in patients homozygous for the FcγRIIIa-158V allotype, thus contributing to the development of thrombocytopenia. (Blood. 2004;104:2791-2793)

© 2004 by The American Society of Hematology

Introduction

Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) is a frequent complication of heparin therapy, due to the development in most patients of immunoglobulin G (IgG) antibodies (Abs) to heparin–platelet factor 4 (H/PPF4) complexes.¹ HIT is characterized by an unexpected fall in platelet count occurring 5 days or more after initiation of heparin and arterial or venous thrombosis in up to 50% of patients. Thrombocytopenia is associated with platelet activation mediated by Fcγ receptor RIIa (FcγRIIa), the only IgG Fc receptor present on platelets, which is cross-linked to H/PPF4-IgG immune complexes.² In addition, Fc-mediated clearance of platelets involving FcγRIIIa-bearing phagocytic cells could also contribute to thrombocytopenia, since HIT IgG may also bind to platelets and accumulate on the cell surface via F(ab)' domains,³ thus contributing in part to increased platelet-associated IgG in most patients with HIT.⁴⁻⁶ FcγRIIIa, which is expressed on macrophages and natural killer cells, is encoded by *FCGR3A* and displays a functional G559T polymorphism, resulting in either a phenylalanine (F) or a valine (V) at amino acid position 158.^{7,8} Since IgG1 and IgG3, the main IgG subclasses of anti-H/PPF4 antibodies, bind more strongly to the FcγRIIIa-158V allotype,⁷ we hypothesized that the *FCGR3A* V allele might be associated with HIT. We therefore determined FcγRIIIa-131 and FcγRIIIa-158 genotypes in 102 patients with definite HIT and in 2 groups of heparin-treated patients without thrombocytopenia who had either developed Abs to H/PPF4 complexes or not.

Study design

Control groups and HIT patients

The Ab[−] control group consisted of 86 patients who had undergone heart surgery with cardiopulmonary bypass (CPB). All had received high doses of unfractionated heparin during surgery and tested negative for anti-H/PPF4 antibodies between the eighth and tenth postoperative days.

The Ab⁺ control group consisted of 84 patients who had also undergone CPB and had received heparin for at least 8 days. All had developed significant levels of Abs to H/PPF4 but without thrombocytopenia or significant fall in platelet count (ie, > 40% compared with the maximum postoperative value).

The patient group (HIT) consisted of 102 individuals with definite heparin-induced thrombocytopenia, including 47 who had undergone CPB. All had developed delayed-onset thrombocytopenia with thrombotic complications in 41 cases, and both positive H/PPF4 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Asserachrom HPIA; Diagnostica Stago, Asnières, France) and serotonin release assay (SRA) had demonstrated the presence of HIT Abs.⁹

Blood samples were collected after obtaining informed consent according to the principles of the Declaration of Helsinki. The study design was approved prior to commencement by the Clinical Investigation Center of Tours (INSERM CIC 202).

FCGR2A and FCGR3A genotyping

FcγRIIIa-131H/R polymorphism was analyzed by an allele-specific restriction enzyme digestion method.¹⁰ *FCGR3A* genotype was determined by a

From the Department of Hematology-Hemostasis, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Tours, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U618, Tours, France; the Unité Propre de Recherche de l'Enseignement Supérieur—Equipe d'Accueil (UPRES-EA) "Immuno-Pharmacogenetics of therapeutic Antibodies", University of Tours, Tours, France; and the Laboratory of Hematology, Hôpital Necker and INSERM U428, Faculté de Pharmacie, Paris, France.

Submitted January 8, 2004; accepted April 13, 2004. Prepublished online as Blood First Edition Paper, June 10, 2004; DOI 10.1182/blood-2004-01-0058.

Supported by the Institut pour la Recherche sur la Thrombose et l'Hémostase and the Fondation Langlois.

Reprints: Yves Gruel, Department of Hematology-Hemostasis, CHU Trousseau, 37044 Tours Cedex, France; e-mail: gruel@med.univ-tours.fr.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2004 by The American Society of Hematology

single-step multiplex allele-specific real-time polymerase chain reaction (PCR) assay.¹¹

Statistical analysis

The Fischer exact test was used to compare frequencies of FcγRIIa and FcγRIIIa genotypes between HIT and control groups. The Mann-Whitney *U* test was used to evaluate differences in platelet counts between groups of patients. Statistical significance was set at *P* less than .05.

Results and discussion

FcγRIIa is the only human FcγR recognized to date as having an important role in the pathogenesis of HIT.¹² The frequencies of *FCGR2A*-131H and *FCGR2A*-131R alleles in the Ab⁻ group, and in patients without HIT but for whom significant levels of anti-H/PF4 Abs were detected (Ab⁺ group; Table 1), were similar to those of healthy white individuals.¹³ Frequencies of the *FCGR2A*-131H and *FCGR2A*-131R alleles in the HIT group were 0.535 and 0.465, respectively, and there were more homozygous HH patients, suggesting an overrepresentation of the *FCGR2A*-131H allele (Figure 1A). However, these frequencies were not statistically different from those in the Ab⁺ group (*P* = .16 and .39, respectively). These results are in agreement with a recent meta-analysis that found no variation in the distribution of FcγRIIa-131 genotypes in patients with HIT, with or without thrombosis, and control populations.¹⁴

FcγRIIIa (CD16) is another polymorphic cell receptor for IgG that is also involved in antibody-mediated cytopenias.^{15,16} *FCGR3A*-158V/F genotypes and allele distributions did not statistically differ between patients with antibodies to H/PF4 (HIT and Ab⁺ groups) and those of the Ab⁻ group (Table 1). In addition, no difference was found between patients who developed high titers of antibodies to H/PF4 ($A_{492} > 1.5$) and those with A_{492} values between 0.5 and 1.5. The FcγRIIIa-158V/F polymorphism is therefore unlikely to have a role in the immune response leading to the synthesis of heparin-dependent antibodies. In contrast, when comparing HIT and Ab⁺ groups, both composed of patients with significant levels of anti-H/PF4 Abs, the frequency of FcγRIIIa-158VV homozygotes was significantly higher in patients with HIT (21.5% vs 9.5%; *P* = .02). In addition, among the subjects with high titers of antibodies to H/PF4 ($A_{492} > 1.5$), the homozygous FcγRIIIa-158VV genotype was considerably more frequent in patients with HIT compared with those in the Ab⁺ group (19/88 vs 1/34;

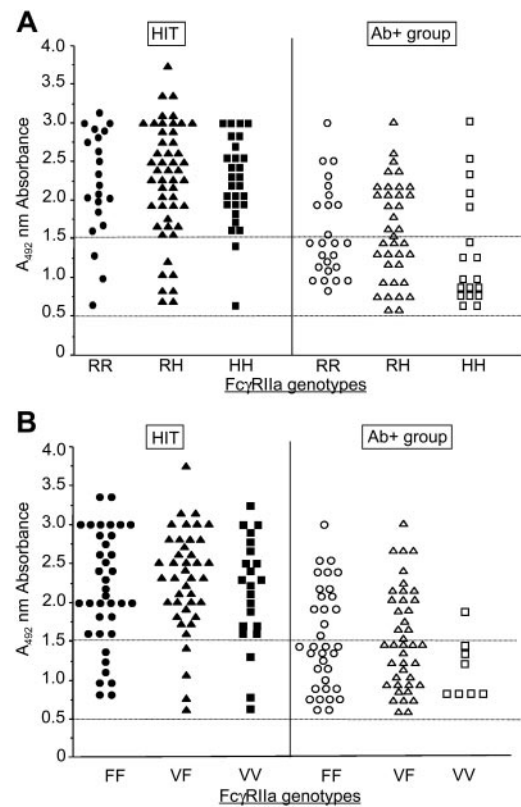


Figure 1. Genotype frequencies. FcγRIIa (A) and FcγRIIIa (B) genotypes in HIT patients and Ab⁺ group according to levels of anti-H/PF4 antibodies measured by ELISA. The 0.5 line indicates the cut-off value for H/PF4 ELISA. The 1.5 line indicates the threshold above which patients developed high levels of anti-H/PF4 antibodies.

P = .01; Figure 1B). In certain clinical conditions, such as after heart surgery, a high percentage of patients develop heparin-dependent Abs to H/PF4.¹⁷ However, only a few of them will present HIT. Forty-seven patients with HIT had undergone CPB, and the homozygous FcγRIIIa-158V genotype was present in 10 of the 46 tested (21.7%; Table 1). This clearly suggests a shift of VV homozygotes from the Ab⁺ group to the HIT group and probably explains the lower frequency of *FCGR3A*-158V allele in the Ab⁺ group. HIT is associated with a shortened platelet life span.¹⁸ Clearance of anti-H/PF4 Ab-sensitized platelets by FcγRIIIa-bearing cells and thrombocytopenia might therefore be enhanced in

Table 1. FcγRIIa-131 and FcγRIIIa-158 genotypes and allele frequencies in control subjects, all HIT patients, and those who had undergone cardiopulmonary bypass (CPB)

	Ab ⁻ group	Ab ⁺ group	All HIT patients	HIT patients after CPB
FcγRIIa genotypes, no./total (%)				
HH	20/86 (23.3)	18/80 (22.5)	28/99 (28.3)	14/47 (29.8)
HR	40/86 (46.5)	37/80 (46.3)	50/99 (50.5)	23/47 (48.9)
RR	26/86 (30.2)	25/80 (31.2)	21/99 (21.2)	10/47 (21.3)
FcγRIIa alleles, frequency				
H ¹³¹	0.465	0.457	0.535	0.543
R ¹³¹	0.535	0.543	0.465	0.457
FcγRIIIa genotypes, no./total (%)				
VV	14/86 (16.3)	8/84 (9.5)	22/102 (21.5)	10/46 (21.7)
VF	42/86 (48.8)	41/84 (48.8)	41/102 (40.2)	21/46 (45.7)
FF	30/86 (34.9)	35/84 (41.7)	39/102 (38.3)	15/46 (32.6)
FcγRIIIa alleles, frequency				
V ¹⁵⁸	0.407	0.339	0.416	0.446
F ¹⁵⁸	0.593	0.661	0.584	0.554

immunized patients expressing high-affinity FcγRIIIa-158V receptors, particularly in those with high levels of HIT antibodies.

Platelet count was also compared with antibody levels and FcγRIIIa-158V/F polymorphism and appeared lower when levels of antibodies were high ($A_{492} > 1.5$) in VF patients of the Ab⁺ group (mean = $240 \times 10^9/L$; $n = 18$) compared with FF subjects ($312 \times 10^9/L$; $n = 15$), but the difference was not significant ($P = .07$). High IgG1 and IgG3 binding phenotypes in healthy donors were associated with at least one V allele,⁸ but we did not find any overrepresentation of VF heterozygotes in patients with HIT. Similar results were found in autoimmune thrombocytopenia¹⁹ and in patients with lymphoma, for whom a good response to rituximab was only associated with the homozygous VV genotype.^{20,21}

In this study, FcγRIIIa-158V homozygotes also appeared more frequent in patients with HIT and isolated thrombocytopenia (24.6%) than in patients with HIT and associated thrombosis (17%), but this difference is not significant ($P = .36$). If confirmed in larger populations of patients, this trend could support the fact that FcγRIIIa receptors are more highly involved in the pathogenesis of isolated thrombocytopenia. Alternatively, the role of platelet activation and consumption could be greater in cases of thrombotic complications, but this hypothesis warrants further study.

In conclusion, our findings strongly support the hypothesis that homozygous FcγRIIIa-158VV patients are at risk of HIT, particularly when high levels of antibodies against H/PF4 complexes are present. They also indicate that Fc receptor-mediated reticuloendothelial clearance of platelets is a putative mechanism of thrombocytopenia in HIT, and this could in part explain the efficacy of high doses of intravenous immunoglobulins reported in some patients.^{22,23}

The role of FcγRIIIa in the clearance of sensitized blood cells has previously been demonstrated in monkeys¹⁵ by the use of a blocking anti-FcγRIIIa antibody, which reduces the clearance of sensitized erythrocytes and improves platelet counts in patients with immune thrombocytopenia.²⁴ Further experiments are thus necessary to determine the respective roles of FcγRIIIa and FcγRIIIa in the development of HIT in humans.

Acknowledgement

We thank Doreen Raine for editing the English language.

References

- Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: pathogenesis and management. *Br J Haematol*. 2003;121:535-555.
- Chong B, Fawas I, Chesterman C, Berndt M. Heparin-induced thrombocytopenia: mechanism of interaction of the heparin-dependent antibody with platelets. *Br J Haematol*. 1989;73:235-240.
- Horne MK, Alkins BR. Platelet binding of IgG from patients with heparin-induced thrombocytopenia. *J Lab Clin Med*. 1996;127:435-442.
- Cines D, Kaywin P, Bina M, Tomaski A, Schreiber A. Heparin-associated thrombocytopenia. *N Engl J Med*. 1980;303:788-795.
- Kelton J, Sheridan D, Brain H, Powers P, Turpie A, Carter C. Clinical usefulness of testing for a heparin-dependent platelet aggregating factor in patients with suspected heparin-associated thrombocytopenia. *J Lab Clin Med*. 1984;103:606-612.
- Leroy J, Leclerc M, Delahousse B, et al. Treatment of heparin-associated thrombocytopenia and thrombosis with low molecular weight heparin (CY 216). *Semin Thromb Hemost*. 1985;11:326-329.
- Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood*. 1997;90:1109-1114.
- Wu JM, Edberg JC, Redecha PB, et al. A novel polymorphism of Fc gammaRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest*. 1997;100:1059-1070.
- Pouplard C, Amiral J, Borg JY, LaporteSimitsidis S, Delahousse B, Gruel Y. Decision analysis for use of platelet aggregation test, carbon 14 serotonin release assay, and heparin-platelet factor 4 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol*. 1999;111:700-706.
- Jiang X, Arepally G, Poncz M, McKenzie S. Rapid detection of the FcγRIIIa-H/R131 ligand-binding polymorphism using an allele-specific restriction enzyme digestion (ASRED). *J Immunol Methods*. 1996;199:55-59.
- Dall'Ozzo S, Andres C, Bardos P, Watier H, Thibault G. Rapid single-step FCGR3A genotyping based on SYBR Green I fluorescence in real-time multiplex allele-specific PCR. *J Immunol Methods*. 2003;277:185-192.
- Reilly MP, Taylor SM, Hartman NK, et al. Heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis in a transgenic mouse model requires human platelet factor 4 and platelet activation through FcγRIIIa. *Blood*. 2001;98:2442-2447.
- van der Pol WL, Jansen MD, Sluiter WJ, et al. Evidence for non-random distribution of FcγRIIIa receptor genotype combinations. *Immunogenetics*. 2003;55:240-246.
- Trikalinos TA, Karassa FB, Ioannidis JP. Meta-analysis of the association between low-affinity FcγRIIIa receptor gene polymorphisms and hematologic and autoimmune disease. *Blood*. 2001;98:1634-1635.
- Clarkson SB, Kimberly RP, Valinsky JE, et al. Blockade of clearance of immune complexes by an anti-Fc gamma receptor monoclonal antibody. *J Exp Med*. 1986;164:474-489.
- Meyer D, Schiller C, Westermann J, et al. FcγRIII (CD16)-deficient mice show IgG isotype-dependent protection to experimental autoimmune hemolytic anemia. *Blood*. 1998;92:3997-4002.
- Pouplard C, May MA, Iochmann S, et al. Antibodies to platelet factor 4-heparin after cardiopulmonary bypass in patients anticoagulated with unfractionated heparin or a low-molecular-weight heparin: clinical implications for heparin-induced thrombocytopenia. *Circulation*. 1999;99:2530-2536.
- Wahl TO, Lipschitz DA, Stechschulte DJ. Thrombocytopenia associated with antiheparin antibody. *JAMA*. 1978;240:2560-2562.
- Carcao MD, Blanchette VS, Wakefield CD, et al. FcγRIIIa receptor IIa and IIIa polymorphisms in childhood immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 2003;120:135-141.
- Cartron G, Dacheux L, Salles G, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*. 2002;99:754-758.
- Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2003;21:3940-3947.
- Frame J, Mulvey K, Phares J, Anderson M. Correction of severe heparin-associated thrombocytopenia with intravenous immunoglobulin. *Ann Intern Med*. 1989;111:946-947.
- Grau E, Linares M, Olaso M, Ruvira J, Sanchis J. Heparin-induced thrombocytopenia: response to intravenous immunoglobulin in vivo and in vitro. *Am J Hematol*. 1992;39:312-313.
- Clarkson SB, Bussel JB, Kimberly RP, Valinsky JE, Nachman RL, Unkeless JC. Treatment of refractory immune thrombocytopenic purpura with an anti-Fc gamma-receptor antibody. *N Engl J Med*. 1986;314:1236-1239.

Annexe 2

Article n°8

Withdrawal of immunosuppression in Crohn's disease treated with scheduled infliximab maintenance: a randomized trial.

Gert Van Assche, Charlotte Magdelaine-Beuzelin, Geert D'Haens, Filip Baert, Maja Noman, Séverine Vermeire, David Ternant, Hervé Watier, Gilles Paintaud, Paul Rutgeerts. *Gastroenterology.*, 2008, 134, 1861-1868.

CLINICAL-ALIMENTARY TRACT

Withdrawal of Immunosuppression in Crohn's Disease Treated With Scheduled Infliximab Maintenance: A Randomized Trial

GERT VAN ASSCHE,* CHARLOTTE MAGDELAINE-BEUZELIN,[†] GEERT D'HAENS,*[§] FILIP BAERT,^{||} MAJA NOMAN,* SÉVERINE VERMEIRE,* DAVID TERNANT,[‡] HERVÉ WATIER,[‡] GILLES PAINAUD,[‡] and PAUL RUTGEERTS*

*Division of Gastroenterology, University of Leuven Hospitals, Leuven, Belgium; [†]Université François Rabelais Tours, Immunopharmacogenetics of Therapeutic Antibodies, Tours, France; [‡]Imelda Clinical trials Center, Imelda Hospital, Bonheiden, Belgium; and ^{||}Heilig Hart Ziekenhuis Roeselare, Roeselare, Belgium

See Peyrin-Biroulet P et al on page 644 and Gardiner SJ on page 654 in *CGH*; See editorial on page 2161.

Background & Aims: The benefit to risk ratio of concomitant immunosuppressives with scheduled infliximab (IFX) maintenance therapy for Crohn's disease is an issue of debate. We aimed to study the influence of immunosuppressives discontinuation in patients in remission with combination therapy in an open-label, randomized, controlled trial.

Methods: Patients with controlled disease ≥ 6 months after the start of IFX (5 mg/kg intravenously) combined with immunosuppressives were randomized to continue (Con) or to interrupt (Dis) immunosuppressives, while all patients received scheduled IFX maintenance therapy for 104 weeks. Primary end point was the proportion of patients who required a decrease in IFX dosing interval or stopped IFX therapy. Secondary end points included IFX trough levels, safety, and mucosal healing. **Results:** A similar proportion (24/40, 60% Con) and (22/40, 55% Dis) of patients needed a change in IFX dosing interval or stopped IFX therapy (11/40 Con, 9/40 Dis). C-reactive protein (CRP) was higher and IFX trough levels were lower in the Dis group (Dis: CRP, 2.8 mg/L; interquartile range [IQR], 1.0–8.0; Con: CRP, 1.6 mg/L; IQR, 1.0–5.6, $P < .005$; trough IFX: Dis: 1.65 $\mu\text{g/mL}$; IQR, 0.54–3.68; Con: 2.87 $\mu\text{g/mL}$; IQR, 1.35–4.72, $P < .0001$). Low IFX trough levels correlated with increased CRP and clinical score. Mucosal ulcers were absent at week 104 in 64% (Con) and 61% (Dis) of evaluated patients with ongoing response to IFX. **Conclusions:** Continuation of immunosuppressives beyond 6 months offers no clear benefit over scheduled IFX monotherapy but is associated with higher median IFX trough and decreased CRP levels. The impact of these observations on long-term outcomes needs to be explored further.

The chimeric monoclonal antitumor necrosis factor (TNF) antibody, infliximab (IFX), has proven to be an efficacious therapy for refractory luminal and fistulizing Crohn's disease (CD) and more recently for refractory ulcerative colitis.^{1–5} In CD, initial retrospective cohort studies have suggested that efficacy of IFX short-term is superior in patients treated with concomitant immunosuppression.^{6–10} Concomitant immunosuppression is considered to protect mainly against immunogenicity induced by IFX. When used in an episodic, on-flare, regimen, IFX is likely to induce antibodies to infliximab (ATI) leading to infusion reactions and to shorter duration of response.^{9–13} Nevertheless, in clinical practice, episodic retreatment with variable intervals and systematic maintenance strategies are currently in use. Systematic 8-weekly maintenance therapy with IFX 5 mg/kg intravenously (IV) is associated with decreased formation of ATI and appears to be the optimal strategy to minimize the immunogenicity of IFX. This observation suggests that continuous exposure tolerizes the human body to a chimeric (human-mouse) antibody such as IFX. In patients treated with IFX on a scheduled maintenance basis, concomitant immunosuppressive therapy is not clearly associated with increased efficacy. Furthermore, a significant impact of concomitant immunosuppressives on the incidence of ATI formation was not observed, although none of the studies was powered to test for differences in immunogenicity.^{11,12} In addition, preliminary data indicate that the combination of immunosuppressive therapies in patients with inflammatory bowel disease (IBD) increases the likelihood of adverse events including serious infections and

Abbreviations used in this paper: ATI, antibodies to infliximab; CD, Crohn's disease; CDAI, Crohn's Disease Activity Index; CRP, C-reactive protein; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IBD, inflammatory bowel disease; IBDQ, Inflammatory Bowel Diseases Questionnaire; IFX, infliximab; IQR, interquartile range; IV, intravenously; SC, subcutaneous; SES-CD, simple endoscopic score–Crohn's disease; TNF, tumor necrosis factor.

cancer.¹⁴ Alternatively, in patients with rheumatoid arthritis, methotrexate and anti-TNF antibody cotherapy compared with anti-TNF monotherapy is not associated with an increased lymphoma risk.¹⁵ Recently, 11 cases of hepatosplenic T-cell lymphoma reported in young patients with IBD treated with IFX and azathioprine in combination therapy have heightened concerns about the safety of combined immunosuppressive treatment.¹⁶

The principal aim of the present study was to evaluate whether continuing standard immunosuppressives in patients who had been responding to a combination of IFX and immunosuppressives for at least 6 months adds to the long-term efficacy of scheduled maintenance as compared with IFX monotherapy. The study was designed as a multicenter, prospective, randomized, open-label, superiority trial.

Patients and Methods

Study Design

All patients ages 16 years or older and having received IFX in an episodic or systematic maintenance schedule were eligible if they had been treated with a combination of IFX 5 mg/kg IV dosed with intervals of 8 weeks or longer and an appropriate dose of immunosuppressives (azathioprine/6-mercaptopurine or methotrexate) for at least 6 months and provided they met all other inclusion criteria and none of the exclusion criteria. Appropriate dose of immunosuppressives was defined for azathioprine as a maintenance dose of 2–2.5 mg/kg/day or the maximally tolerated dose, for 6-mercaptopurine as a maintenance dose of 1.5 mg/kg/day or the maximally tolerated dose, and for methotrexate as a maintenance dose of 15 mg per week or the maximally tolerated dose. Compliance with azathioprine and 6-mercaptopurine therapy was assessed by questioning patients at each visit on the number of tablets taken daily and by following mean corpuscular volume. For subcutaneous (SC) methotrexate, all prescriptions were filled at the hospital pharmacy. Additional inclusion criteria were documented full clinical response to IFX and disease control at entry into the trial and IFX therapy initiated for signs and symptoms of luminal CD. Disease control was defined as the absence of intestinal or extraintestinal symptom as judged by both patient and physician. Exclusion criteria were previous infusion reactions related to IFX and not controlled with prophylactic treatment, pregnancy and lactation, intercurrent medical conditions precluding further IFX or immunosuppressive therapy, imminent need for CD-related surgery, abdominal enterocutaneous fistula or actively draining perianal fistula, and infectious causes of diarrhea. After confirmation of eligibility, patients were randomized 1:1 to receive either IFX (5 mg/kg IV) scheduled 8 weekly retreatment from week 0 until week 104 with continuation of immunosuppressives at the same dose (Con) or IFX 5 mg/kg IV 8 weekly with discontinuation

at baseline of concomitant immunosuppressives (Dis). Systemic steroids or oral budesonide and rectal steroids or mesalamine were not allowed. Oral aminosalicylates were kept stable during the trial. The protocol was approved by the University of Leuven Ethics Committee for Clinical Trials, and written informed consent was obtained from all patients.

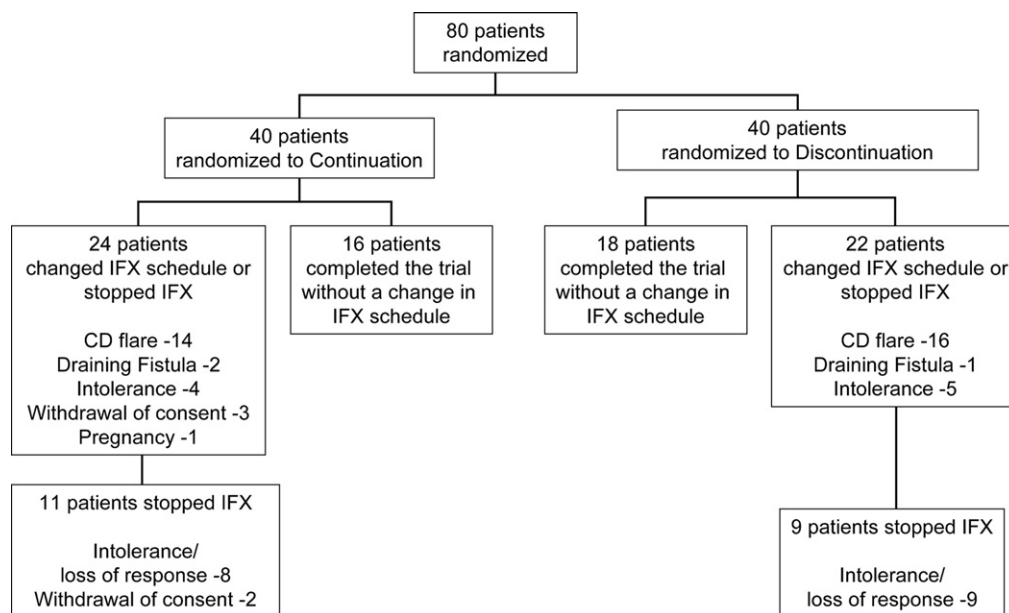
Study Evaluations and End Points

Patients received 8-weekly treatments with IFX (5 mg/kg). Blood samples were collected before every infusion with recordings of Crohn's Disease Activity Index (CDAI)¹⁷ and Inflammatory Bowel Diseases Questionnaire (IBDQ),¹⁸ and physical examination were performed. In addition, occurrence of a disease flare, serious adverse events, infusion reactions and delayed hypersensitivity reactions, intercurrent surgery, or procedures and/or rescue treatment was recorded every 8 weeks. Every 16 weeks, all adverse events were noted in addition. Serum samples were obtained prior to each infusion for measurement of IFX "trough" levels and ATIs. Infliximab serum concentrations were measured as previously published with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using TNF preincubated microplates and an anti-human IgG indicator antibody.¹⁹ Serum concentrations of ATI were analyzed using a double-antigen ELISA based on their capture by IFX-coated microplates and their detection by peroxidase-coupled IFX. Because of the interference of circulating infliximab, results were conclusive if IFX concentration was $<1.7 \mu\text{g/mL}$. In case of a CD flare, prior to the next scheduled infusion, the dosing interval was shortened by 2 weeks. Increasing the IFX dose to 10 mg/kg was not allowed. An increase of the CDAI to at least 70 points above the baseline value was defined as a luminal disease flare. Endoscopic severity was assessed with the simple endoscopic score–Crohn's disease (SES-CD) score (range, 0–56), which incorporates size of ulcers and ulcerated area, affected area, and stenosis.²⁰ Also, factors at baseline (sex, time to start of IFX, previous on-demand IFX treatment schedule, disease location, type of immunosuppressive, and smoking status) were evaluated for prediction of failure. Infusion reactions were managed adhering to local standing orders and at the discretion of the treating physician. Prophylactic treatment for patients with documented infusion-related reactions was tailored to the severity of the reactions. IV corticosteroids (maximum, 250 mg hydrocortisone or equivalent) and oral or parenteral antihistaminics were allowed. This prophylaxis was kept stable while the patient was on the trial.

Data Analysis

Baseline patient characteristics were explored with descriptive statistics. The primary end point of this trial was the proportion of patients needing early rescue IFX because of a disease flare or interrupting further IFX

Figure 1. Patient disposition throughout the trial. Patients achieving the primary end point of needing a change in IFX dosing schedule, including stopping IFX dosing, are represented first. Patients who stopped further infliximab dosing are also listed separately.



dosing because of loss of response, intolerance, or intercurrent adverse event. Secondary end points included the proportion of patients interrupting further IFX dosing, endoscopic mucosal healing at week 104, safety and tolerability of IFX in each arm, serum IFX trough levels, and immunogenicity (defined as presence of ATIs). Randomization on a 1:1 basis without stratification was centralized at the University of Leuven hospitals. Data were analyzed on an intention-to-treat basis using SPSS 15.0 software (SPSS, Inc, Chicago, IL). Two-tailed Fisher exact tests were used to test for difference between proportions and Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests for non-parametric observations. Univariate analysis was used to test for predictive values with Bonferroni correction for multiple comparisons. Kaplan-Meier analysis with log-rank statistics was performed to test for differences in time to failure and time to interruption of IFX. Patients who achieved the primary end point (needing an interval change or stopping IFX therapy) were censored at that

time, and CRP, CDAI, and IFX trough levels were not collected afterwards, although these patients were still followed for safety and loss of response. In the intention-to-treat analysis, the last observation carried forward was used for CRP, CDAI, and IFX trough levels. The study was designed as a superiority trial to detect a clinically relevant difference of 35% between the 2 groups with a power of 80% assuming that 25% of patients in the immunosuppressives continuation group would achieve the primary end point over the study period of 104 weeks. The power to detect a 10% difference was 10%. Statistical significance was accepted at the 5% level.

Results

Patient Demographics

Forty patients were included and randomized in each arm between February 2004 and May 2005 (Figure 1). As shown in Table 1, there were no differences be-

Table 1. Patient Demographics

	Continuation group	Discontinuation group	P value
Number	40	40	
Age, y	35.6 ± 9.5	35.4 ± 10.8	.76
Sex	42.5% Male	47.5% Male	.45
Duration of disease, median (range), y	9 (1–36)	9 (2–25)	.86
Baseline CDAI	137.6 ± 90.1	138.1 ± 98.7	.98
Baseline CRP, median (IQR), mg/L	3.4 (1.0–10.6)	3.2 (1.0–7.1)	.54
Location (% colonic only)	32.5%	12.5%	.16
Active smokers	45.0%	47.5%	.82
Previous on-demand/scheduled every 9–12 weeks/scheduled every 8 weeks treatment	33%/15%/52%	38%/12%/50%	.80
Time since start IFX, median (range), mo	34.5 (6–112)	24.5 (6–90)	.73
Time since start immunosuppressives, median (range), mo	37 (6–112)	25 (6–98)	
Weight, kg	69.8 ± 13.7	71.2 ± 19.7	.76

NOTE. All parameters not significantly different.

Table 2. Adverse Events and Serious Adverse Events

	Continuation group	Discontinuation group
Serious AEs	3/40 (7.5%)	3/40 (7.5%)
	1 Pregnancy	1 Appendectomy
	1 Pneumonia	1 Skin carcinoma
	1 Partial colectomy	1 Ureterolithiasis
AEs		
Patients with ≥ 1 AE	60%	62.5%
Total number of AEs	60	42
Infections	12	10
Liver test elevations	2	0
Arthralgias/arthritis	9	8
Infusion reactions	3	2

NOTE. In the safety follow-up of this trial, we recorded 1 renal cell carcinoma (Con group) and 1 sudden cardiac death (Dis group). Both patients had discontinued IFX for more than 8 weeks. AE, adverse event.

tween the groups for age, sex, smoking status, weight, duration of disease, baseline CDAI and CRP, disease location, duration of IFX or immunosuppressives therapy, type of immunosuppressive, and previous IFX maintenance strategy (Table 1). None of the patients had received a loading scheme with IFX 5 mg/kg at 0, 2, and 6 weeks because this strategy is not used in patients with CD at our centers. Patients with on-demand therapy, systematic 9- to 12-week, and systematic 8-week maintenance, were evenly distributed.

Clinical Outcomes

Twenty-four out of 40 (60%, 95% CI: 45%–74%) patients in the continuation and 22 of 40 (55%, 95% CI: 40%–69%; difference between groups, 5%; 95% CI: 0.50%–17%) in the discontinuation group needed a change in the IFX dosing schedule or stopped IFX dosing ($P = .65$), which was the primary end point. The main reason for

shortening the dosing interval was CD flare (Con: 14/24 patients; Dis: 16/22 patients; Figure 1). Infliximab dosing was definitively stopped in 11 (27%, 95% CI: 16%–43%) patients (Con) and 9 (22%, 95% CI: 12%–38%) patients (Dis) (between group difference, 5%; 95% CI: 0.50%–17%), respectively, and predominantly for loss of response and/or intolerance (Con: 8/11 patients, Dis: 9/9 patients; Table 2). Kaplan–Meier analysis indicated that the time to shortening of the interval between IFX infusions or time to stopping IFX dosing was not different between the 2 groups (log rank: $P = .74$ [interval change] and $P = .35$ [stop IFX]; Figure 2). Median CDAI and IBDQ were not different between the 2 groups from week 8 through week 104 (CDAI median and interquartile ranges [IQR]: Con: 92 [34–164], Dis: 104 [55–165]; IBDQ median [IQR]: Con: 174 [157–196], Dis: 176 [158–194]). Adverse events were evenly distributed. In total, 60% of patients in the continuation and 62% in the discontinuation group reported side effects, and serious adverse events were noted in 3 patients in both groups (Table 2). The mortality rate in the trial was 0%, and the malignancy rate was 1.2% (1/80, basocellular skin Ca, discontinuation group). Two additional serious adverse events, a renal cell carcinoma (Con) and a sudden cardiac death (Dis), were observed within the study period of 104 weeks, both in patients who had discontinued IFX for more than 8 weeks prior to the event because of loss of response. Predefined potential predictors of failure were tested in univariate analysis. Sex, time to start of IFX, previous on-demand IFX treatment schedule, disease location, type of immunosuppressive, previous allergic reaction, and smoking status were not associated with poor outcome (Table 3), and a multivariate analysis was not performed. In addition, when patients were stratified based on prior IFX dosing strategy in a post hoc analysis, we observed no difference in clinical outcomes, CRP, IFX

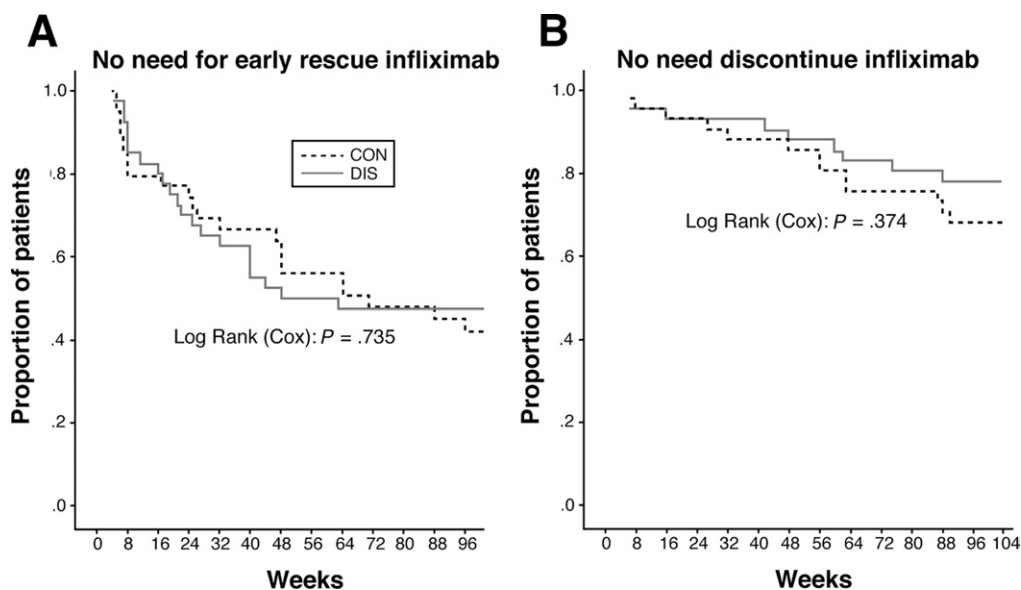


Figure 2. Life table analysis (Kaplan–Meier) of the patient outcomes. (A) Analysis in both groups of the need for early-rescue IFX or stopping IFX therapy (primary end point). (B) Analysis in both groups of the need to stop further IFX therapy. P values are listed for the log-rank test only.

Table 3. Factors Evaluated as Potential Predictors of the Need of a Change in IFX Dosing Interval and the Need to Discontinue IFX Therapy

	Need for early rescue IFX (n = 46)		Need to discontinue IFX (n = 20)	
	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value
Sex, male (36/80)	0.58 (0.24–1.41)	.26	2.38 (0.72–7.88)	.35
Immunosuppressive MTX (26/80)	0.52 (0.20–1.35)	.23	1.69 (0.57–5.50)	.39
Previous reaction (14/80)	0.28 (0.08–1.01)	.17	0.78 (0.69–0.89)	.06
Previous on-demand treatment (28/80)	0.96 (0.38–2.46)	.93	0.41 (0.13–1.40)	.14
Ileal or ileocolonic disease (62/80)	0.74 (0.28–1.95)	.37	1.11 (0.31–3.97)	.87
Nonsmoker (43/80)	2.13 (0.87–5.25)	.12	1.71 (0.58–5.78)	.35

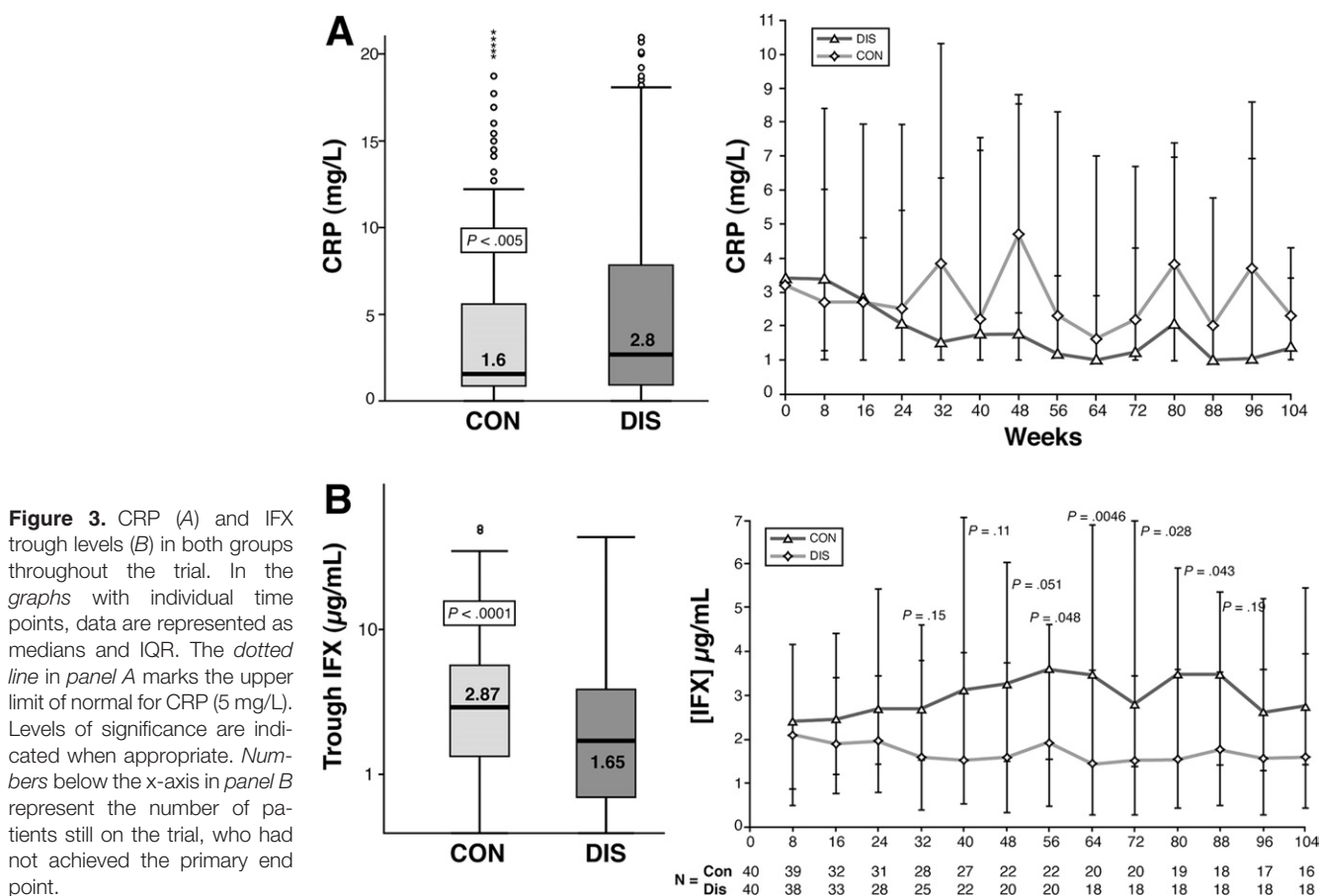
NOTE. *P* = corrected *P* value for multiple comparison (Bonferroni).

trough levels, or CDAI for patients with prior on-demand (>12 weeks interval), scheduled every 9–12 weeks, or scheduled every 8 weeks interval treatment.

Biologic End Points

Median CRP level at baseline was not different between the 2 groups (Table 1). Fourteen of 40 (Con) and 12 of 40 (Dis) patients had an elevated CRP (>5 mg/L) level at baseline. Eight of 16 patients (50%) who experienced a flare and needed early rescue IFX (primary end point) had an elevated CRP level in the Dis group as compared with 9 of 14 (64%, NS) in the Con group. Overall, the CRP levels from week 8 through week 104

were significantly higher in the Dis group (median, 2.8; IQR, 1.0–8.0) than in the Con group (median, 1.6; IQR, 1.0–5.6, *P* < .005). At most individual time points, median CRP values were numerically higher in the Dis group, but the differences did not reach significance (Figure 3). Baseline IFX serum trough levels were similar in both groups, although a high interpatient variability was observed (Figure 4). Last observation carried forward (IFX level at the primary end point) was used to compensate for missing trough levels in patients with a change in their dosing interval. The median trough levels from week 8 through week 54 were significantly higher in the Con group than in the Dis group (median [IQR]:



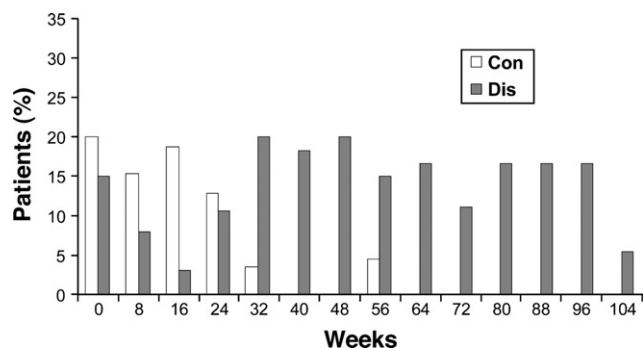


Figure 4. Proportion of patients with undetectable IFX trough serum levels in both arms and at different time points throughout the trial. Data are expressed as percentage of patients still on the trial (for patient numbers see Figure 3B).

Con: 2.87 [1.42–4.80] $\mu\text{g/mL}$, Dis: 1.65 [0.54–3.53] $\mu\text{g/mL}$, $P < .0001$. At individual time points, significantly lower levels were observed from week 40 through week 88. At later time points, more patients had undetectable IFX trough serum levels in the Dis group (Figure 4). ATIs were infrequently found (Con: 5.0% [2/40], Dis: 12.5% [5/40], $P = .43$). Also in patients with low IFX trough levels at repeated time points allowing for conclusive assessment ($<1.7 \mu\text{g/mL}$, 39/80), only 18% were ATI positive.

Overall CRP and CDAI values correlated with IFX trough levels (CRP: $r = 0.387$, CDAI: $r = 0.205$, $P < .01$). In an exploratory analysis, we categorized all CRP and CDAI values with a matching IFX serum level depending on the corresponding trough levels in 4 groups based on the quartiles of the trough levels (Q1, 0–25th percentile: 0–0.90 $\mu\text{g/mL}$; Q2, 25th–50th percentile: 0.91–2.23 $\mu\text{g/mL}$; Q3, 50th–75th percentile: 2.24–4.54 $\mu\text{g/mL}$; Q4, 75th–100th percentile: $\geq 4.55 \mu\text{g/mL}$.) Low trough levels were associated with higher median levels of CRP in Q1

and Q2 ($P < .0001$) and in Q1 for CDAI ($P < .05$) (Figure 5). Low or undetectable trough levels (Q1 and Q2, 0–2.23 $\mu\text{g/mL}$) at week 8 were also associated with a higher proportion of patients needing a change in IFX dosing interval (69.4% [Q1–Q2] vs 42.9% [Q3–Q4], $P < .01$; odds ratio (OR), 3.99 [95% CI: 1.53–10.11]).

Endoscopic End Point

Ileo-colonoscopy was performed in 49 of 60 patients with ongoing IFX therapy, including those with a change in dosing interval (10/60 patients declined colonoscopy, 1/60 had no colonic lesions before starting IFX). Endoscopic healing with absence of mucosal ulcers was observed in 16 of 25 (64%, Con) and 14 of 23 (61%, Dis) and aphthous ulcers ($<0.5 \text{ cm}$) or no ulcers in 80% and 87% of patients, respectively. Information on mucosal lesions before starting IFX was available in 31 of these 49 patients, and all 31 patients had ulcers at that time. Median SES-CD endoscopic severity scores in patients with ongoing IFX therapy were 1 (Con: range, 0–14) and 2.5 (Dis: range, 0–13, NS), respectively. CRP levels correlated with endoscopic severity scores ($r^2 = 0.202$, $P = .01$).

Discussion

The benefit of conventional immunosuppressives such as thiopurines and methotrexate in combination with scheduled IFX maintenance therapy is still debated. In this study, we aimed to investigate the additional benefit of immunosuppressives continuation in patients with luminal CD treated with scheduled IFX maintenance beyond the induction period. We found no advantage of continuing immunosuppressives for clinical outcomes including mucosal healing. However, the combined treatment approach resulted in sustained high IFX trough levels and lower CRP values. In addition, the

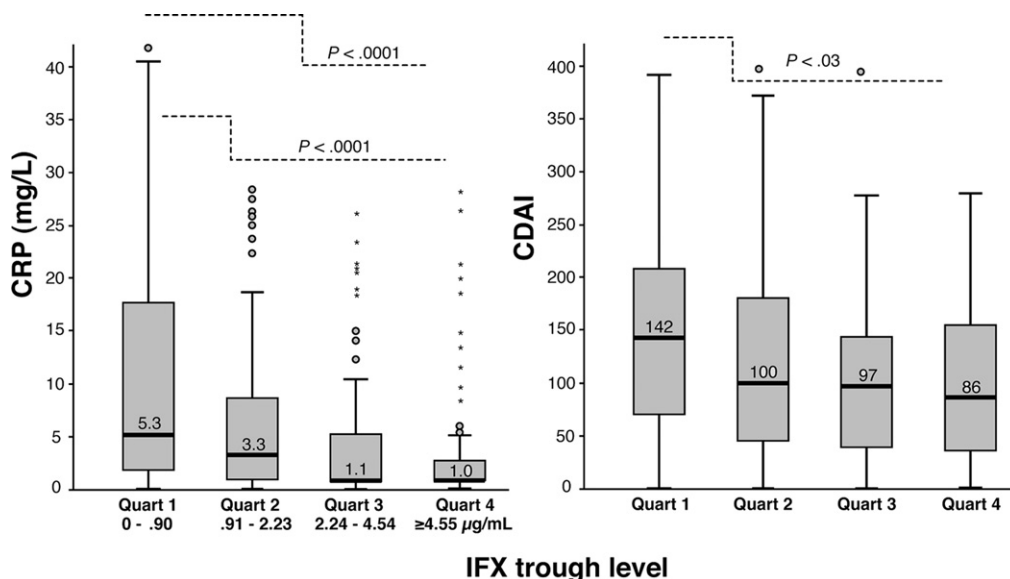


Figure 5. CRP levels and CDAI scores in all patients measured at all study time points expressed as a function of trough serum IFX levels ($\mu\text{g/mL}$). Trough levels below 0.3 $\mu\text{g/mL}$ and below 2 $\mu\text{g/mL}$ were associated with elevated median CRP levels. CDAI was not affected by trough IFX levels.

results clearly indicate that sustained clinical response to IFX is accompanied by mucosal healing after a time period of 2 years. Our results confirm the data from IFX induction trials²¹ and from ACCENT I²² in that we show durable mucosal healing at 2 years in patients with ongoing clinical response to infliximab maintenance therapy.

Several retrospective observations have indicated that concomitant immunosuppressives at onset of IFX therapy are associated with improved short-term benefit and result in better long-term clinical outcomes when episodic therapy is used by decreasing the immunogenicity of this chimeric monoclonal antibody.⁸⁻¹³ However, with systematic IFX maintenance therapy, a protective effect of immunosuppressives has not been clearly demonstrated, although no study has been prospectively powered to specifically address this question.^{11,12} In the current trial, all patients had been treated with IFX and immunosuppressives in combination for at least 6 months. When IFX is dosed with intervals of more than 8 weeks duration, there is theoretically an increased risk of immunogenicity and secondary loss of response, but we did not observe a difference in clinical or biologic end points for patients with prior IFX dosing intervals of >12 weeks, 9-12 weeks, or 8 weeks, respectively. Although, clearly, over a period of 2 years more than 50% of the patients needed an adjustment in their dosing schedule, less than 25% stopped IFX therapy because of intolerance and/or loss of response. This was an open-label trial, and we followed a "real life" approach. The decision to shorten the dosing interval was mainly based on disease symptoms (CDAI driven) and not on endoscopic criteria nor on an increase in CRP. The open-label nature may have introduced several biases specifically toward overreporting of disease flares in patients who discontinued immunosuppressives. Although all previous controlled trials with IFX have been exclusively guided by CDAI, our approach may partially explain why up to 50% of patients with a symptomatic CD flare had no increased CRP. In this respect, it is important to note that there was also no difference between the 2 groups in proportion of IFX therapy patients stopping because of loss of response.

This study is mainly limited by the fact that we assumed "superiority" of continued immunosuppressives, and it was not powered to detect subtle differences in clinical benefit between the 2 strategies. To ascertain the equivalence of both strategies, an adequately powered noninferiority trial with 250 or more patients in each arm would be required. Therefore, we may have missed a smaller increase in the proportion of patients losing the efficacy of IFX after discontinuation of immunosuppressives. However, at no time during the 104 weeks follow-up could a trend toward more or earlier relapse in the discontinuation group be inferred from the life table analyses. Also, no prospective trials, which could be used as a reference to estimate the risk difference, have been published.

Interestingly, in this study, stopping immunosuppressives after at least 6 months of combined therapy with IFX resulted in a gradual decrease of serum IFX trough levels over time. The influence of withdrawing immunosuppressives on the pharmacokinetics of infliximab had no major impact on the clinical response over a 2-year time period, but we found higher overall CRP levels in the group with discontinuation of immunosuppressives. In addition, undetectable or low IFX trough levels were associated with increased CRP and with a higher need for a change in dosing interval. We, therefore, confirm an earlier observation in a cohort of patients with CD treated with scheduled or episodic IFX maintenance of a clear association between trough serum IFX and CRP levels and also the association of a continuous decay in trough serum IFX below 2 $\mu\text{g/mL}$ with loss of endoscopic and clinical remission.¹² The increased CRP levels may reflect a state of "subclinical inflammation" because they also correlated with endoscopic severity. On the contrary, patients with normalization of CRP levels, endoscopic healing, and high sustained IFX trough levels are probably in definitive remission as far as the inflammatory reaction is concerned. Whether this "clinical and biological remission" impacts on the disease course beyond 2 years of follow-up needs to be explored further. It is unclear whether these differences in CRP and IFX trough levels herald an increased loss of response over time. If this were true, it may negatively impact on patient outcomes because a recent controlled trial with another anti-TNF antibody, adalimumab, indicated that patients with prior loss of response or intolerance to IFX are less likely to respond to a second anti-TNF antibody.

In contrast to earlier observations of an association between antibodies to infliximab (ATIs) and IFX trough levels with episodic infliximab retreatment therapy,^{9,13} we were unable to identify a clear influence of ATI formation on the pharmacokinetics of scheduled IFX retreatment. However, the interference of IFX serum levels with the ATI assay precludes firm conclusions about the degree of immunogenicity in both groups, particularly considering the observed differences in IFX trough levels. Alternatively, immunosuppressives could impact on the pharmacokinetics of IFX via other pathways than the prevention of ATIs. In CD, there are no prior prospective studies on the impact of concomitant immunosuppressive therapy on pharmacokinetics of scheduled infliximab retreatment. In patients with rheumatoid arthritis, a high interindividual variability in IFX trough levels had previously been shown in agreement with our results.²³ As a rescue strategy for early CD flares during maintenance IFX therapy, we shortened the interval between infusions rather than increasing the dose per infusion, a strategy that was confirmed to result in higher sustained IFX levels than increasing the dose.²⁴

In conclusion, in this prospective trial, continued combined IFX and immunosuppressive treatment beyond 6

months was not superior to withdrawal of immunosuppressives despite higher IFX concentrations and lower CRP levels with combination therapy. Scheduled IFX maintenance therapy combined with immunosuppressives and scheduled IFX monotherapy are 2 alternative strategies trading the risk of losing efficacy for a possible gain in long-term safety. Our observation of changes in IFX pharmacokinetics and in a biomarker of inflammation after discontinuation of immunosuppressives may precede loss of efficacy in a proportion of patients and should be explored in larger prospective trials.

References

1. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor α for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* 1997;337:1029–1035.
2. Present DH, Rutgeerts P, Targan S, et al. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* 1999;340:1398–1405.
3. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 2002;359:1541–1549.
4. Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, et al. Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004;350:876–885.
5. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005;353:2462–2476.
6. Parsi MA, Achkar JP, Richardson S, et al. Predictors of response to infliximab in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;123:707–713.
7. Arnott ID, McNeill G, Satsangi J. An analysis of factors influencing short-term and sustained response to infliximab treatment for Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:1451–1457.
8. Vermeire S, Louis E, Carbonez A, et al. Demographic and clinical parameters influencing the short-term outcome of anti-tumor necrosis factor (infliximab) treatment in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2357–2363.
9. Baert F, Noman M, Vermeire S, et al. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med* 2003;348:601–608.
10. Farrell RJ, Alsahli M, Jeen YT, et al. Intravenous hydrocortisone premedication reduces antibodies to infliximab in Crohn's disease: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2003;124:917–924.
11. Hanauer SB, Wagner CL, Bala M, et al. Incidence and importance of antibody responses to infliximab after maintenance or episodic treatment in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2:542–553.
12. Maser EA, Vilella R, Silverberg MS, et al. Association of trough serum infliximab to clinical outcome after scheduled maintenance treatment for Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:1248–1254.
13. Vermeire S, Noman M, van Assche G, et al. The effectiveness of concomitant immunosuppressive therapy to suppress formation of antibodies to infliximab in Crohn's disease. *Gut* 2007;56:1226–1231.
14. Toruner M, Loftus EV, Colombel JF, et al. Risk factors for opportunistic infections in inflammatory bowel disease: a case-control study (abstr). *Gastroenterology* 2006;130:A71.
15. Wolfe F, Michaud K. The effect of methotrexate and anti-tumor necrosis factor therapy on the risk of lymphoma in rheumatoid arthritis in 19,652 patients during 89,710 person-years of observation. *Arthritis Rheum* 2007;56:1433–1439.
16. Mackey AC, Green L, Liang LC, et al. Hepatosplenic T-cell lymphoma associated with infliximab use in young patients treated for inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;44:265–267.
17. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, et al. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976;70:439–444.
18. Guyatt G, Mitchell A, Irvine EJ, et al. A new measure of health status for clinical trials in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989;96:804–810.
19. Ternant D, Mulleman D, Degenne D, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of infliximab. *Ther Drug Monit* 2006;28:169–174.
20. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc* 2004;60:505–512.
21. D'haens G, van Deventer S, van Hogeand R, et al. Endoscopic and histological healing with infliximab anti-tumor necrosis factor antibodies in Crohn's disease: a European multicenter trial. *Gastroenterology* 1999;116:1029–1034.
22. Rutgeerts P, Diamond RH, Bala M, et al. Scheduled maintenance treatment with infliximab is superior to episodic treatment for the healing of mucosal ulceration associated with Crohn's disease. *Gastrointest Endosc* 2006;63:433–442.
23. Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, et al. Adalimumab induction therapy for Crohn's disease previously treated with infliximab. *Ann Int Med* 2007;146:829–838.
24. St. Clair EW, Wagner CL, Fasanmade AA, et al. The relationship of serum infliximab concentrations to clinical improvement in rheumatoid arthritis: results from ATTRACT, a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2002;46:1451–1459.

Received October 16, 2007. Accepted March 6, 2008.

Address requests for reprints to: Gert Van Assche, MD, PhD, Division of Gastroenterology, University of Leuven Hospitals, 49-Herestraat, 3000 Leuven, Belgium. e-mail: gert.vanassche@uz.kuleuven.be; fax: (32) 1624419.

Support for study was not funded externally.

Conflicts of interest that have been disclosed to study participants: Geert D'Haens, Paul Rutgeerts, and Gert Van Assche: Research support from Centocor and Schering Plough, Speaker's bureau of Schering Plough, consultancy for Centocor and Schering-Plough. Charlotte Magdelaine-Beuzelin: no conflict of interest. Filip Baert: no conflict of interest. Maja Noman: no conflict of interest. Séverine Vermeire: Speaker's bureau Schering-Plough. David Ternant: no conflict of interest. Hervé Watier: no conflict of interest. Gilles Paintaud: no conflict of interest. Paul Rutgeerts: Research support from Schering-Plough and Centocor.

Annexe 3

Article n°9

Infliximab concentration monitoring improves the control of disease activity in rheumatoid arthritis.

Denis Mulleman, Jean-Camille Méric, Gilles Paintaud, Emilie Ducourau, Charlotte Magdelaine-Beuzelin, Jean-Pierre Valat, Philippe Goupille. *Arthritis Res Ther.*, 2009, 11(6):R178.

Research article

Open Access

Infliximab concentration monitoring improves the control of disease activity in rheumatoid arthritis

Denis Mulleman^{1,2*}, Jean-Camille Méric^{1,2*}, Gilles Paintaud^{1,3}, Emilie Ducourau^{1,2}, Charlotte Magdelaine-Beuzelin^{1,4}, Jean-Pierre Valat^{1,2}, Philippe Goupille^{1,2,5} for the Centre National de la Recherche Scientifique UMR 6239 GICC

¹Université François-Rabelais de Tours, 3 rue des Tanneurs, 37041 Tours Cedex 1, France

²Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Tours, Service de Rhumatologie, avenue de la République, 37044 Tours Cedex 9, France

³Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Tours, Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, 2 boulevard Tonnellé, 37044 Tours Cedex 9, France

⁴Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Tours, Laboratoire d'Immunologie, 2 boulevard Tonnellé, 37044 Tours Cedex 9, France

⁵Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Centres Investigations Clinique 202, 2 boulevard Tonnellé, 37044 Tours Cedex 9, France

* Contributed equally

Corresponding author: Denis Mulleman, mulleman@med.univ-tours.fr

Received: 27 Aug 2009 Revisions requested: 5 Nov 2009 Revisions received: 17 Nov 2009 Accepted: 25 Nov 2009 Published: 25 Nov 2009

Arthritis Research & Therapy 2009, **11**:R178 (doi:10.1186/ar2867)

This article is online at: <http://arthritis-research.com/content/11/6/R178>

© 2009 Mulleman et al.; licensee BioMed Central Ltd.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Introduction Adjustment of infliximab dosage for individuals may be useful in improving therapeutic response in rheumatoid arthritis (RA). Herein, we aimed to determine whether measurement of infliximab serum concentration modifies the therapeutic decision and improves the control of disease activity.

Methods RA patients routinely treated with infliximab were included in an observational open-label study. On visit 1 (V1), according to the disease activity, a preliminary therapeutic decision was selected among four therapeutic options and a blood sample was collected to measure trough serum infliximab concentration. The final therapeutic decision, based on both disease activity and serum infliximab concentration assessed at V1, was applied at the following infusion (V2). Clinical and

biological evaluations were performed at V3 and V4 and compared with those at V1.

Results We included 24 patients. The final therapeutic decision differed from the preliminary decision for 12 patients (50%). For patients with increased infliximab dosage at V2, mean disease activity score for 28 joints (DAS28) decreased by about 20% at V3 or V4 as compared with V1 ($P < 0.05$). Decreased DAS28 was correlated with increased serum infliximab concentration ($P < 0.02$).

Conclusions The measurement of infliximab trough concentration modifies the therapeutic decision for RA patients and helps improve control of disease activity. Therapeutic drug monitoring of infliximab in RA may be useful for individual dosage adjustment.

Introduction

Infliximab is a chimeric monoclonal antibody against tumor necrosis factor- α (TNF- α) used in the treatment of rheumatoid arthritis (RA); its efficacy was demonstrated in a randomized controlled trial [1]. The variable inter-individual response is explained at least in part by individual pharmacokinetics [2]. Clinical response in RA is indeed influenced by infliximab serum concentration [2-6], and we have recently shown that this concentration predicts long-term disease con-

trol in daily practice [7]. Adjustment of infliximab dosage for individuals may be useful in improving therapeutic response [8,9]. Hence, patients with persistent active disease and low infliximab concentrations could benefit from an increase in infliximab dosage, whereas those with poor disease control and high infliximab concentrations should switch to another biopharmaceutical. In contrast, patients with optimal disease control and high infliximab concentrations might benefit from a

ATI: antibody toward infliximab; DAS28: disease activity score for 28 joints; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; RA: rheumatoid arthritis; TNF- α : tumor necrosis factor- α ; V1, V2, and so on: visit 1, visit 2, and so on.

controlled reduction in infliximab dose or an increase of dosing intervals to decrease the risk of dose-related side effects.

We aimed to determine whether the measurement of serum infliximab concentration modifies the therapeutic strategy and improves the control of disease activity in RA. The secondary objective was to study whether this improvement in control of disease activity is related to changes in infliximab concentration.

Materials and methods

Patients

All RA patients visiting our rheumatology department from May to August 2007 to receive their routine infliximab infusion, according to recommendations from the French Society for Rheumatology for patients receiving anti-TNF biopharmaceuticals [10], were followed up during four visits (V1 to V4). According to the rules applied in our setting, patients were asked to complete a weekly questionnaire recording pain, joint stiffness, and disease activity on visual analog scales to estimate overall disease activity since the last infusion. In this observational study, eligible patients had received at least four infusions of infliximab, had an infliximab dose (in milligrams per kilograms) and dosing interval (± 4 days) similar to those of the previous infusion, had no change in use of disease-modifying anti-rheumatic drugs since the previous infusion, and had no pregnancy or surgery scheduled within the following three infusions. The study design is summarized in Figure 1. The patients gave their informed consent to participate in the study, and the study protocol was in compliance with the Declaration of Helsinki. This study was approved by our local institutional review board.

Serum concentrations of infliximab and antibody toward infliximab

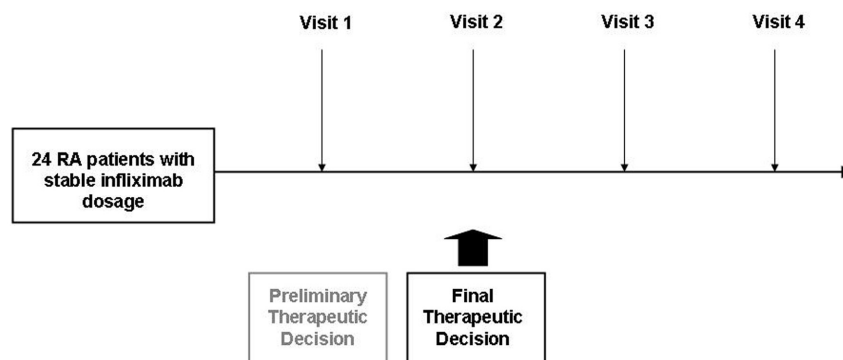
A blood sample was drawn just before each infusion from V1 to V4. Serum infliximab concentrations were measured by

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as previously described [11]. The limit of detection of this technique is 0.014 $\mu\text{g/mL}$. The lower limit of quantitation and upper limit of quantitation are 0.04 and 4.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Serum concentrations of antibody toward infliximab (ATI) were measured by double-antigen ELISA with capture by infliximab-coated microplates and detection by peroxidase-coupled infliximab. The ELISA was standardized by use of a mouse monoclonal antibody to all subclasses of human IgG. The limit of detection was 0.20 $\mu\text{g/mL}$. The technique was tested on 195 serum samples from healthy blood donors (37%), patients with autoimmune diseases (59.5%), and patients with hypergammaglobulinemia (3.5%) and did not lead to false-positive results, even in the presence of rheumatoid factor. Because of the interference with circulating infliximab, results were conclusive if the infliximab concentration in the sample was less than 1.7 $\mu\text{g/mL}$.

Preliminary therapeutic decision (before knowing infliximab concentration)

The preliminary therapeutic decision at V1 was based on clinical and conventional laboratory marker testing. Control of disease activity was categorized as 'optimal', 'acceptable', or 'inadequate' by a combination of disease activity score for 28 joints (DAS28) and physician global assessment. Taking into account the control of disease activity, the physician selected a preliminary therapeutic decision from among four options: (a) decrease infliximab dosage, (b) maintain the same infliximab dosage and possibly add another therapeutic intervention (that is, intra-articular corticosteroid injection, physical treatment, or analgesic pharmaceuticals), (c) increase infliximab dosage, or (d) discontinue infliximab and switch to another treatment. An increase in infliximab dosage was not possible if the V1 dosage was considered maximal (that is, a dose of at least 7.5 mg/kg or an interval of not more than 4 weeks).

Figure 1



Study design. Each visit corresponds to infliximab infusion and included clinical assessment, a blood sample for measurement of infliximab, and testing for antibody against infliximab. The final therapeutic decision took into account infliximab concentration measured at visit 1. RA, rheumatoid arthritis.

Final therapeutic decision

The final therapeutic decision applied at V2 (Figure 1) took into account both the assessment of disease activity and the trough serum infliximab concentration measured at V1 (Table 1). According to available published data [2,3,12,13], a target infliximab serum concentration of 5 µg/mL was selected. Trough infliximab concentration was classified as low (<2.0 µg/mL), medium (≥2.0 and <8 µg/mL), or high (≥8 µg/mL).

Statistical analysis

Clinical and biological markers of disease activity, DAS28, and trough serum infliximab concentration at V1 were compared with those at V3 and V4. Statistical differences were analyzed by the Wilcoxon non-parametric test for continuous variables. The relation between change in infliximab serum concentration and change in DAS28 from V1 to V4 was analyzed by the Spearman non-parametric correlation test. Statistical analysis involved Statview version 5 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A two-tailed *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant. Results are presented as median [range] unless otherwise stated.

Results

Characteristics of patients

A total of 24 patients (8 men) were included. The median age was 61 years [34 to 78], and the disease duration was 10 years [5 to 58]. The median duration of infliximab treatment was 56 months [3 to 76], and the number of previous infliximab infusions was 31 [4 to 39]. Before receiving infliximab, 2 patients (9%) had received one of the two other anti-TNF-α biopharmaceuticals available at that time. Sixteen patients were receiving prednisone (dose/day = 5 mg [0.5 to 10.0]), and 20 patients were receiving methotrexate (dose = 10 mg/week [5 to 17.5]). The median interval between infliximab infusions was 8 weeks [6 to 9], and the dose of infliximab infusion was 3.75 mg/kg [2.80 to 7.30]. The median infliximab concentration was 3.00 µg/mL [0.01 to 7.80]. No patient had a high trough infliximab concentration, 17 patients (71%) had medium trough concentrations, and 7 (29%) had low trough

concentrations. The median erythrocyte sedimentation rate was 14 mm/hour [5 to 49], the level of C-reactive protein was 5.0 mg/L [0.6 to 22.0], and DAS28 was 2.65 [1.48 to 6.16]. At V1, 12 patients (50%) showed optimal control of disease activity, 5 (21%) acceptable control, and 7 (29%) inadequate control. Only one patient was positive for ATI at V1 (2.18 µg/mL) with a concomitant infliximab concentration that was undetectable (0.01 µg/mL). This patient had been receiving infliximab for 9 months. Her infliximab dosage was increased during the study, but she eventually discontinued the treatment after V4.

Difference between preliminary and final therapeutic decision

The final therapeutic decision, taking into account serum infliximab concentration, differed from the preliminary therapeutic decision for 12 patients (50%) (Additional data file 1). For 7 patients, the infliximab dosage was increased for the final therapeutic decision as compared with 3 patients for whom the dosage was increased at the preliminary therapeutic decision. Of the 7 patients, 6 were considered to have an inadequate control of disease activity (2 with medium and 4 with low infliximab concentration) and 1 was considered to have acceptable control (with medium infliximab concentration).

Evolution of clinical and biological markers of disease activity

Changes in DAS28 over time are presented in Figure 2. DAS28 significantly improved from V1 to V3 (*P* < 0.05) for patients with an increase in infliximab dosage. The mean improvement in DAS28 for patients of this group was about 20%. The improvement as compared with V1 was maintained at V4 (*P* < 0.05).

Relation between change in serum infliximab concentration and change in disease activity

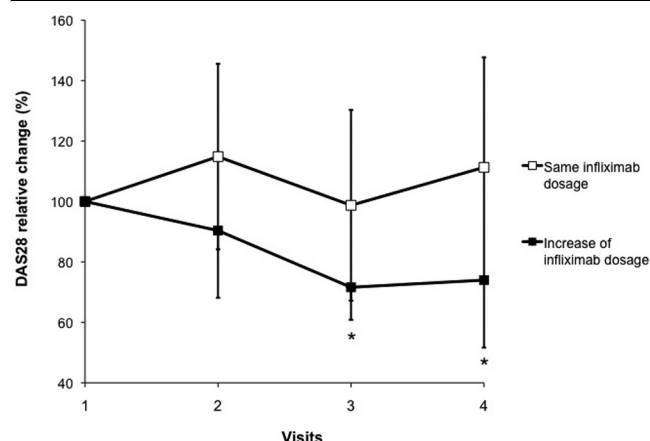
As shown in Figure 3, changes in DAS28 and infliximab concentration between V1 and V4 were inversely related (*P* < 0.02).

Table 1

Final therapeutic decision at visit 2 based on disease activity control and serum trough infliximab concentration

		Control of disease activity		
		Optimal	Acceptable	Inadequate
Infliximab trough concentration	High: C (µg/mL) ≥8.0	Decrease infliximab dosage	Maintain same infliximab dosage	Switch to another biopharmaceutical
	Medium: 2.0 ≤ C (µg/mL) <8.0	Maintain same infliximab dosage	Consider increasing infliximab dosage ^a	
	Low: C (µg/mL) <2.0	Maintain same infliximab dosage	Increase infliximab dosage	

Infliximab dosage could not be increased if the current dosage was considered maximal (that is, at least 7.5 mg/kg or interval of not more than 4 weeks). ^aIf the physician kept the same infliximab dosage, another therapeutic intervention could be added (that is, intra-articular corticosteroid injection, physical treatment, or analgesic pharmaceuticals). C, concentration.

Figure 2

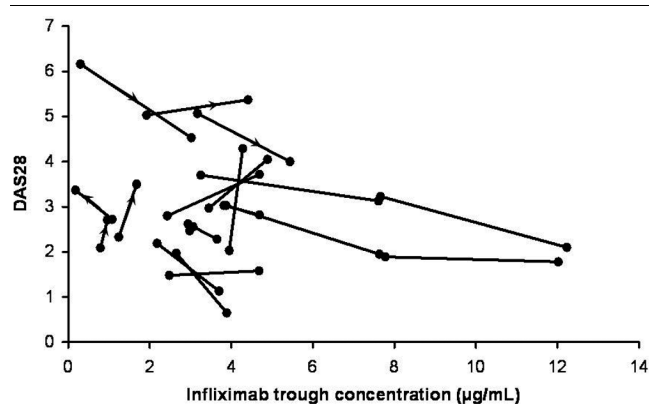
Relative change in mean disease activity score for 28 joints (DAS28) over time according to final therapeutic decision (Table 1). * $P < 0.05$.

Discussion

To our knowledge, this is the first study to highlight the usefulness of pharmacokinetic monitoring of infliximab concentration to control disease activity in RA. Indeed, the measurement of trough infliximab concentration modified the therapeutic decision for half of our patients and led to improved control of disease activity for patients for whom infliximab dosage was increased. Our results confirm those of a clinical observational study that did not monitor infliximab concentrations [8]. The strength of our approach lies in a strategy that took into account both disease activity and serum infliximab concentration.

The second important finding is the relation between increase in serum infliximab concentration and clinical improvement, as measured by the DAS28. Because concomitant medications remained unchanged during the study for patients whose infliximab dosage had been increased, the improvement in DAS28 should have resulted from the increase in infliximab concentration. Our results also confirm the inter-individual variability of infliximab pharmacokinetics. Despite a median infliximab dose (3.75 mg/kg [2.80 to 7.30]) above that recommended in patients with RA, 7 patients (29%) had low trough concentrations.

Clinicians can face two situations with RA patients receiving infliximab. The first corresponds to patients with optimal disease control, for whom the physician could consider reducing infliximab dosage. However, a decrease in infliximab dosage without infliximab concentration monitoring may lead to underexposure, a situation that can predict insufficient control of disease activity and increased risk of positivity for ATI [4,14]. For the preliminary therapeutic decision, infliximab dosage reduction was planned for 6 patients; however, because these patients were all considered satisfactorily exposed or underexposed, they continued the same regimen for the final therapeutic

Figure 3

Relation between change in serum infliximab concentration and change in disease activity score for 28 joints (DAS28) from visit 1 to visit 4. Because of missing data, four patients are not represented.

tic decision. The second situation corresponds to patients with disease control the physician considers acceptable or inadequate. In this situation, the physician could consider increasing the infliximab dosage to improve the control of disease activity. However, concerns arise in the prolonged use of TNF- α antagonists, especially at high doses [15]. Therefore, the measurement of serum infliximab concentration in this situation could be useful to avoid an unnecessary increase in dosage in patients with concurrent high infliximab concentration and hence a risk of dose-dependent side effects. Monitoring of infliximab concentrations in this situation would lead the clinician to increase the dosage only if the patient does not have a high infliximab concentration. Therapeutic drug monitoring of infliximab could result in a lowering of dosage in patients having higher exposure than needed, in an increasing of dosage in others, or in a discontinuation of infliximab in non-responders with high exposure. As a whole, such a strategy should improve the cost-effectiveness of infliximab in RA.

Our method to determine infliximab serum concentration detects the active form of infliximab (that is, the species that can bind to TNF- α), not infliximab molecules that are already bound to TNF- α or ATI. The choice of measuring the active form allows investigators to analyze the concentration-effect relationship.

Immunogenicity induced by anti-TNF- α biopharmaceuticals has been associated with low concentrations and poor clinical outcomes [16]. Our technique for ATI detection was limited by the presence of circulating infliximab. The problem is well known and is encountered whatever the method used [17]. Also, ATI may have underestimated the infliximab determination by neutralizing both infliximab paratopes. However, such undetectable infliximab molecules are inactive and cannot be taken into account for pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis. Positivity for ATI influences the pharmacokinetics of

infliximab in ankylosing spondylitis [18] and inflammatory bowel disease [19], but the determining factor in the concentration-effect relation of infliximab is infliximab itself.

Only one patient was positive for ATI, and this can be explained by the duration of infliximab treatment, 56 months [3 to 76]. Indeed, patients positive for ATI probably had already switched to another treatment because of clinical signs of immunization or secondary failure of treatment. ATI false-negative results may have occurred for sera with detectable infliximab concentrations.

Our study has several limitations. Because it is an open-label observational study, patients may have been influenced by the therapeutic decision, especially those who were notified of an increase in infliximab dosage. Therefore, our results need to be confirmed by a randomized controlled study comparing therapeutic drug monitoring of infliximab with usual care. Also, our approach, based on a single clinical assessment, can be applied only for patients considered to have stable disease activity and not those with acute flare, whose condition requires a rapid therapeutic intervention. Because patients with acute flare were not considered in our study, we cannot extend our strategy to such patients. Because RA activity varies with time, we used a weekly diary to estimate global disease activity between two consecutive infusions to limit this factor. Another limitation of our study is that our population of RA patients had been treated for a long time with infliximab. Whether a dosage adjustment during the early initiation of treatment could be of benefit in terms of response is a challenging question. Since the concentration-effect relationship of infliximab is poorly known, therapeutic drug monitoring will be more difficult to test at treatment initiation. For that reason, our results apply only to RA patients with a relatively long period of treatment, not to patients at their initiation.

Conclusions

The measurement of serum trough infliximab concentration modifies the therapeutic decision for RA patients and leads to improved control of disease activity. Thus, therapeutic drug monitoring of infliximab may improve the control of disease activity in RA.

Competing interests

DM and J-PV took part in clinical trials as co-investigators for Abbott (Abbott Park, IL, USA), Schering-Plough Corporation (Kenilworth, NJ, USA), Wyeth (Madison, NJ, USA), Roche (Basel, Switzerland), and Bristol-Myers Squibb Company (Princeton, NJ, USA). PG participated in clinical trials as a co-investigator and as a study contributor for Abbott, Schering-Plough Corporation, Wyeth, Roche, and Bristol-Myers Squibb Company and took part in conferences and provided expert reports and advisory services for L.F.B. (Courtabœuf, France), Roche, Schering-Plough Corporation, and Wyeth. GP took part in conferences and provided expert reports and advisory

services for L.F.B., Roche, Schering-Plough Corporation, and Wyeth. CM-B had occasional involvement with expert reports for Abbott. All other authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

DM and J-CM supervised the study design, performed the statistical analysis, and drafted the manuscript. GP participated in the study design, carried out the immuno assays (infliximab serum concentration), and helped to draft the manuscript. PG participated in the study design and helped to draft the manuscript. CM-B carried out the immuno assays (antibodies toward infliximab serum concentration). ED and J-PV helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional files

The following Additional files are available online:

Additional file 1

Differences between preliminary and final therapeutic decision. At visit 1 (V1), 24 rheumatoid arthritis (RA) patients received a preliminary therapeutic decision that corresponded to the following options: decrease infliximab dosage; same infliximab dosage plus another intervention; increase infliximab dosage; discontinue infliximab; and switch to another treatment. The final decision (same options) applied at V2 took into account disease activity control and trough infliximab concentration measured at V1 (Table 1).

See <http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/ar2867-S1.JPEG>

Acknowledgements

The authors thank Marie-Françoise Coudray, Françoise Gouais, Martine Creton, Fabienne Chapacou, and Dominique Guillou for blood sampling; Anne-Claire Duveau for technical assistance in infliximab concentration measurements; Delphine Chu Miow Lin and Francine Lauféron for recruiting and assessing patients; Julie Allais for invaluable help in collecting data; and Laura Heraty for her kind assistance with the manuscript.

References

1. Maini R, St Clair EW, Breedveld F, Furst D, Kalden J, Weisman M, Smolen J, Emery P, Harriman G, Feldmann M, Lipsky P: **Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group.** *Lancet* 1999, **354**:1932-1939.
2. St Clair EW, Wagner CL, Fasanmade AA, Wang B, Schaible T, Kavanaugh A, Keystone EC: **The relationship of serum infliximab concentrations to clinical improvement in rheumatoid arthritis: results from ATTRACT, a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**:1451-1459.
3. Wolbink GJ, Voskuyl AE, Lems WF, de Groot E, Nurmohamed MT, Tak PP, Dijkmans BA, Aarden L: **Relationship between serum**

- trough infliximab levels, pretreatment C reactive protein levels, and clinical response to infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005, **64**:704-707.
4. Bendtzen K, Geborek P, Svenson M, Larsson L, Kapetanovic MC, Saxne T: **Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor alpha inhibitor infliximab.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**:3782-3789.
 5. Rahman MU, Strusberg I, Geusens P, Berman A, Yocum D, Baker D, Wagner C, Han J, Westhovens R: **Double-blinded infliximab dose escalation in patients with rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2007, **66**:1233-1238.
 6. Mori S: **A relationship between pharmacokinetics (PK) and the efficacy of infliximab for patients with rheumatoid arthritis: characterization of infliximab-resistant cases and PK-based modified therapy.** *Mod Rheumatol* 2007, **17**:83-91.
 7. Chu Miow Lin D, Ducourau E, Mulleman D, Emond P, Ternant D, Paintaud G, Valat J-P, Goupille P: **Infliximab concentration is predictive of control of disease activity and maintenance of treatment in rheumatoid arthritis [abstract][French].** *Ann Rheum Dis* 2008, **67**(Suppl 2):P177.
 8. Durez P, Bosch F Van den, Corluy L, Veys EM, De Clerck L, Peretz A, Malaise M, Devogelaer JP, Vastesaeger N, Geldhof A, Westhovens R: **A dose adjustment in patients with rheumatoid arthritis not optimally responding to a standard dose of infliximab of 3 mg/kg every 8 weeks can be effective: a Belgian prospective study.** *Rheumatology (Oxford)* 2005, **44**:465-468.
 9. Collantes-Estevez E, Muñoz-Villanueva MC, Zarco P, Torre-Alonso JC, Gratacós J, González C, Sanmarti R, Cañete JD, Spanish Spondyloarthropathies Study Group: **Effectiveness of reducing infliximab dose interval in non-responder patients with refractory spondyloarthropathies. An open extension of a multicentre study.** *Rheumatology (Oxford)* 2005, **44**:1555-1558.
 10. Fautrel B, Pham T, Mouterde G, Le Loet X, Goupille P, Guillemin F, Ravaud P, Cantagrel A, Dougados M, Puechal X, Sibilia J, Soubrier M, Mariette X, Combe B, Club Rhumatismes et Inflammation; Société Française de Rhumatologie: **Recommendations of the French Society for Rheumatology regarding TNFalpha antagonist therapy in patients with rheumatoid arthritis.** *Joint Bone Spine* 2007, **74**:627-637.
 11. Ternant D, Mulleman D, Degenne D, Willot S, Guillaumin JM, Watier H, Goupille P, Paintaud G: **An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of infliximab.** *Ther Drug Monit* 2006, **28**:169-174.
 12. 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**:601-608.
 13. Cornillie F, Shealy D, D'Haens G, Geboes K, Van Assche G, Ceuppens J, Wagner C, Schaible T, Plevy SE, Targan SR, Rutgeerts P: **Infliximab induces potent anti-inflammatory and local immunomodulatory activity but no systemic immune suppression in patients with Crohn's disease.** *Aliment Pharmacol Ther* 2001, **15**:463-473.
 14. Wolbink GJ, Vis M, Lems W, Voskuyl AE, de Groot E, Nurmohamed MT, Stapel S, Tak PP, Aarden L, Dijkmans B: **Development of antiinfliximab antibodies and relationship to clinical response in patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**:711-715.
 15. Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V: **Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials.** *JAMA* 2006, **295**:2275-2285.
 16. Emi Aikawa N, de Carvalho JF, Artur Almeida Silva C, Bonfa E: **Immunogenicity of anti-TNF-alpha agents in autoimmune diseases.** *Clin Rev Allergy Immunol* 2009 in press.
 17. Radstake TR, Svenson M, Eijsbouts AM, Hoogen FH van den, Enevold C, van Riel PL, Bendtzen K: **Formation of antibodies against infliximab and adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2009, **68**:1739-1745.
 18. Xu Z, Seitz K, Fasanmade A, Ford J, Williamson P, Xu W, Davis HM, Zhou H: **Population pharmacokinetics of infliximab in patients with ankylosing spondylitis.** *J Clin Pharmacol* 2008, **48**:681-695.
 19. Ternant D, Aubourg A, Magdelaine-Beuzelin C, Degenne D, Watier H, Picon L, Paintaud G: **Infliximab pharmacokinetics in inflammatory bowel disease patients.** *Ther Drug Monit* 2008, **30**:523-529.

impliqués dans la variabilité de la
pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques

Résumé

A l'instar des pionniers de la sérothérapie qui s'interrogeaient déjà sur la pharmacologie des anticorps, nous avons analysé les facteurs immunologiques susceptibles d'influencer la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux recombinants. Leurs séquences peptidiques et les gènes codant leurs domaines variables ont été précisément décrits afin d'évaluer leur divergence par rapport au répertoire germlinal humain. En ce qui concerne les domaines constants, nous avons identifié les déterminants allotypiques qu'ils portent, et recherché si les allotypes G1m du patient pouvaient influencer la survenue des anticorps induits, en prenant l'infliximab comme modèle d'étude. Même si cela ne semble pas être le cas pour cet anticorps chimérique, la mise au point des tests de détection des anticorps induits nous a permis de quantifier pour la première fois leurs effets sur la pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques. La survenue des anticorps anti-infliximab provoque la diminution de moitié de la demi-vie d'élimination de cet anticorps ; des résultats analogues ont été obtenus avec l'adalimumab. Une autre piste de recherche serait d'explorer FcRn, le récepteur néonatal des IgG impliqué dans leur métabolisme et dont les polymorphismes pourraient influencer la pharmacocinétique.

Mots-clés : Anticorps monoclonaux recombinants – infliximab – *antibodies to infliximab* (ATI) – allotypes – pharmacocinétique – FcRn

Résumé en anglais

As the pioneers of serotherapy who already wondered about antibody pharmacology, we have analysed the immunologic factors that may influence recombinant therapeutic antibody pharmacokinetics. Their peptidic sequences and the genes encoding their variable domains were precisely described in order to evaluate their divergence from the human germline repertoire. We also identified the allotypic determinants they carry and explored whether the patient G1m allotypes can influence the onset of induced antibody, taking infliximab as a model. Although it does not seem to be the case for this chimaeric antibody, the setting up of assays detecting induced antibodies allowed us to quantify for the first time their influence on therapeutic antibody pharmacokinetics. Antibodies against infliximab are associated with a half decrease in the elimination half life of infliximab; analogous results were obtained for adalimumab. Another interesting way of investigation would be to explore FcRn, the IgG neonatal Fc receptor which plays a role in IgG metabolism and whose genetic polymorphisms may influence IgG pharmacokinetics.

Keywords: recombinant monoclonal antibodies – infliximab – antibodies to infliximab (ATI) – allotypes – pharmacokinetics – FcRn