

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

GICC - UMR CNRS 7292

THÈSE présentée par :

Jérémy POTTIER

soutenue le : 16 décembre 2016

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Science de la vie, Immunologie

Variants de la portion Fc des IgG
Cartographie et analyse brevets,
confrontation aux biomédicaments en développement
et proposition d'une nouvelle nomenclature

THÈSE dirigée par :

M. WATIER Hervé

Professeur des Universités, Univ. François-Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

M. BRUHNS Pierre

Directeur de Recherche INSERM, Institut Pasteur, Paris

M. ROMAGNE François

Directeur Scientifique MI-mAbs, Professeur Univ. d'Aix-Marseille

JURY :

M. BRUHNS Pierre

Directeur de Recherche INSERM, Institut Pasteur, Paris

Mme CERUTTI Martine

Responsable de l'équipe Baculovirus et Thérapie, CNRS

M. COLLIN Matthieu

Directeur Propriété Intellectuelle, Inserm Transfert

Mme GUIVARC'H Nathalie

Professeur des Universités, Univ. François-Rabelais de Tours

M. ROMAGNE François

Directeur Scientifique MI-mAbs, Professeur Univ. d'Aix-Marseille

Mme VELGE-ROUSSEL Florence

Maître de conférences, Univ. François-Rabelais de Tours

M. WATIER Hervé

Professeur des Universités, Univ. François-Rabelais de Tours

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury d'avoir pris de leur temps pour évaluer mon travail.

Je voudrais remercier mon directeur de thèse, le Professeur **Hervé Watier**, de m'avoir accueilli pour mon stage de fin de Master II il y a 3 ans, et de m'avoir fait confiance pour continuer l'aventure en thèse depuis. J'ai appris beaucoup durant ces trois ans à vos côtés et je vous en suis très reconnaissant. Cette thèse a été enrichissante autant humainement que professionnellement, et j'en garderai de très bons souvenirs. Je vous remercie également de m'avoir permis de traverser trois fois l'Atlantique pour participer au Keystone, où là encore j'ai des souvenirs inoubliables.

Encore merci pour tout, et j'espère que nous aurons encore la chance de travailler ensemble dans le futur.

Je voudrais ensuite particulièrement remercier l'ensemble de la cellule de pilotage du LabEx MAbImprove, dans laquelle j'ai passé 3 merveilleuses années. **Marc**, merci pour tout, pour ta bonne humeur, pour tes conseils, pour avoir été là chaque jour ! J'espère que Brest remontera en L1 à la fin de l'année ! **Arnaud**, je ne t'oublie pas, merci pour l'accueil et pour tout au LabEx, j'espère que tu t'épanouis dans ta pharmacie à Châteauroux. **Annie**, tu nous as longtemps tous maternés au LabEx, et je t'en remercie beaucoup. Je remercie également **Marc Ohresser** de m'avoir accueilli et encadré durant mon stage de Master II. Je voudrais également remercier pour leur sympathie les arrivants plus récents et ceux qui ont été de passage, **Sophie, Joan, Audrey, Elodie, Christine, Denis, Alexandra, Philippe**. J'ai également une pensée pour tous les stagiaires passés durant mes 3 années de thèses. **Line, Antoine, Natacha, Rémi, Manon, Léa, François, Sophie, Romane, Christophe, Valentin**, j'espère que tout va bien pour vous et que vos projets se réalisent comme prévu ! **Christophe**, je te souhaite également bon courage pour la thèse !

Je remercie également tous les membres du **LabEx MAbImprove**, pour leurs mots toujours sympathiques, et pour les retraites scientifiques qui resteront des moments inoubliables !

Je souhaite également remercier toute l'**UMR 7292** et particulièrement l'équipe FRAME. **Gilles** et **Valérie**, merci pour vos conseils et votre sympathie. Les copains de galère, pardon, de doctorat, **Claire, Guigui, Diana, Mira, Ludo, Camille**, merci pour votre soutien, pour les

kebabs au Mik Mak, pour les afters de congrès... Je vous souhaite tout le meilleur et j'espère que vos projets de thèse et surtout hors-thèse se réaliseront comme vous l'entendez. Au plaisir de se recroiser rapidement à Tours ou ailleurs !

Je voudrais enfin particulièrement remercier le Professeur **Thierry Moreau** pour ses conseils notamment sur PyMOL. Je suis loin d'être devenu un pro de ce dernier, mais tes conseils m'ont grandement aidé, et des dizaines de figures en sont sorties, comme tu pourras le voir dans ce manuscrit ! Je voudrais également remercier le Professeur **Denis Maurel** pour ses précieux conseils sur les bases de données. IgVarImprove ne serait rien sans nos entretiens et sans vos précieux conseils.

Je veux maintenant remercier tous mes amis et mes proches, qui ont toujours été là pour moi :

Noémie, nono, petit bout, nonolabricot41... Que dire. Deux ans que tu es là chaque jour physiquement ou virtuellement à mes côtés. Durant ces deux ans nous n'avons pas vécu que des événements heureux, mais ensemble nous avons toujours tenu bon. Je suis très fier de ce que tu as réalisé l'année passée, et je sais que dans 5 ans tu feras la meilleure des orthophonistes. Enfin, je te remercie de m'avoir toujours soutenu durant ces deux ans, de m'avoir reboosté quand parfois j'accusais le coup, d'avoir pris du temps pour moi quand ta prépa ne t'en laissait pas forcément. Tu le sais déjà, mais je t'aime.

Boubou, Tinmar, Francky, N'amour, Thibault, Pogn, Laulau, Adeline. Vous détaillez à chacun les raisons qui font que j'ai envie de vous remercier serait très long, et ma thèse l'est assez... Mais je résumerai en vous remerciant d'avoir été là depuis ces très nombreuses années, pour ces soirées mémorables, ces longues discussions, ces soirées de geekages, ces lendemains difficiles... Plus personnellement, mon **Boubou**, j'espère que tu te sortiras de tout ça rapidement, tu nous manques. **Tinmar**, j'espère que ton entreprise va décoller rapidement, tu le mérites ! **Francky**, bonne chance à Orléans, je sais que tu t'en sortiras. A bientôt sur Tours ou sur le PSN ! **N'amour** et **Thibault**, je vous souhaite tout le bonheur possible, vous le méritez ! Prenez bien soin loin de l'un autre, ou vous aurez à faire à moi. **Pogn** et **Laulau**, tout pareil, prenez bien soin de vous, et surtout de momo ! Pogn j'ai un reste de sky à finir si tu veux passer... ! **Adeline**, on ne se voit pas autant que je le souhaiterais, mais je sais qu'avec les chevaux c'est compliqué de te libérer ! En tout cas bon courage pour la fin de tes études. A tous,

je m'en vais pour quelques temps, mais j'espère qu'on se reverra rapidement à chacun de mes passages sur Tours.

Merci à tout l'**US Monnaie** et principalement aux copains séniors pour ces très belles années de football. La double montée restera pour longtemps je le sais mon meilleur souvenir de foot ! Je m'en vais loin, mais je continuerais à suivre vos résultats, ne me décevez pas !

Je terminerais par remercier ceux sans qui je n'aurais rien pu faire. **Maman, Papa, Julien** je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi jusque là. Vous avez toujours été présents quand j'en avais besoin, m'avez toujours soutenu (même quand vous ne comprenez pas forcément ce que je fais... !), et sans vous je sais que je ne serais pas allé aussi loin. Merci encore. Je vous aime. Je remercie également l'ensemble de ma famille, qui m'a toujours encouragé à faire ce que j'aimais.

Résumé

Plus de 40 ans après la découverte de la technologie des hybridomes, une soixantaine d'anticorps monoclonaux thérapeutiques IgG ou assimilés sont aujourd'hui commercialisés. Leur succès découle de leur humanisation, en particulier celle de la portion Fc qui dérive de différents variants humains naturels, isotypes et allotypes. Depuis quelques années, apparaissent sur le marché de nombreux anticorps comportant des portions Fc artificiellement modifiées dans le but de moduler diverses propriétés pharmacologiques (propriétés cytolytiques, demi-vie, stabilité, etc.), dont certaines ont été particulièrement étudiées suite aux travaux de notre équipe. Les variants Fc sont protégés par des technologies brevetées dont on connaît mal l'étendue, qui ne font pas nécessairement l'objet de publications scientifiques, et dont la raison d'être reste méconnue des chercheurs et plus encore des professionnels de santé. Nous avons donc entrepris de réaliser une cartographie et une analyse fine des brevets traitant des modifications dans la portion Fc des IgG. Cette analyse a été menée de front avec une étude bibliographique détaillée, car les données scientifiques décrites dans les brevets sont toujours à considérer avec prudence, les demandes de brevets n'étant pas revues par des pairs. Nous avons eu l'occasion d'ailleurs d'épingler certaines dérives, comme celle de considérer qu'il pourrait y avoir plus de 4 sous-classes d'IgG dans l'espèce humaine (jusqu'à 19 dans certaines revendications...).

Nous avons rassemblé un corpus de 998 brevets décrivant des variants Fc, dont l'analyse macroscopique fait apparaître une répartition croissante depuis 1988, avec une accélération des dépôts ces 3 dernières années, confirmant l'intérêt grandissant de l'industrie pharmaceutique pour ce sujet. L'analyse microscopique a été réalisée sur les 317 premiers brevets du corpus, permettant d'indexer 5038 variants Fc dans la base IgVarImprove que nous avons développée et qui permet de lier chaque variant moléculaire aux propriétés biologiques décrites dans la partie « Exemples » des brevets. La majorité des variants concerne la sous-classe IgG1, avec des variations peptidiques du domaine CH2 destinées à moduler les propriétés effectrices des anticorps, que l'on retrouve aujourd'hui dans des molécules commercialisées comme le védolizumab. L'analyse d'un sous-ensemble de 103 brevets du corpus entier, tous ceux qui décrivent des variants Fc d'IgG4, a été réalisée de façon exhaustive, et nous a permis d'indexer 537 variants moléculaires. Contrairement au corpus entier, ces variants moléculaires visent davantage à moduler la stabilité de la molécule, en lien avec le phénomène d'échange d'hémi-IgG propre aux IgG4. La cartographie de ces modifications peptidiques fait ainsi apparaître des hot-spots plus volontiers mutés, essentiellement dans la charnière ou dans le CH3, les deux régions contribuant à ce phénomène. Les technologies les plus anciennement décrites sont dorénavant tombées dans le domaine public, ce qui explique l'augmentation de la proportion d'anticorps à Fc muté parmi les IgG4 commercialisées depuis 2014 (6 sur 8).

Le recensement de tous ces variants moléculaires nous a également amené à nous poser la question d'une nomenclature simple, qui permettrait d'identifier plus facilement les anticorps ayant les mêmes modifications, dans l'hypothèse où ils produiraient des effets secondaires similaires. Nous proposons au final une nomenclature inspirée de celle des allotypes d'IgG, que nous proposons d'adjoindre à la dénomination commune internationale des anticorps, qui nécessite elle aussi d'être revue afin de mieux distinguer les anticorps qui possèdent une portion Fc de ceux qui n'en ont pas.

Anticorps thérapeutiques – Fc – Variants moléculaires – Analyse brevet – Cartographie – Immunoglobuline – Base de données – Nomenclature – DCI

Résumé en anglais

More than 40 years after the discovery of the hybridoma technology, around sixty therapeutic monoclonal antibodies based on IgG or assimilated are marketed today. Their success comes from their humanization, especially of the Fc portion derived from various natural human variants, isotypes and allotypes. For some years, many antibodies artificially modified in their Fc portions have emerged, in order to alter various pharmacological properties (cytolytic properties, half-life, stability, etc.), some of them having been particularly studied following the works of our team. Fc variants are covered by patented technologies of which little is known about the extent, which are not necessarily the subject of scientific publications, and whose purpose remains unknown for researchers and even more for health professionals. We therefore undertook to realize a landscape and a detailed analysis of patents dealing with modifications in the Fc portion of IgG. This analysis has been conducted in front with a detailed literature survey, since the scientific data described in patents must be treated with caution, as patent application are not peer reviewed. We actually point certain abuses, such as to consider that there might be more than four human IgG subclasses (up to 19 in some claims...).

We collected a pool of 998 patents describing Fc variants, for which the macroscopic analysis reveals an increasing filing of patents since 1988, with an acceleration during the last three years, confirming the growing interest for the subject of the pharmaceutical industry. The microscopic analysis performed on the older 317 patents allowed us to index 5038 Fc variants in the IgVarImprove database that we developed, and which permits to link every molecular variants with their biological properties described in the “Examples” section of patents. The majority of the variants relates to IgG1 subclass, with peptide variations of the CH2 domain in order to modulate the effector properties, presently found in marketed molecules like vedolizumab. The analysis of a subset of 103 patents, describing IgG4 Fc variants, was exhaustively carried out, and enabled us to index 537 molecular variants. Contrary to the whole pool, these molecular variants are mostly intended to modulate the stability of the molecule, linked to the hemi-IgG4 interchange phenomenon peculiar to IgG4. Mapping these peptide modifications shows hotspots mostly located in hinge or CH3, the two regions contributing to this phenomenon. The oldest described technologies are now free to use, explaining the increase of Fc mutated IgG4 marketed since 2014 (6 of 8).

The census of all these molecular variants has also led us to ask ourselves about a simple nomenclature, which would permit to readily identify antibodies having the same modifications, in case of similar side effects. We finally propose a nomenclature inspired on that of IgG allotypes that we suggest to add to international nonproprietary names of antibodies, which also requires to be reviewed to better distinguish antibodies having a Fc portion of those who do not.

Therapeutic antibodies – Fc – Molecular variants – Patent analysis – Mapping – Immunoglobulin – Database – Nomenclature - INN

Valorisation des travaux de thèse

Publications

Pottier J., et Watier H. Unexplained abuses of human IgG subclass denomination in antibody patents. *BioDrugs* 2014 28:327–9.

Pottier J., Thibault G, et Watier H. Mobilisation des effecteurs de l'immunité par les anticorps anticancéreux nus. EDP Sciences. In: *Immunothérapie des cancers au troisième millénaire*. 2014. page 233–45.

Pottier J., Gouilleux-Gruart V. et Watier H. Modifications in the IgG4 Fc portion of therapeutics in patents: opportunities for a twisting IgG subclass. Soumis à *Nature Biotechnology*.

Pottier J., Chastang R, Dumet C, Watier H. Rethinking the INN system for therapeutic antibodies. *MAbs* 2017 9(1):5-11.

Communications

Pottier J. et Watier H. « Cartographie des brevets traitant des modifications dans la partie Fc des anticorps. Analyse des modifications Fc portant sur la stabilité d'IgG4. » Retraite scientifique du LabEx MAbImprove. 15 Mars 2016, Le Mont Dore. (Communication orale)

Pottier J. et Watier H. « IgG4 Fc-based therapeutic proteins: an established stabilizing technology ». Keystone Symposia, « Antibodies as Drugs ». 8 Mars 2016, Whistler, Canada. (Communication affichée)

Pottier J. et Watier H. « Cartographie des brevets traitant des modifications dans la partie Fc des anticorps thérapeutiques. Exemple de l'utilisation des brevets dans la recherche bibliographique ». Biotechnocentre. 15 Octobre 2015, Seillac. (Communication orale)

Pottier J. et Watier H. « Cartographie des brevets traitant des modifications dans la partie Fc des anticorps thérapeutiques. » Retraite scientifique du LabEx MAbImprove. 18 Mars 2015. Le Mont Dore (Communication orale)

Pottier J. et Watier H. « Cartographie des brevets traitant des modifications dans la partie Fc des anticorps monoclonaux thérapeutiques ». 9 Octobre 2014, Seillac. (Communication affichée)

Pottier J. et Watier H. « Inventaire et analyse des technologies d'ingénierie de la portion Fc des IgG » Retraite scientifique du LabEx MAbImprove. 25 Mars 2014. Le Mont Dore (Communication orale)

Avant-propos

Après une licence de Biologie, je me suis tourné vers le Master Biotechnologies et Droit à l'Université François-Rabelais de Tours pour continuer une formation qui reste proche de la recherche. Ce master m'a permis d'appréhender de nouvelles problématiques tenant à la propriété intellectuelle des inventions biotechnologiques, sujet pour lequel j'ai depuis un grand intérêt. J'ai réalisé mon stage de Master 2 au LabEx MAbImprove (Janvier-Septembre 2013), durant lequel j'ai pu notamment appréhender les outils utilisés durant cette thèse, et commencer la mise en œuvre du protocole de recherche qui sera explicité plus loin dans ce manuscrit. A l'issue de ma thèse, je compte m'orienter vers le métier d'ingénieur brevet spécialisé dans les biotechnologies, participant à la protection des inventions et la gestion des actifs brevets de sociétés, tout en surveillant les développements des concurrents grâce à une veille scientifique intense.

Mes travaux de thèse trouvent leur origine première dans une découverte majeure réalisée à Tours au début des années 2000 par le Laboratoire d'Immunologie du CHRU. Cette découverte porte sur l'association entre le polymorphisme du gène *FCGR3A* qui code le récepteur FcγRIIIA/CD16 exprimé notamment par les lymphocytes NK, et la réponse clinique au rituximab, un anticorps anti-CD20. La publication de ces travaux¹ accompagnés d'un éditorial a permis de renforcer l'impact de celle-ci. Des travaux réalisés par cette même équipe et par d'autres ont ensuite montré que l'association avec le polymorphisme *FCGR3A* concerne également de nombreux autres anticorps thérapeutiques à visée cytolytique^{2,3}. Un très grand nombre d'essais cliniques ont d'ailleurs inclus depuis l'étude de ce polymorphisme. Ce polymorphisme reste toujours le seul (avec celui de *FCGR2A*, qui lui est génétiquement lié) qui ait pu être associé à la qualité de réponse à plusieurs anticorps thérapeutiques. La confirmation de l'implication du récepteur FcγRIIIA dans les mécanismes d'ADCC par d'autres publications de l'équipe^{4,5} ont également participé à renforcer l'impact de cette découverte. A partir de ces connaissances, il devenait évident que moduler l'interaction de l'anticorps à ce type de récepteur en jouant sur la portion Fc des IgG, permettait d'influencer l'efficacité thérapeutique. Modifier cette portion devint donc un intérêt majeur pour l'industrie pharmaceutique, se traduisant par des dépôts de brevets protégeant différentes technologies de modulation de la liaison aux récepteurs FcγR (dont le FcγRIIIA), au C1q, premier élément de la voie classique du complément, ou encore au FcRn qui est important pour la demi-vie et la biodistribution de l'anticorps.

J'ai donc effectué ma thèse au sein de l'équipe A2RC (Anticorps, Récepteur Fc, Réponse clinique), maintenant devenue équipe FRAME (Fc Receptor, Antibody, MicroEnvironment) de l'Unité Mixte de Recherche « Génétique Immunothérapie, Chimie et Cancer » (UMR CNRS 7292 GICC), héritière de l'équipe ayant réalisé la découverte en 2000, dont de nombreux membres sont toujours présents. Ma thèse s'inclut également dans la dynamique du Laboratoire d'Excellence MAbImprove, financeur de cette thèse, et dont l'équipe FRAME fait partie. Ce programme des investissements d'avenir a été financé pour 10 ans à hauteur de 8 millions d'euros, et fédère 19 équipes de recherche et plus de 200 chercheurs à Tours et Montpellier. L'objet de ce « LabEx » est de mieux concevoir les anticorps monoclonaux, de mieux les développer, et de mieux les utiliser. Quatre thématiques ont émergé, décrites par 4 grandes questions ou « Key questions » (KQ) :

- KQ1 – Comment moduler l'activité d'une cible par la liaison de l'anticorps ?
- KQ2 – Comment amplifier l'activité des anticorps sur la base de leur format ?
- KQ3 – Comment augmenter l'activité des anticorps par le jeu des combinaisons ?
- KQ4 – Comment améliorer la manière d'administrer les anticorps ?

Mes travaux se placent dans la deuxième grande question, et portent sur le recensement dans les brevets des biomédicaments ayant une portion Fc d'IgG modifiée. Cette portion entre à l'heure actuelle dans la composition de nombreux biomédicaments commercialisés, dont 50 anticorps monoclonaux thérapeutiques et 7 protéines de fusion à portion Fc d'IgG. L'approche expérimentale a donc consisté à recenser quelque 1000 brevets portant sur le sujet et d'analyser leur contenu pour identifier tous les variants. Ceux-ci ont été indexés dans une base de données, IgVarImprove, que nous avons entièrement développée après un apprentissage des outils de développement de bases de données en langage SQL. Le nombre de brevets étant beaucoup trop important pour être analysé durant ces trois années de thèse, nous avons récemment recentré le sujet sur l'analyse des variants Fc d'IgG4, pour lesquels l'analyse entière a été réalisée. En parallèle a également été développée une nomenclature standardisée pour ces variants Fc, qui permettrait aux professionnels de santé une compréhension facilitée notamment des possibles effets secondaires liés à des molécules variantes de même nature. Ce travail arrive à un moment propice, puisque les dénominations communes internationales apposées aux anticorps thérapeutiques arrivent à un tournant, et beaucoup de discussions ont lieu pour envisager leur refonte.

Nous avons pris le parti d'inclure des éléments historiques dans les généralités de la thèse, d'une part pour bien positionner l'évolution des concepts et des dénominations, et d'autre part pour

prendre l'habitude de raisonner en « état de l'art » à une date donnée, ce qui doit être la base de toute analyse brevets.

En complément de ces travaux de thèse, j'ai également utilisé les outils à ma disposition pour aider les chercheurs de ce programme à trouver des informations, notamment dans les brevets. Ces services ont été réalisés dans le cadre de MAbMapping, une cellule spécialisée dans la cartographie brevet et la veille technologique. Cette cellule s'oriente principalement autour de trois activités ; La **cartographie** des brevets, la newsletter **MAbWatch** et la base **TAD**.

La cartographie des brevets permet de répondre aux problématiques posées par les chercheurs en trouvant des informations scientifiques ou juridiques dans les brevets, afin de faciliter la réalisation de leurs projets. Celle-ci est réalisée selon le même protocole que celui décrit dans cette thèse. MAbWatch est une newsletter hebdomadaire compilant des informations stratégiques sur les anticorps thérapeutiques commercialisés et en développement, qui se veut être un complément de la bibliographie des chercheurs. La base TAD (*Therapeutic Antibody Database*) est une base développée depuis plus d'une dizaine d'années, indexant les informations sur les anticorps en développement et commercialisés. Est répertorié un nombre très important d'informations tels la sous-classe et les allotypes de la molécule, l'antigène-cible, la séquence de l'anticorps, les différents noms, la société qui la développe, les essais cliniques, etc...

Durant cette thèse j'ai également pu appréhender des aspects d'encadrement et de management par la prise en charge de plusieurs stagiaires ayant eu des missions diverses :

- Line Scandolari : Janvier – Juin 2014 Master II Biotechnologies et Droit : Développement et optimisation de la newsletter MAbWatch.
- Rémy Rondet : Janvier – Juin 2015 Master II Biotechnologies et Droit : Réalisation d'une cartographie brevets sur les récepteurs couplés aux protéines G pour l'équipe d'Eric Reiter à l'INRA, à partir de notre protocole de recherche
- Antoine Léger : Mars – Août 2015 5^{ème} année de Pharmacie : Réalisation de la newsletter MAbWatch et saisie d'informations dans la base de données IgVarImprove
- Léa Chapon : Novembre 2015 – Mars 2016 5^{ème} année de Pharmacie : Réalisation de la newsletter MAbWatch et mise à jour de la base TAD
- François Brinas : Novembre 2015 – Mars 2016 5^{ème} année de Pharmacie : Rédaction d'un article sur les anticorps et les maladies génétiques, aide à la recherche documentaire

- Sophie Pallado : Mars – Août 2016 5^{ème} année de Pharmacie : Rédaction de la newsletter MAbWatch
- Romane Chastang : Janvier – Juin 2016 Master II Biotechnologies et Droit : Analyse de l'environnement juridique des brevets traitant des modifications dans la partie Fc des anticorps thérapeutiques et rédaction conjointe sur l'article portant sur les dénominations communes internationales
- Christophe Dumet : Janvier 2016 – (...) Master II Biotechnologies et Droit : Analyse des brevets portant sur les modifications dans la partie Fc des IgG2, et poursuite en doctorat sur le sujet de ma thèse.

Table des matières

Table des matières.....	1
Liste des tableaux.....	3
Liste des figures	4
Liste des annexes	8
Liste des abréviations.....	9
Analyse bibliographique	10
<i>De la sérothérapie aux anticorps thérapeutiques modifiés dans leur portion Fc</i>	11
I-Identification et dénomination des immunoglobulines	12
II-Structure, fonctions et expression des immunoglobulines.....	14
III-Structures détaillées des immunoglobulines G.....	18
IV-Propriétés biologiques des immunoglobulines G	30
V-Les anticorps thérapeutiques.....	49
VI-Les variants dans la partie Fc	61
<i>La protection par brevets des anticorps thérapeutiques</i>	72
I-Le brevet d'invention	73
II-Les brevets des anticorps thérapeutiques.....	81
Travail personnel	88
<i>Matériels et Méthodes</i>	89
I-Présentation de la méthode.....	90
II-Définition du Fc et du champ d'inclusion des brevets.....	92
III-Les critères permettant la formulation de la stratégie de recherche	94
IV-Réalisation de requêtes dans la base de données brevets Orbit®	104
V-Analyse macroscopique du corpus de brevets	112
VI-Analyse microscopique du corpus de brevets	113
VII-La base de données IgVarImprove.....	115
VIII-Veille stratégique – Newsletter MAbWatch.....	119
<i>Résultats</i>	123
I-Analyse globale du corpus de brevets.....	124
II-Article 1: <i>Modifications in the IgG4 Fc portion of therapeutics in patents: opportunities for a twisting IgG subclass</i>	132

III-Article 2 : <i>Unexplained abuses of Human IgG subclass denomination in antibody patents</i>	134
IV-Article 3 : <i>Rethinking the INN system for therapeutic antibodies</i>	135
Discussion générale – Perspectives	136
Bibliographie.....	146
Annexes.....	191
Résumé.....	233
Résumé en anglais.....	233

Liste des tableaux

Tableau 1 : Essais cliniques testant la corrélation entre le polymorphisme du FcγRIIIA et la réponse à un anticorps.....	40
Tableau 2 : Résumé des propriétés pharmacologiques des quatre sous-classes d'immunoglobulines G	48
Tableau 3 : Les anticorps commercialisés ou en passe de l'être.....	54
Tableau 4 : Radicaux utilisés dans la conception des dénominations communes internationales	58
Tableau 5 : Les anticorps commercialisés ayant des modifications Fc de glycosylation..	65
Tableau 6 : Les anticorps commercialisés ayant des modifications Fc de domaines.....	67
Tableau 7 : Variants peptidiques d'IgG1 identifiés dans la littérature	69
Tableau 8 : Anticorps commercialisés ayant des modifications peptidiques dans leur Fc	70
Tableau 9 : Les anticorps thérapeutiques pour lesquels des biosimilaires sont en développement.....	86
Tableau 10 : Mots clés identifiés dans la littérature et dans les brevets	98
Tableau 11 : Brevets utilisés pour vérifier et compléter l'exhaustivité du corpus de brevets	99
Tableau 12 : Codes de classification CPC pertinents	103
Tableau 13 : Requêtes mots-clés et champ d'application des requêtes.....	105
Tableau 14 : Requêtes réalisées avec les codes de classification CPC.....	106
Tableau 15 : Nombre de familles de brevets indexées dans le corpus de brevet durant la première salve de requêtes	108
Tableau 16 : Les différents allotypes d'IgG1	196
Tableau 17 : Les allotypes d'IgG2.....	196
Tableau 18 : Les allotypes d'IgG3.....	197
Tableau 19 : Les isoallotypes d'IgG4	197
Tableau 20 : Les allotypes de chaîne légère kappa	197
Tableau 21 : Opérateurs disponibles dans Orbit®	199
Tableau 22 : Troncatures disponibles dans Orbit®	199
Tableau 23 : Description des types de données utilisés dans notre base de données	215

Liste des figures

Figure 1 : Réarrangement des segments de gènes codant les chaînes lourdes des immunoglobulines	15
Figure 2 : Représentation tridimensionnelle du fragment variable d'une IgG	15
Figure 3 : Mécanisme de commutation de classe d'immunoglobuline.....	17
Figure 4 : Représentation schématique d'une IgG en 1968 (A) et 1969 (B)	19
Figure 5 : Première séquence complète d'acides aminés de la chaîne lourde d'une IgG1	20
Figure 6 : Représentation tridimensionnelle d'une IgG1 humaine.....	21
Figure 7 : Configurations classiques des ponts disulfures retrouvés pour les quatre sous-classes d'IgG	21
Figure 8 : Recombinaison des ponts disulfures dans l'IgG2.....	22
Figure 9 : Séquences nucléotidique et protéique d'une IgG4	23
Figure 10 : Représentation tridimensionnelle du pembrolizumab (IgG4 humaine)	24
Figure 11 : Représentation schématique du phénomène d'échange de demi-molécules ..	25
Figure 12 : Représentation tridimensionnelle d'un Fc d'IgG1 glycosylé.....	27
Figure 13 : Représentation schématique de certaines glycoformes liées à l'asparagine en position 297	28
Figure 14 : Cascade de biosynthèse du glycanne à travers le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi.....	29
Figure 15 : Le complexe C1.....	31
Figure 16 : Mise en évidence des acides aminés important pour la liaison au C1q sur la représentation tridimensionnelle d'un Fc d'IgG1	32
Figure 17 : Représentation schématique des FcγR.....	35
Figure 18 : Les zones d'interaction entre les récepteurs Fcγ et la portion Fc d'une IgG ..	38
Figure 19 : Représentation tridimensionnelle du FcRn humain et de ses deux ligands...	44
Figure 20 : Mise en évidence des acides aminés de contact avec le FcRn sur une représentation tridimensionnelle d'un Fc d'IgG1	45
Figure 21 : Représentation schématique du recyclage et de la transcytose des IgG par le FcRn	46
Figure 22 : Représentation schématique de l'humanisation progressive des anticorps thérapeutiques	51

Figure 23 : Représentation schématique des différents formats d’anticorps commercialisés.....	52
Figure 24 : Nombre d’anticorps thérapeutiques et assimilés approuvés par an à l’EMA et à la FDA	52
Figure 25 : Représentation tridimensionnelle d’un modèle d’IgG1 avec son glycanne et les zones d’interaction aux recepteurs	62
Figure 26 : Représentation schématique du glycanne lié à l’asparagine 297 du CH2	63
Figure 27 : Représentation schématique de l’éculizumab.....	66
Figure 28 : Schéma synthétique de la procédure de délivrance en Europe.....	80
Figure 29 : Chiffre d’affaires total des biomédicaments par classe pharmaceutique en Cumul Mobile Annuel (CMA), de 05/2010 à 05/2014.....	82
Figure 30 : Les différentes étapes de la vie d’un médicament, de la recherche à sa commercialisation	82
Figure 31 : Protocole de cartographie brevets mis en place	91
Figure 32 : Digestion de l’IgG à la papaïne	92
Figure 33 : Localisation des sites de clivage des IgG1, 2 et 4 à la papaïne	92
Figure 34 : Représentation schématique d’un code CPC complet : C07K 2316/52.....	101
Figure 35 : Exemple de codes de classification présents dans les résultats d’une requête, et pourcentage de leur présence sur le corpus de résultats	101
Figure 36 : Exemple de résultats après interrogation du portail d’Espacenet avec le mot « antibodies »	102
Figure 37 : Outil de surbrillance d’Orbit et les mots clés associés	107
Figure 38 : Exemple d’utilisation de l’outil de surbrillance dans l’analyse des résultats de requêtes	108
Figure 39 : Mots clés utilisés dans l’outil de surbrillance pour identifier les brevets portant sur des modifications dans la partie Fc d’IgG4.....	111
Figure 40 : Exemple de tableau retrouvé dans la partie « <i>Examples</i> » d’un brevet	113
Figure 41 : Exemple de graphique provenant des « <i>Figures</i> » d’un brevet	113
Figure 42 : Illustration du module de recherche de données.....	118
Figure 43 : Exemple de page proposant un flux RSS, ici provenant du site de la société Abbvie	120
Figure 44 : Présentation de RSS Owl.....	121
Figure 45 : Présentation de l’outil de rédaction de newsletter de Silverpeas.....	122

Figure 46: Nombre de brevets publiés par an traitant de variants Fc d'IgG quelle que soit leur sous-classe, et moyenne du nombre de variants par période	124
Figure 47 : Top 10 des plus gros déposants dans le corpus, avec la part de brevets analysés aujourd'hui.....	125
Figure 48 : Nombre de variants recensés dans les brevets analysés provenant du Top 10 des déposants	126
Figure 49: Nombre de variants par type de modification	126
Figure 50 : Occurrence d'étude de propriétés pharmacologiques	127
Figure 51 : Nombre de variants par position d'acides aminés dans la charnière d'IgG1	128
Figure 52 : Hotspots de variants par position d'acides aminés dans le CH2 d'IgG1	129
Figure 53 : Nombre de variants par position d'acides aminés dans la CH3 d'IgG1	129
Figure 54 : Répartition du nombre de brevets et de variants par société	133
Figure 55 : Illustration du portail de recherche avancée d'Orbit®	198
Figure 56 : Illustration de l'outil de citation de brevets	200
Figure 57 : Icône permettant d'avoir accès à l'outil d'analyse d'Orbit®	201
Figure 58 : Page de base du module d'analyse de brevets d'Orbit®	201
Figure 59 : Exemple d'analyse Orbit® portant sur la répartition des familles de brevets par première années de dépôts	203
Figure 60 : Illustration de l'outil de création de règles	204
Figure 61 : Exportation des données d'analyse et la mise en place de liens web vers l'analyse hébergée par Orbit®	204
Figure 62 : Description des différentes numérotations et des modifications d'acide aminés dans la base spécifique de ce type de mutation dans IgG1.....	207
Figure 63 : Description de l'impact pharmacologique des variants dans la base de données sous Excel	208
Figure 64 : Description des caractéristiques du document brevet	208
Figure 65 : Description de la sous-classe du Fc utilisé et des modifications glycosidiques dans la base spécifique de ce type de mutation	209
Figure 66 : Description de la sous-classe du Fc utilisé et des modifications de domaine dans la base spécifique de ce type de mutation	209
Figure 67 : Représentation de la table Brevet.....	210
Figure 68 : Représentation de la table Variants	210

Figure 69 : Représentation de la table Modifications acides aminés	210
Figure 70 : Représentation de la table Modifications de glycosylation.....	211
Figure 71 : Représentation de la table Modifications de domaine	211
Figure 72 : Représentation de la table Propriétés pharmacologiques	211
Figure 73 : Exemple de relation « (1-n) »	212
Figure 74 : Exemple de relation « (n-n) »	213
Figure 75 : Représentation des trois nouvelles tables.....	213
Figure 76 : Schéma conceptuel de la base de données.....	215
Figure 77 : Outils utilisés pour créer les tables et les relations dans MySQL Workbench	216
Figure 78 : Onglet permettant de rentrer les attributs dans une table.....	216
Figure 79 : Schéma relationnel de la base de données.....	219
Figure 80 : Outil d'exportation de script SQL de MySQL Workbench	219
Figure 81 : Création d'une base de données dans PhpMyAdmin	220
Figure 82 : Page d'importation du fichier SQL conçu grâce à MySQL Workbench	220
Figure 83 : Tables importées après création de la base de données	221
Figure 84 : Outil d'importation de code SQL dans phpMyAdmin	221
Figure 85 : Exemple de tableur Excel permettant l'importation de grandes quantités de données dans la base de données	223

Liste des annexes

Annexe 1 : Alignement des séquences primaires d'acides aminés des CH1 des 4 sous-classes d'immunoglobulines G	192
Annexe 2 : Alignement des séquences primaires d'acides aminés des charnières des 4 sous-classes d'immunoglobulines G	193
Annexe 3 : Alignement des séquences primaires d'acides aminés des CH2 des 4 sous-classes d'immunoglobulines G	194
Annexe 4 : Alignement des séquences primaires d'acides aminés des CH3 des 4 sous-classes d'immunoglobulines G	195
Annexe 5 : Les différents allotypes des chaînes lourdes et légères d'IgG	196
Annexe 6 : Recherche de brevets dans la base de données Orbit®	198
Annexe 7 : IP Business Intelligence	201
Annexe 8 : La base de données sous Microsoft Excel®	206
Annexe 9 : Développement et implémentation de la base de de données en SQL	210
Annexe 10 : Newsletter MAbWatch	225

Liste des abréviations

ADC	Anticorps conjugué à un cytotoxique	GnTIII	β (1,4)-N-acetylglucosaminyltransferase III
ADCC	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps	IgA	Immunoglobuline A
ADCP	Phagocytose cellulaire dépendante des anticorps	IgD	Immunoglobuline D
AMM	Autorisation de mise sur le marché	IgE	Immunoglobuline E
ANSM	Agence nationale de santé du médicament	IgG	Immunoglobuline G
CBE	Convention sur le brevet européen	IgM	Immunoglobuline M
CCP	Certificat complémentaire de protection	INPI	Institut National de la Propriété Intellectuel
CDC	Cytotoxicité cellulaire dépendante du complément	LEEM	Organisation représentant les entreprises du médicament
CDR	<i>Complementarity determining Regions</i>	NS0 et SP2/0	Cellules issues de plasmocytes de souris
CHO	Cellules ovariennes de hamster	OEB	Office européen des brevets
CIB	Classification internationale des brevets	OMPI	Organisation mondiale de la propriété intellectuelle
CPC	Classification coopérative des brevets	OMS	Organisation mondiale de la santé
CPI	Code de la propriété intellectuelle	ONPI	Office national de la propriété industrielle
DCI / INN	Dénomination commune internationale	PEG	Polyéthylène glycol
EMA	Agence européenne des médicaments	PCT	Traité de coopération en matière de brevets
Fab	Fragment de liaison à l'antigène	PHP	Hypertext Preprocessor
Fc	Fragment cristallisable	RSS	<i>Really Simple Syndication</i>
FcRn	Récepteur néonatal à la portion Fc des immunoglobulines G	SGBDR	Systèmes de gestion de bases de données relationnelles
FcγR	Récepteur Fc gamma	SQL	<i>Structured Query Language</i>
FDA	Agence américaine des médicaments	USPTO	Office américain des brevets
FUT8	Fucosyltransferase-8	YB2/0	Cellules d'hybridome de rat

Analyse bibliographique

*De la sérothérapie aux anticorps thérapeutiques modifiés dans leur
portion Fc*

I-Identification et dénomination des immunoglobulines

Les anticorps thérapeutiques tirent leur formidable succès de plus de 100 ans de découvertes et de développements en immunologie. Le premier succès est à mettre à l'actif d'Emil von Behring et Shibasaburo Kitasato, qui décrivent en 1890 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 qui en résulte peut être transféré par le sérum à des animaux naïfs⁶. C'était la première de nombreuses publications montrant que des maladies pouvaient être prévenues ou traitées en utilisant le sérum d'animaux ou d'humains eux-mêmes immunisés. Dès l'année suivante était déjà fait référence au terme « anticorps », ou « Antikörper » en allemand, par Ehrlich pour décrire la capacité d'un agent à discriminer entre deux substances^{7,8}. Un peu plus tard en 1899, Deutsch aborde dans un article rédigé en français la notion de « substance immunogène ou antigènes » et est ainsi le premier à nommer cette substance induisant une production d'anticorps^{8,9}. En 1903, Deutsch et Feistmantel confirment ce terme en le décrivant comme la contraction de « Antisomatogen Immunokörperbildner » ou agent qui induit des anticorps¹⁰. Le terme « Antisomatogen » ayant ainsi donné après contraction « antigène »¹¹. Le terme « immunoglobuline » quant à lui, proposé par Heremans en 1960¹², ne fut adopté définitivement que durant une réunion de l'organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1964, pour désigner les protéines d'origines animales connues pour avoir une activité anticorps¹³. Cette réunion permit de définir les noms génériques à utiliser pour les classes d'immunoglobulines et les différents isotypes de chaînes lourdes. La première chaîne d'immunoglobuline identifiée au cours de l'histoire date d'avant la sérothérapie, puisque la protéine dite de « Bence Jones » fut découverte en 1845 par Henry Bence Jones, dans l'urine de patients ayant un myélome multiple¹⁴. Celle-ci fut identifiée comme la chaîne légère des immunoglobulines seulement 100 plus tard, en 1950, quand Korngold et Lipari l'ont séparée en deux types, connus aujourd'hui comme les chaînes légères Kappa et Lambda¹⁵, tirées des premières lettres de leurs noms^{16,17}.

Les cinq isotypes de chaînes lourdes ont quant à eux été découverts au cours du siècle dernier, grâce aux développements de techniques comme l'électrophorèse¹⁸. En 1939, Tiselius et Kabat ont montré que des anticorps étaient associés avec la fraction gamma du sérum identifiée par électrophorèse^{19,20}. Ce fut le premier isotype de chaîne lourde découvert, appelé γ -globuline, immunoglobuline G ou IgG. Le deuxième isotype fut décrit indépendamment par

Waldenström et Wallenius, grâce à des techniques d'immunoélectrophorèse et d'ultracentrifugation, avec des sérums de patients contenant une protéine de poids moléculaire élevé. Waldenström découvrit ainsi une hémopathie dénommée macroglobulinémie, et la protéine macroglobuline, donnant le nom d'immunoglobuline M ou IgM. Heremans²¹ identifia le troisième isotype en 1959 à partir d'une espèce immunoréactive dans les fractions gamma et beta de l'électrophorèse, dans lesquelles avaient déjà été identifiées les IgG et les IgM, mais qui n'était pas absorbée par des sérums anti-gamma ou anti-macroglobuline. Ces fractions furent d'abord appelées β_{2A} et γ_{1A} , puis α -immunoglobuline, et enfin IgA. En 1964, Rowe et Fahey²² découvrirent une protéine migrant dans la région γ_1 de l'électrophorèse, présente en grande quantité chez certains patients atteints de myélome multiple, mais qui n'était pas réactive avec les anti-sérums spécifiques des autres isotypes. L'IgD était ainsi découverte, et nommée ainsi par élimination, puisque les termes IgA, IgG, et IgM étaient déjà pris, que la lettre C n'avait pas d'équivalent grec (utilisé pour désigner l'isotype de chaîne correspondant), qu'IgB était attendue pour nommer les immunoglobulines murines et que la lettre E était associée aux allergies¹⁷. Bien qu'il était connu depuis des décennies que des allergies pouvaient être transmises par transfert sérique, Ishizaka fut le premier en 1966 à décrire l'IgE^{23,24}. Cette immunoglobuline fut étudiée par injection de pollen, pour lequel il a été possible, via des techniques de séparation biochimique, d'identifier la fraction la plus à même de causer des érythèmes, appelée en rapport antigène E. Avec des techniques similaires à celles employées par Rowe et Fahey, ils conclurent que les anticorps réagissant avec cet antigène étaient une nouvelle immunoglobuline, qu'ils nommèrent IgE.

II-Structure, fonctions et expression des immunoglobulines

Les immunoglobulines doivent reconnaître un nombre très important d'antigènes susceptible de pénétrer dans l'organisme. Pour ce faire, un mécanisme dénommé recombinaison VDJ permet d'obtenir une grande diversité de domaines variables (**Figure 1**). Celle-ci s'effectue pour les gènes codant les régions variables des chaînes lourdes et légères, organisés en trois segments de gènes dont le premier est le V (pour « Variable »), qui code les 95 premiers acides aminés, dont les deux premières régions déterminant la complémentarité (CDR ou « *Complementarity Determining Regions* », contribuant au paratope, qui fixe l'antigène), les trois premières régions « charpentes » (FR ou « *Framework* »), qui sont des régions stables situées entre les CDR, et la partie N-terminale du CDR3 (**Figure 2A et B**). Le deuxième segment est le D (pour « *Diversity* ») qui code environ 5 acides aminés du CDR3 de la chaîne lourde (il n'y en a pas pour la chaîne légère) (**Figure 2A et B**), et le troisième est le J (pour « *Junction* ») qui code la partie C-terminale du CDR3 et pour le FR4 (**Figure 2A et B**).

A partir d'un jeu de recombinaisons somatiques de l'ADN de la lignée germinale est obtenu un transcrit pour la chaîne lourde comprenant un gène V, un gène D et un gène J ayant la spécificité requise pour l'antigène (**Figure 1**). Le réarrangement des gènes codant la chaîne légère est semblable à la chaîne lourde, mais il n'y a pas de segment de gène D (**Figure 2A et B**). En plus de ces trois domaines, le transcrit est composé également d'un domaine C (pour « Constant ») qui code pour l'isotype de chaîne lourde (**Figure 1**).

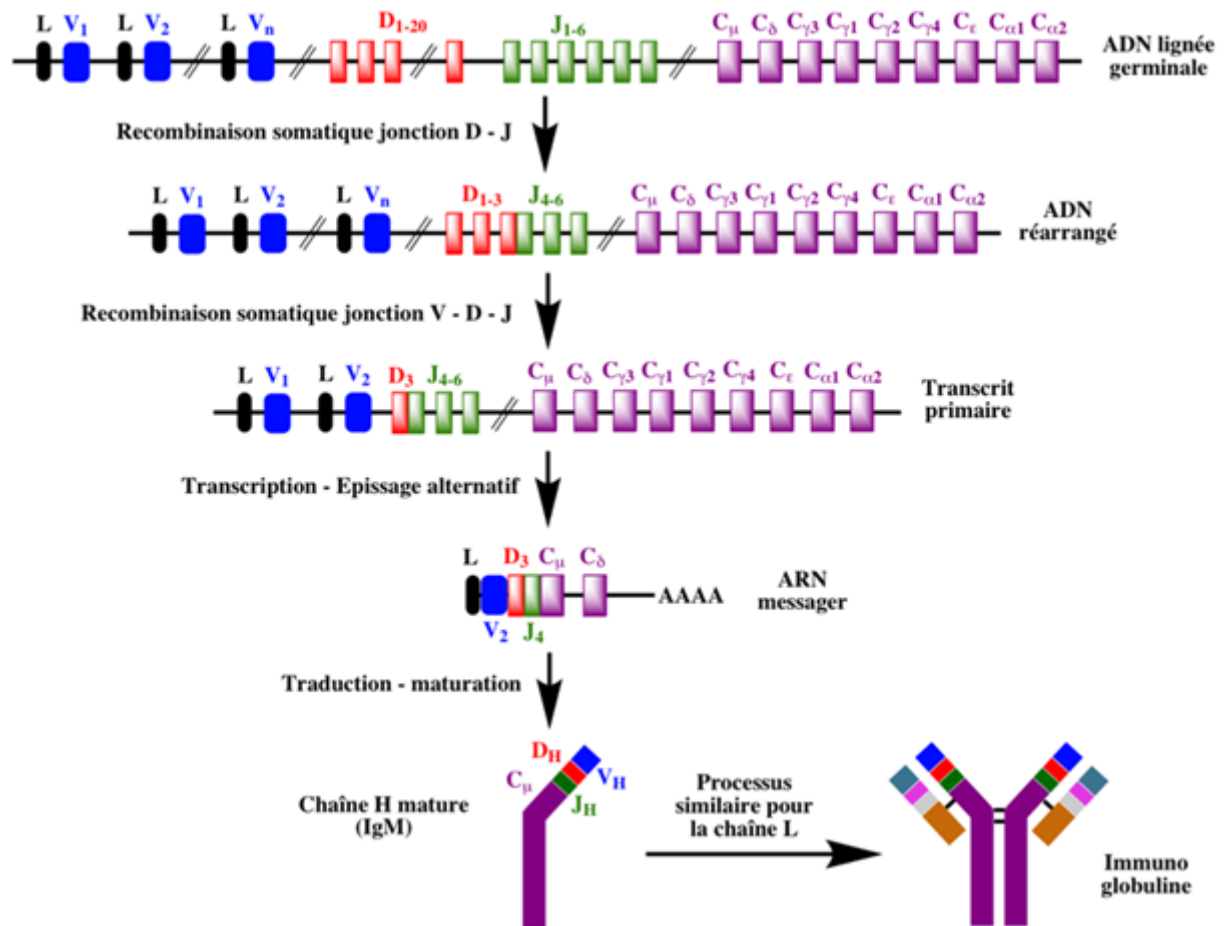


Figure 1 : Réarrangement des segments de gènes codant les chaînes lourdes des immunoglobulines

Les segments V sont indiqués en bleu, les segments D en rouge et les segments J en vert. Les segments C sont en violet. Les segments L en noir correspondent aux séquences de tête qui se trouvent en amont du codon d'initiation de traduction des ARN messagers. Pour les segments C, l'isotype en aval est μ (d'IgM), suivi de δ (IgD), $\gamma 1$ (IgG1), $\gamma 2$ (IgG2), $\gamma 3$ (IgG3), $\gamma 4$ (IgG4), ϵ (IgE), et enfin $\alpha 1$ (IgA1) et $\alpha 2$ (IgA2). Selon E. Jaspard²⁵.

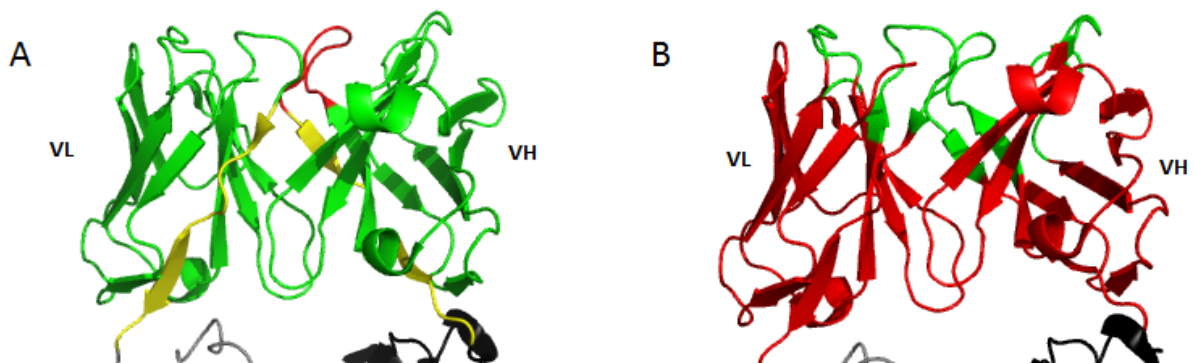


Figure 2 : Représentation tridimensionnelle du fragment variable d'une IgG

A : Représentation des segments codant les domaines variants. Le segment V est représenté en vert, le fragment D en rouge et le fragment J en jaune, selon le code couleur utilisé par l'IMGT²⁶. B : Représentation des régions CDR et framework. Les frameworks sont représentés en rouge et les CDR en vert. Cette figure a été réalisée en utilisant PyMOL Molecular Graphics System, version 1.7.4 (Schrödinger) à partir du fichier PDB : 1YY8²⁷ représentant le fragment Fab du cetuximab, une IgG1 humaine.

L'IgM (isotype de chaîne lourde μ) est la première classe d'anticorps à apparaître lors d'une réponse immunitaire. Cette immunoglobuline est retrouvée de façon assez abondante dans le sérum humain (1 à 2 g/L) et se lie fortement aux pathogènes grâce à sa structure multimérique. Même si elle active bien le complément, elle possède cependant une capacité limitée d'élimination de l'antigène²⁸. Le processus de commutation de classe, où une recombinaison d'ADN permet aux séquences codant le domaine VH d'être rapprochées des gènes codant les autres chaînes lourdes, permet de produire d'autres classes d'anticorps, avec des propriétés diversifiées (**Figure 3**).

Par ce mécanisme de commutation de classe (**Figure 3**), la synthèse d'IgM peut faire place notamment à une synthèse d'IgG, qui est la classe la plus abondante dans le sérum humain normal (8 à 18 g/L)²⁸⁻³². Elle est monomérique, avec un poids moléculaire d'environ 150 kDa, et a une demi-vie d'environ 21 jours, supérieure aux autres classes d'immunoglobulines. Ses capacités effectrices, qui seront détaillées plus loin, sont en général meilleures que celles de l'IgM, et permettent l'élimination de l'antigène. On compte quatre sous-classes d'immunoglobulines G, dénommées suivant l'ordre décroissant de leur concentration dans le sérum IgG1, IgG2, IgG3, IgG4³³, et qui diffèrent légèrement par leurs chaînes lourdes, principalement au niveau de la charnière. Ces sous-classes ont été découvertes en 1964 par Grey et Kunkel³⁴, à l'aide d'immunsérums spécifiques testés sur des immunoglobulines myélomateuses. L'IgG est la classe utilisée en thérapeutique, et sera détaillée davantage dans les parties suivantes.

Les IgA sont des molécules présentes en concentration assez importante dans le sérum humain (3,5 à 4,5 g/L)²⁹⁻³¹, où celle-ci est retrouvée en monomère. La forme dimérique est principalement retrouvée dans les sécrétions (lait, larmes, salive..) où elle est prédominante. Il en existe deux sous-classes, IgA1 et IgA2, se distinguant par leur structure et leur distribution dans l'organisme^{28,35,36}.

Les IgE sont très peu présentes dans le sérum (0.02 à 0.5 mg/L)²⁹⁻³¹. Ces immunoglobulines jouent un rôle dans les mécanismes de défense face aux infections parasitaires, mais sont aussi associées aux hypersensibilités allergiques.

Les IgD sont essentiellement présentes à la surface des lymphocytes B naifs. Leur sécrétion est très faible dans le sérum et (0 à 0,4 g/L)²⁹⁻³¹ et leurs fonctions méconnues³⁷.

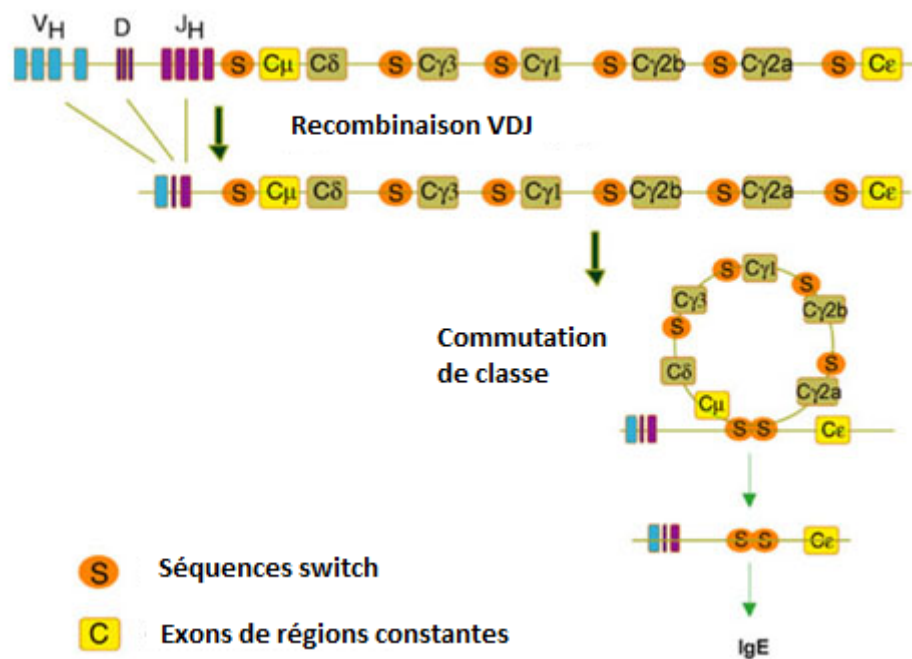


Figure 3 : Mécanisme de commutation de classe d'immunoglobuline

Adapté de The Erik Selsing Lab³⁸. La commutation de classe qui s'opère au cours de la réponse immunitaire est un réarrangement réalisé à l'aide des séquences switch présents en amont de tous les gènes C sauf δ (IgD). Cette commutation de classe s'effectue par une recombinaison au sein du groupe des gènes C , qui excise le gène C exprimé précédemment, et rajoute un gène différent (présent en aval sur la séquence germinale, qui est juxtaposée à la séquence de la région variable assemblée, permettant de garder une spécificité antigénique inchangée²⁸. Ici, l'IgM laisse place à une IgE.

III-Structures détaillées des immunoglobulines G

① Structure primaire des IgG

En 1959, Edelman³⁹ et Porter⁴⁰ étudient la structure de l'immunoglobuline G par différentes méthodes de clivage. Le premier travaille sur la réduction des ponts disulfures en conditions dénaturantes, et montre que l'IgG humaine contient des sous-unités reliées par des ponts disulfures. Le second réalise une digestion de l'IgG à la papaïne, montrant trois fractions, dénommées I, II, et III. Les deux premières lient l'antigène et seront appelées fragments de liaison à l'antigène, « *Fragment antigen-binding* », ou Fab, et la troisième est cristallisable, et sera appelée « Fragment cristallisable » ou Fc. L'année suivante, Nisonoff *et al.* confirment les découvertes de Porter par digestion à la pepsine, montrant l'obtention d'un fragment bivalent $F(ab')_2$. Ce fragment peut être séparé en deux par réduction, donnant deux fragments analogues à des Fab^{41,42}. En 1962, Edelman et Benacerraf⁴³ montrent qu'une immunoglobuline est formée de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères, reliées par des ponts disulfures. En 1965, Hilschmann et Craig⁴⁴ montrent que les chaînes légères contiennent des domaines constants et variables. La même année, Feinstein et Rowe⁴⁵ montrent par microscopie électronique la présence d'une « charnière » (« hinge ») entre les deux Fab, contenant des ponts disulfures, et conférant une certaine flexibilité à la molécule. En 1968, l'équipe d'Edelman localise pour la première fois les ponts disulfures inter-chaînes⁴⁶. Tous ces travaux ouvrent la porte la même année à la réalisation du premier modèle pertinent d'IgG⁴⁷, par Edelman et son équipe (**Figure 4A**).

La première structure primaire entière d'une immunoglobuline G est caractérisée par Edelman en 1969⁴⁸. La séquence établie est celle d'une protéine de myélome nommée Eu, correspondant à une chaîne lourde d'isotype $\gamma 1$. Les séquences des chaînes lourdes (**Figure 5**) et légères d'IgG1 sont ainsi présentes et numérotées, selon une numérotation qui sera finalement appelée Eu, et qui reste aujourd'hui la plus utilisée. C'est également celle que nous utiliserons dans ce manuscrit, pour des raisons qui seront explicitées plus loin.

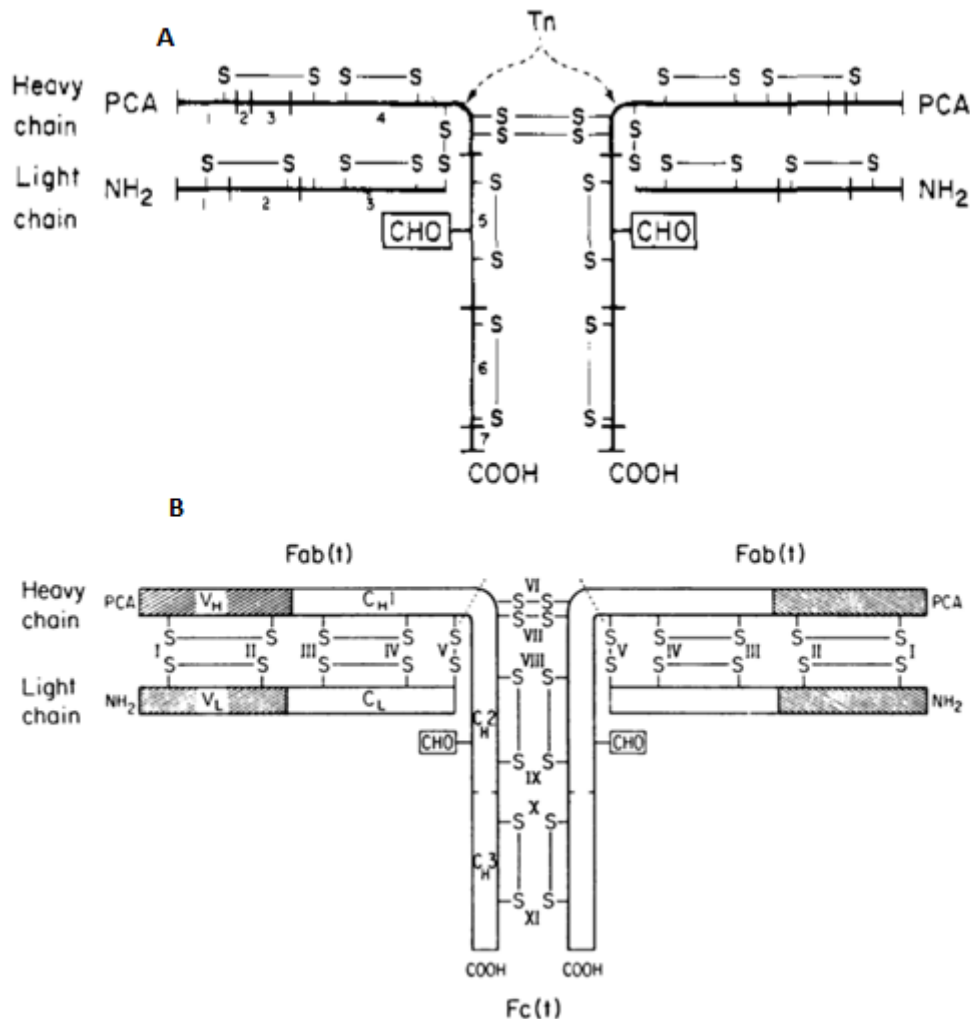


Figure 4 : Représentation schématique d'une IgG en 1968 (A) et 1969 (B)

A : Représentation schématique de l'immunoglobuline Eu, selon Waxdal *et al.*⁴⁷. Les divisions verticales dans chaque chaîne montrent les positions des méthionines clivées par le traitement au bromure de cyanogène (CNBr). La longueur relative des lignes entre les barres verticales est proportionnelle au poids moléculaire de chaque fragment obtenu par CNBr. Les numéros sous les lignes indiquent les différents fragments ; CHO : carbohydrate ; PCA : extrémité N-terminale de la chaîne lourde ; Tn : sites de protéolyse de la chaîne lourde à la trypsine ; B : Représentation schématique de l'IgG1 Eu, selon Edelman⁴⁹. Les chiffres romains indiquent les ponts disulfures ; CHO : carbohydrate ; PCA : extrémité N-terminale de la chaîne lourde ; Fab et Fc représentent les fragments obtenus par digestion à la trypsine, qui clive la chaîne lourde comme indiqué par les lignes pointillées au niveau de la charnière.

Ce papier introduit également l'hypothèse de l'existence de domaines immunoglobuliniques, fondées sur l'homologie de séquence entre les domaines CL, CH1, CH2 et CH3⁴⁹. En effet, le schéma de 1968 (Figure 4A) est actualisé (Figure 4B) et fait apparaître les termes Fab et Fc, ainsi que les noms des domaines immunoglobuliniques, pour la chaîne légère (VH-VL) et pour la chaîne lourde (VH-CH1-CH2-CH3). Seule la charnière n'est pas abordée, et semble incluse dans

le CH2 (**Figure 4B**). Ce concept de domaine immunoglobulinique fut confirmé un peu plus tard par cristallographie à rayons X d'IgG entières ou de Fab^{50,51}, montrant la similitude structurale de ces domaines. Un domaine immunoglobulinique est donc composé d'une centaine d'acides aminés organisés en deux feuillets β antiparallèles sur 2 plans (structure dite en « sandwich »), maintenus entre eux par un pont disulfure intra-domaine²⁶. Cette définition a notamment permis à IMGT de mettre au point une numérotation propre au domaine immunoglobulinique⁵², dont l'utilisation s'avère compliquée dans le cas de la chaîne lourde, car elle recommence à 1 pour chaque domaine.

```

1  PCA - VAL - GLN - LEU - VAL - GLN - SER - GLY - ALA - GLU - VAL - LYS - LYS - PRO - GLY - SER - SER - VAL - LYS - VAL -
10  SER - CYS - LYS - ALA - SER - GLY - GLY - THR - PHE - SER - ARG - SER - ALA - ILE - ILE - TRP - VAL - ARG - GLN - ALA -
20  PRO - GLY - GLN - GLY - LEU - GLU - TRP - MET - GLY - GLY - ILE - VAL - PRO - MET - PHE - GLY - PRO - PRO - ASN - THR -
30  ALA - GLN - LYS - PHE - GLN - GLY - ARG - VAL - THR - ILE - THR - ALA - ASP - GLU - SER - THR - ASN - THR - ALA - TYR -
40  MET - GLU - LEU - SER - SER - LEU - ARG - SER - GLU - ASP - THR - ALA - PHE - TYR - PHE - CYS - ALA - GLY - GLY - TYR -
50  GLY - ILE - TYR - SER - PRO - GLU - GLU - TYR - ASN - GLY - GLY - LEU - VAL - THR - VAL - SER - SER - ALA - SER - THR -
60  LYS - GLY - PRO - SER - VAL - PHE - PRO - LEU - ALA - PRO - SER - SER - LYS - SER - THR - SER - GLY - GLY - THR - ALA -
70  ALA - LEU - GLY - CYS - LEU - VAL - LYS - ASP - TYR - PHE - PRO - GLU - PRO - VAL - THR - VAL - SER - TRP - ASN - SER -
80  GLY - ALA - LEU - THR - SER - GLY - VAL - HIS - THR - PHE - PRO - ALA - VAL - LEU - GLN - SER - SER - GLY - LEU - TYR -
90  SER - LEU - SER - SER - VAL - VAL - THR - VAL - PRO - SER - SER - SER - LEU - GLY - THR - GLN - THR - TYR - ILE - CYS -
100  ASN - VAL - ASN - HIS - LYS - PRO - SER - ASN - THR - LYS - VAL - ASP - LYS - ARG - VAL - GLU - PRO - LYS - SER - CYS -
110  ASP - LYS - THR - HIS - THR - CYS - PRO - PRO - CYS - PRO - ALA - PRO - GLU - LEU - LEU - GLY - GLY - PRO - SER - VAL -
120  PHE - LEU - PHE - PRO - PRO - LYS - PRO - LYS - ASP - THR - LEU - MET - ILE - SER - ARG - THR - PRO - GLU - VAL - THR -
130  CYS - VAL - VAL - VAL - ASP - VAL - SER - HIS - GLU - ASP - PRO - GLN - VAL - LYS - PHE - ASN - TRP - TYR - VAL - ASP -
140  GLY - VAL - GLN - VAL - HIS - ASN - ALA - LYS - THR - LYS - PRO - ARG - GLU - GLN - GLN - TYR - ASX - SER - THR - THR -
150  ARG - VAL - VAL - SER - VAL - LEU - THR - VAL - LEU - HIS - GLN - ASN - TRP - LEU - ASP - GLY - LYS - GLU - TYR - LYS -
160  CYS - LYS - VAL - SER - ASN - LYS - ALA - LEU - PRO - ALA - PRO - ILE - GLU - LYS - THR - ILE - SER - LYS - ALA - LYS -
170  GLY - GLN - PRO - ARG - GLU - PRO - GLN - VAL - TYR - THR - LEU - PRO - PRO - SER - ARG - GLU - GLU - MET - THR - LYS -
180  ASN - GLN - VAL - SER - LEU - THR - CYS - LEU - VAL - LYS - GLY - PHE - TYR - PRO - SER - ASP - ILE - ALA - VAL - GLU -
190  TRP - GLU - SER - ASN - ASP - GLY - GLU - PRO - GLU - ASN - TYR - LYS - THR - THR - PRO - PRO - VAL - LEU - ASP - SER -
200  ASP - GLY - SER - PHE - PHE - LEU - TYR - SER - LYS - LEU - THR - VAL - ASP - LYS - SER - ARG - TRP - GLN - GLU - GLY -
210  ASN - VAL - PHE - SER - CYS - SER - VAL - MET - HIS - GLU - ALA - LEU - HIS - ASN - HIS - TYR - THR - GLN - LYS - SER -
220  LEU - SER - LEU - SER - PRO - GLY

```

L'IgG1 est la plus présente des IgG dans le sérum humain (7,1 g/L)^{53,54}. Elle intervient naturellement dans la réponse à des antigènes protéiques, souvent accompagnées par des IgG3 et des IgG4⁵⁵. Elle est composée de deux chaînes légères (κ ou λ) et de deux chaînes lourdes $\gamma 1$, formant une molécule de 150 kDa (**Figure 6**), grâce à des ponts disulfures inter-chaînes (**Figure 7**).

Figure 5 : Première séquence complète d'acides aminés de la chaîne lourde d'une IgG1

Selon Edelman⁴⁹. Les résidus méthionines sont soulignés et les cystéines encadrées.

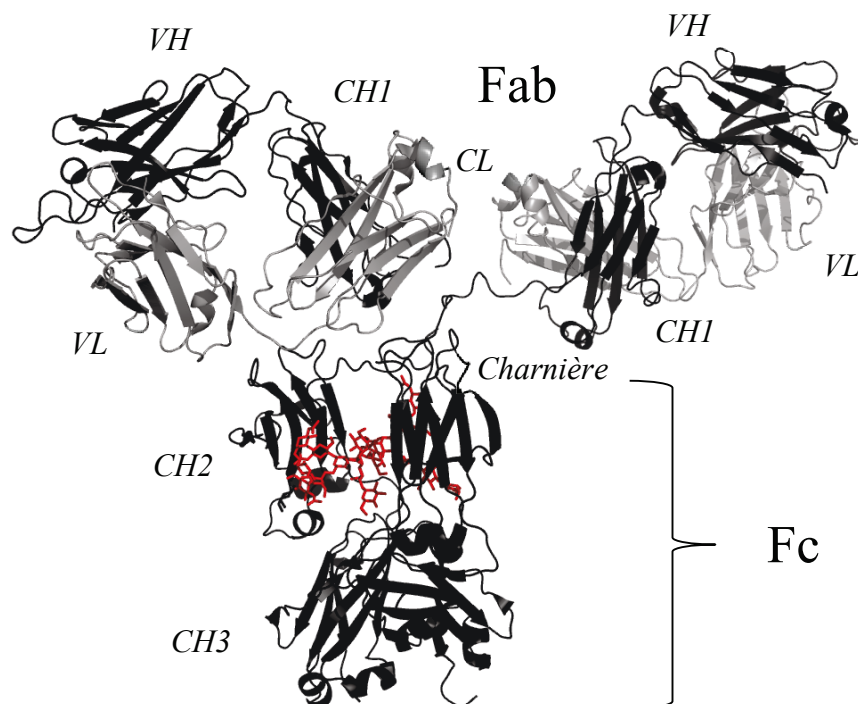


Figure 6 : Représentation tridimensionnelle d'une IgG1 humaine

Les chaînes lourdes sont en noir, les chaînes légères en gris. Le Fab est composé des domaines de fixation à l'antigène, VH sur la chaîne lourde, VL sur la chaîne légère, et de deux domaines constants, CH1 sur la chaîne lourde, et CL sur la chaîne légère. La portion Fc est composée selon notre définition du reste des domaines constants (CH2-CH3), et de la région charnière. Elle porte les propriétés effectrices et de demi-vie de la molécule. Le glycanne est indiqué en rouge. Cette figure a été réalisée en utilisant PyMOL Molecular Graphics System, version 1.7.4 (Schrödinger) à partir du fichier PDB : 1HZH⁵⁶ représentant l'unique IgG1 humaine cristallisée, nommée B12 et ciblant le VIH.

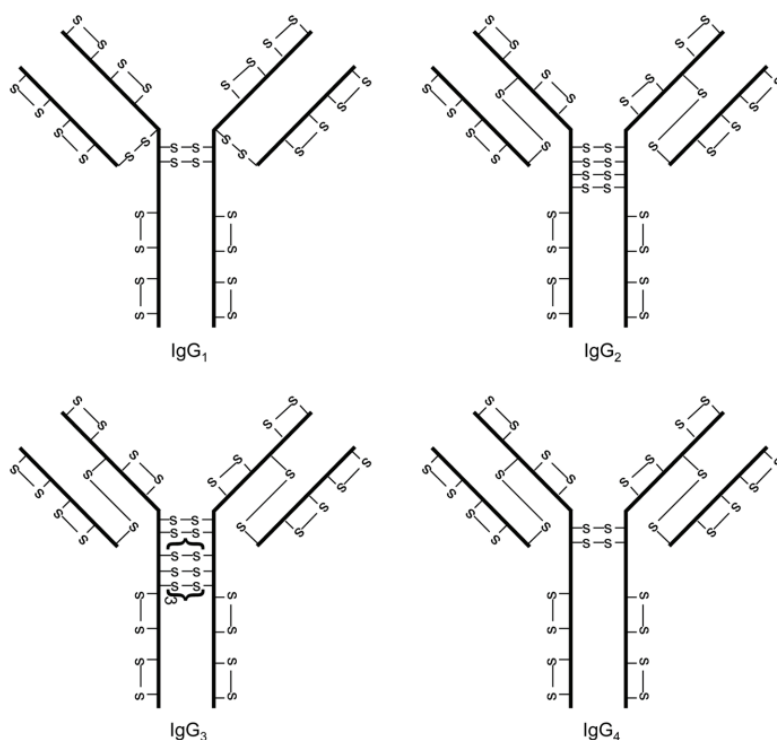


Figure 7 : Configurations classiques des ponts disulfures retrouvés pour les quatre sous-classes d'IgG

La charnière d'IgG1 est composée de 15 acides aminés, dont trois cystéines formant trois ponts disulfures, deux reliant les deux chaînes lourdes, et un autre se liant avec la chaîne légère⁴⁶. Ceci confère une flexibilité modérée de la molécule, inférieure à IgG3 mais supérieure à IgG2 et IgG4⁵⁷. Les quatre ponts disulfures d'IgG2 dans la charnière sont inter-chaînes lourdes, puisque les ponts disulfures avec les chaînes légères sont faits avec une cystéine présente dans le CH1⁵⁸ (position 131), remplacée par une sérine chez l'IgG1 (Annexe 1). Cette richesse en ponts disulfures inter-chaînes lourdes renforce la solidité de la molécule et notamment sa résistance à la dégradation par des enzymes protéolytiques⁵⁹. Ce nombre important de ponts

disulfures, ainsi que le faible nombre d'acides aminés dans la charnière et la richesse de cette région en proline

réduit la flexibilité de la molécule, qui est la plus faible parmi les quatre sous-classes⁵⁷. La charnière d'IgG4 contient deux cystéines, aux positions 226 et 229, qui relient les deux chaînes lourdes. Comme pour IgG2, la liaison avec la chaîne légère s'opère par une cystéine présente dans le CH1⁵⁸, en position 131. La charnière d'IgG3 est plus longue, et contient 62 acides aminés au lieu de 15 pour IgG1 ou 12 pour IgG2 et IgG4. On compte parmi ceux-ci 21 prolines et 11 cystéines, conférant à la charnière une flexibilité modérée^{60,61}, mais la longueur de celle-ci éloigne les Fabs du Fc, et donne ainsi à la molécule une flexibilité totale supérieure à celle des autres immunoglobulines G⁵⁷. Selon Liu et al.⁶²

Le deuxième isotype de chaîne lourde dont la structure primaire entière a été décrite est la γ_2 , en 1980⁶³. L'IgG2 est la deuxième sous-classe d'anticorps la plus retrouvée dans le sérum (3,8 g/L)^{54,64} et lie plus volontiers les antigènes glycaniques microbiens⁶⁵⁻⁶⁷. C'est une protéine comme l'IgG1 d'environ 150 kDa, qui diffère de celle-ci par 9 acides aminés dans le CH1, 6 dans la charnière dont 3 délétions, 10 dans le CH2 dont 1 délétion, et 3 dans le CH3 (Annexes 1-4). La charnière de l'IgG2 est ainsi plus courte, malgré une plus grande quantité de ponts disulfures, au nombre de quatre (**Figure 7**). La configuration des ponts disulfures présents dans la charnière d'IgG2 n'est pas figée. Des recombinaisons entre les ceux-ci ont été identifiées, propres à la présence d'une chaîne légère kappa, donnant différent arrangement de ceux-ci⁶² (**Figure 7**). Ces différentes formes ont un impact sur la résistance de l'IgG2 aux protéases, mais ne semblent cependant pas agir sur la liaison au FcRn, aux récepteurs Fc γ ou au C1q⁶⁸. De plus, l'IgG2 a également été identifiée comme formant des dimères⁶⁹. Aucune structure cristallographique complète d'une IgG2 n'est décrite.

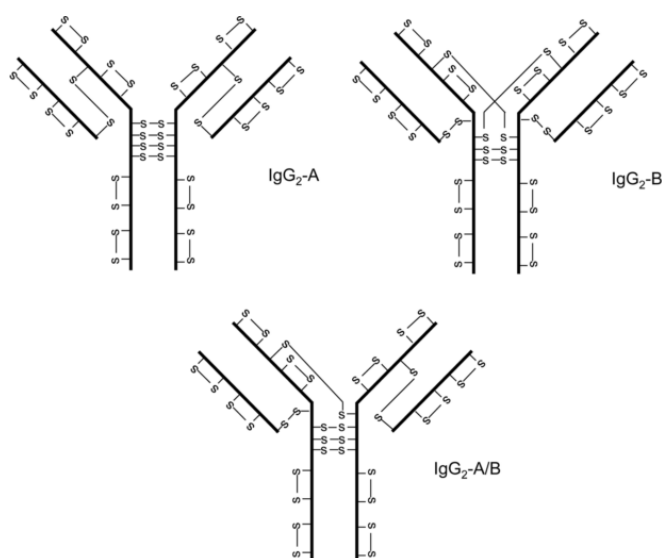


Figure 8 : Recombinaison des ponts disulfures dans l'IgG2

Les formes majeures sont la forme classique décrite précédemment avec quatre ponts disulfures inter-chaîne lourdes, dite A, et la forme B, pour laquelle la première cystéine (C219) forme un pont disulfure avec la chaîne légère, alors que la C131 forme un pont disulfure avec la deuxième cystéine (C220) de la charnière. Ces isoformes de chaînes lourdes se forment indépendamment l'une de l'autre, et peuvent ainsi donner des configurations hybrides A/B, ou des formes encore plus complexes^{62,70-72}. Selon Liu et al.⁶².

La séquence peptidique complète du troisième isotype de chaîne lourde découvert est le γ_4 , en 1981 par Ellison et al.⁷³, complétant la description partielle en 1970 par Pink et al.⁷⁴ Cette sous-classe est la moins présente dans le sérum (0,6 g/L), et est retrouvée naturellement après

une stimulation antigénique répétée, comme pour certains allergènes, avec les IgG1 et les IgE. Elle peut même devenir la sous-classe dominante⁷⁵⁻⁷⁸, par exemple durant l'immunisation prolongée des apiculteurs, où la commutation s'opère entre le IgG4 et IgG1, donnant lieu à une réponse anticorps dominée par les IgG4⁷⁹. C'est une protéine comme l'IgG1 d'environ 150 kDa, qui diffère de celle-ci par 30 acides aminés dans les domaines constants (Figure 9 et Annexe 1-Annexe 4) et par une charnière de 12 acides aminés, aussi courte que celle de l'IgG2 (Figure 7). La première structure cristallographique d'une IgG4 entière a été récemment révélée⁸⁰ à partir du pembrolizumab, un anticorps thérapeutique IgG4 comprenant une mutation dans la charnière en position 228, où la sérine est remplacée par une proline (Figure 10).

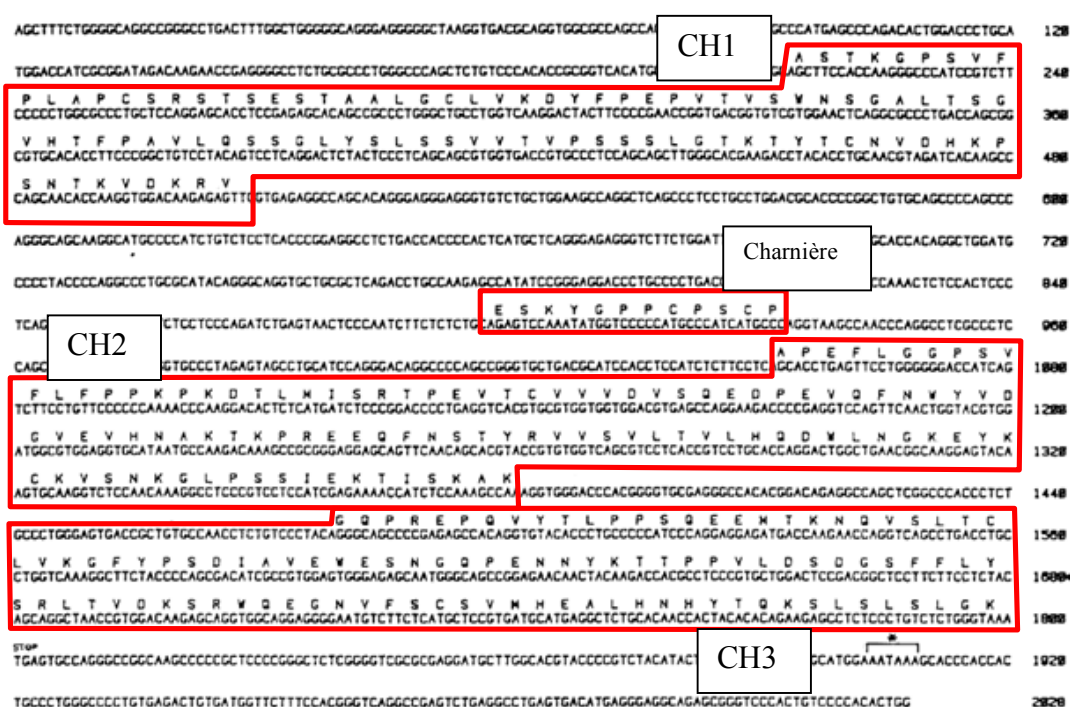


Figure 9 : Séquences nucléotidique et protéique d'une IgG4

La séquence d'IgG4 diffère de l'IgG1 par 8 acides aminés dans le CH1, 9 dans la charnière dont trois délétions, 7 dans le CH2 et 6 dans le CH3 (Annexes 1-4). Cette figure montre que chaque domaine/région équivaut à un exon (Encadrés rouge). Selon Ellison et al.⁷³

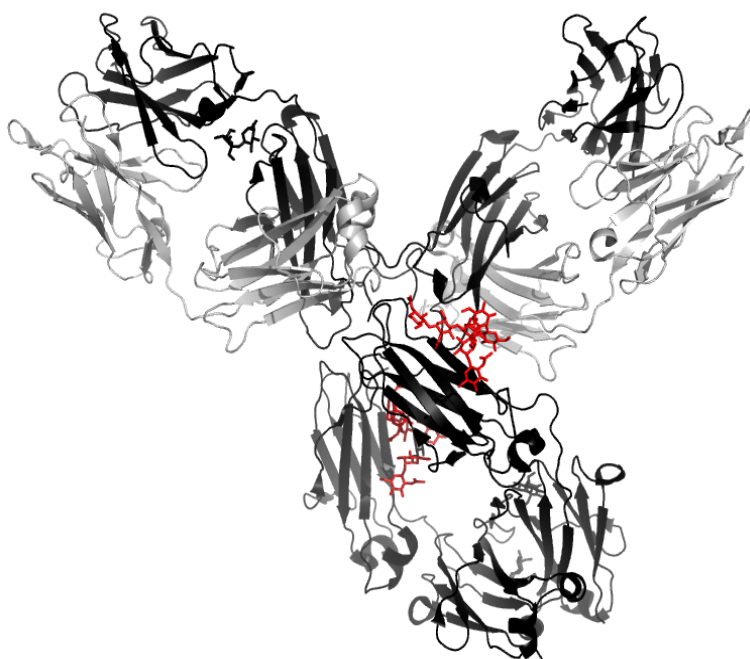
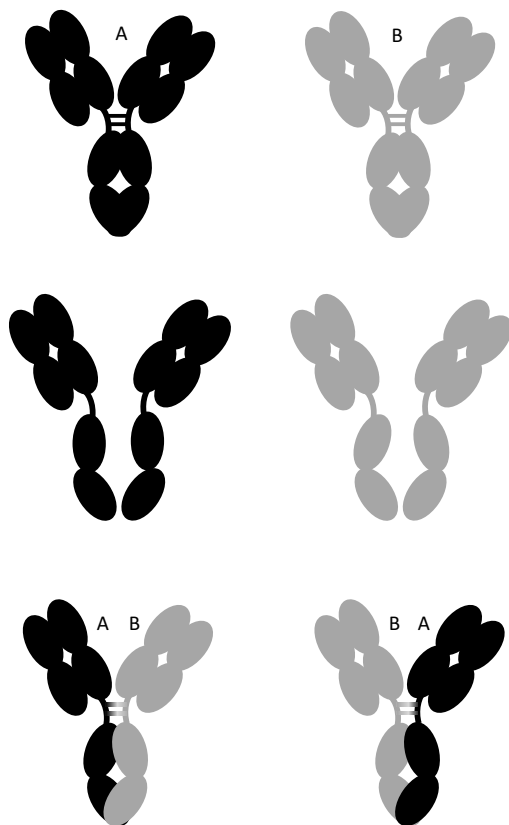


Figure 10 : Représentation tridimensionnelle du pembrolizumab (IgG4 humaine)

Les chaînes lourdes sont en noir et les chaînes légères en gris. Le glycanne est indiqué en rouge. Cette structure montre une rotation d'un domaine CH2 d'environ 120° (**Figure 8**), exposant le glycanne présent sur l'asparagine 297 aux solvants. Cette particularité ne semble pas être un artefact de cristallisation, mais plutôt provenir de contraintes spatiales en lien avec la courte charnière d'IgG4. Ces contraintes spatiales semblent également jouer un rôle dans la flexibilité modérée de l'IgG4, inférieure à l'IgG1 mais supérieure à celle de l'IgG2⁵⁷. Cette figure a été réalisée en utilisant PyMOL Molecular Graphics System, version 1.7.4 (Schrödinger) à partir du fichier PDB : 5DK3⁸⁰.

L'IgG4 a également une propriété unique pour une sous-classe humaine, qui est de se séparer en deux « héli-molécules » (**Figure 12**). Cette découverte a débuté avec la caractérisation en 1986 de l'incapacité de l'IgG4 de ponter deux antigènes et de former des complexes immuns⁸¹. Elle s'est poursuivie au début des années 90 par l'identification de sa tendance à former des héli-molécules composées d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère en conditions dénaturantes non-réductrices^{82,83}. Cette caractéristique a été attribuée à la charnière d'IgG4, et particulièrement aux deux ponts disulfures inter-chaînes lourdes, qui ont tendance à se dissocier⁸²⁻⁸⁴ et à se réassocier en ponts disulfures intra-chaînes⁸⁵. L'incorporation d'une charnière d'IgG4 dans une IgG3 montrait également le phénomène de formation d'héli-molécules, et le contraire une stabilisation de l'IgG4⁸². Seulement montré *in vitro* à cette époque, l'existence de ce phénomène suggère que l'IgG4 normale est bispécifique⁸⁶, par un phénomène d'échange d'héli-molécules. *In vivo*, quand des souris reçoivent une administration de deux IgG4 humaines avec des spécificités différentes, des bispécifiques composés d'une combinaison d'une héli-molécule (chaîne lourde + chaîne légère) de chaque anticorps sont retrouvés dans leur sérum⁸⁷. Finalement, il est apparu que le CH3 jouait également un rôle dans ce phénomène, l'introduction d'un CH3 d'IgG4 dans une IgG1 entraînant la formation de bispécifiques⁸⁷. Cette caractéristique des IgG4 chez l'homme ne semble cependant pas poser problème *in vivo*, puisqu'aucun effet secondaire n'a été corrélé à

ce phénomène pour le natalizumab, une IgG4 thérapeutique commercialisée, qui est connue



pour se séparer en demi-molécules et créer ainsi des bispécifiques avec les IgG4 endogènes du patient⁸⁸.

La raison de ce phénomène est encore assez obscure, mais celui-ci est conservé dans différentes espèces comme le macaque rhésus, pour lequel le phénomène est également relié à la charnière et au domaine CH3⁸⁹.

Figure 11 : Représentation schématique du phénomène d'échange de demi-molécules

L'anticorps A et l'anticorps B se désolidarisent et finissent par se réassembler en anticorps bispécifiques.

La structure primaire de l'isotype de chaîne lourde $\gamma 3$ est définie de façon complète en 1986 par *Huck et al.*⁹⁰ Cette immunoglobuline est la troisième la

plus présente dans le sérum, et a un très fort potentiel pro-inflammatoire, guidé par des fonctions effectrices très importantes, qui seront discutées dans les paragraphes suivants. L'IgG3 est la première à apparaître en cas d'infection, suivie par les IgG1⁵⁵ (Figure 3). C'est une protéine de taille supérieure aux trois autres IgG, puisqu'elle fait environ 170 kDa, en raison d'une charnière quatre fois plus longue (Figure 7). Cette longue charnière est le résultat d'une double duplication de l'exon charnière la codant, présent 4 fois pour l'IgG3. L'un des exons est systématiquement trouvé chez tous les individus, alors que le second est présent de un à trois fois selon les allotypes (voir paragraphe suivant) (Annexe 2). L'IgG3 diffère également de l'IgG1 par 4 acides aminés dans le CH1, 4 dans le CH2, et 8 dans le CH3 (Annexe 1-Annexe 4).

② Allotypes

En plus des variations entre les séquences des différentes sous-classes d'IgG (variations isotypiques) (Annexes 1-4), sont également reconnues des variations alléliques (polymorphismes génétiques) ou « allotypes », qui sont des variations peptidiques naturelles entre individus et groupes ethniques. Ces allotypes ont été découverts et décrits chez l'homme

en utilisant des réactifs sérologiques humains⁹¹, ce qui suppose leur immunogénicité par allo-immunisation. Si le déterminant allotypique sur un isotype de chaîne lourde existe dans un autre isotype, et qu'il n'est donc pas immunogénique, on parle « d'isoallotype ». Qu'il s'agisse d'allotype ou d'isoallotype, ces variants existent naturellement et peuvent montrer des variations dans leurs propriétés biologiques, notamment au niveau de la liaison au FcRn, pour laquelle une publication de notre équipe a montré que celle-ci différait en fonction des allotypes d'IgG1⁹², ou encore en terme d'activité ADCC⁹³ (la liaison au FcRn et l'activité ADCC seront définis plus tard).

On trouve des allotypes pour les quatre isotypes de chaînes lourdes ainsi que pour l'isotype kappa de chaîne légère (**Annexe 5**). La chaîne lambda n'a pas d'allotype défini sérologiquement.

③ Glycosylation

Les immunoglobulines G sont des glycoprotéines portant systématiquement un site de *N*-glycosylation sur l'asparagine 297, lié à la présence d'un motif « asparagine – X – serine / thréonine ». D'autres peuvent également être présents dans les domaines variables (10 à 15 % d'immunoglobulines), agissant ou non sur la liaison à l'antigène⁹⁴. Le glycanne en 297 est positionné classiquement vers l'intérieur du Fc, entre les CH2 (**Figure 12**), proche de plusieurs acide-aminés avec lesquels il interagit par des liaisons non-covalentes dominées par des interactions hydrophobes et électrostatiques^{95,96}.

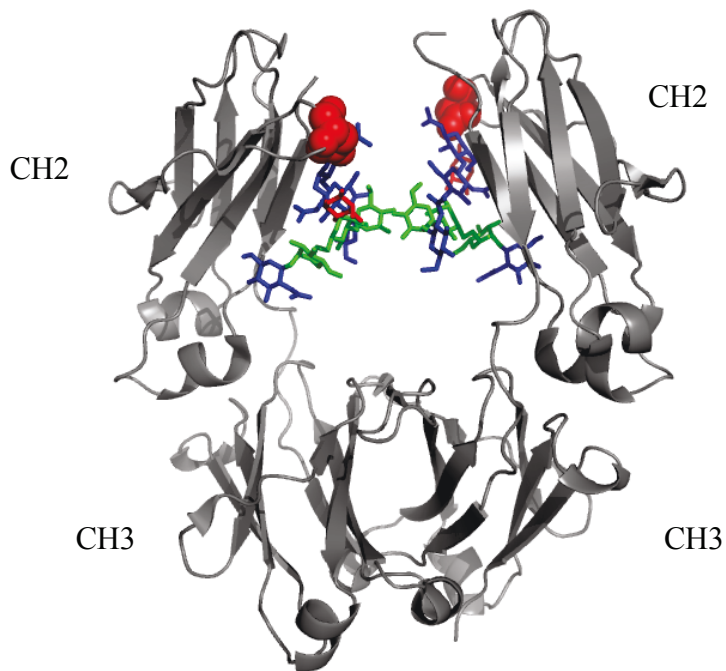


Figure 12 : Représentation tridimensionnelle d'un Fc d'IgG1 glycosylé

Le Fc est représenté en gris. L'asparagine 297 est représentée en sphère rouge sur chaque chaîne lourde, liée à son glycanne en configuration G0F (**Figure 13**). Les GlcNAc sont représentés en bleu, les mannoses en vert et le fucose en rouge. Cette figure a été réalisée en utilisant PyMOL Molecular Graphics System, version 1.7.4 (Schrödinger)⁹⁶ à partir du fichier PDB : 3AVE⁹⁶.

La configuration conservée du glycanne est composée de deux résidus *N*-acétylglucosaminyles

(GlcNAc), liés à 3 mannoses (Man) formant la racine de deux « antennes », sur chacune desquelles sont liés des résidus GlcNAc (Forme G0 sur la **Figure 13**). Des oses supplémentaires peuvent ensuite être ajoutés dans l'appareil de Golgi, en fonction de la machinerie de glycosylation de la cellule qui synthétise l'IgG (plasmocyte ou cellule usine) (**Figure 13-Figure 14**). On peut ainsi trouver sur chacune des deux antennes des β -galactosyles (Gal), sur lesquelles peuvent se lier des acides sialiques (SA). Sur le premier GlcNAc, relié à l'asparagine, un α -fucosyle (Fuc) peut aussi venir se lier. Un GlcNAc peut enfin se fixer sur le premier mannose. Il est dit « bissecteur », car il se trouve entre les deux antennes du glycanne.

Ce glycanne présente en réalité une hétérogénéité considérable, avec plusieurs centaines de glycoformes possibles, lié à l'appareillage des glycannes sur la chaîne lourde de l'immunoglobuline durant son parcours^{97,98}, où il trouve sa configuration finale dans le Golgi, suivant un processus qui débute dans le réticulum endoplasmique (**Figure 14**). Dans ces organites cellulaires, un étagement des glycosyltransférases se met en place, et selon l'équipement enzymatique de la cellule, une compétition entre celles-ci peut avoir lieu, donnant des glycoformes différentes (**Figure 13**).

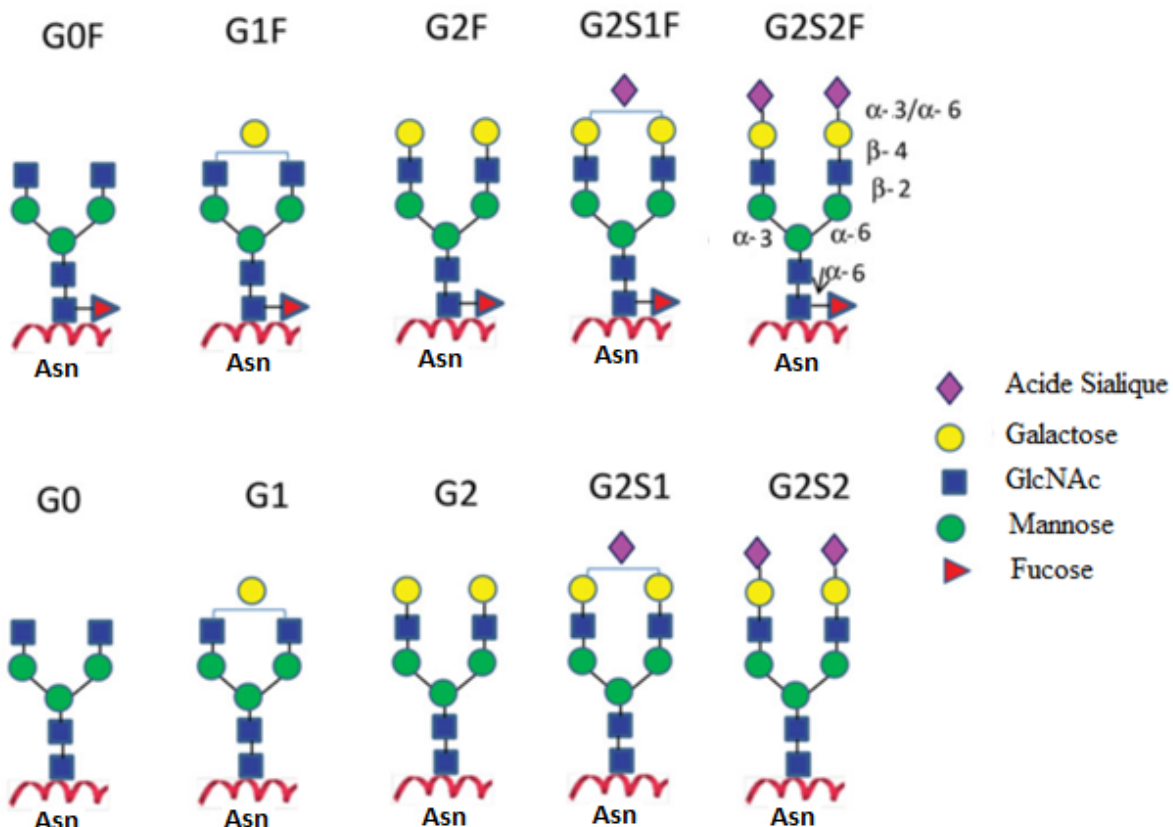


Figure 13 : Représentation schématique de certaines glycoformes liées à l'asparagine en position 297

Adapté de Liu *et al.*⁹⁹. Les formes G0 indiquent qu'aucun galactose n'est présent. G1/G2 indiquent la présence respectivement d'un ou deux galactoses sur le glycanne. La lettre F indique la présence d'un fucose. Enfin, la lettre S indique la présence d'un (S1) ou deux (S2) acides sialiques.

Dans le sérum humain, on trouve principalement des IgG ayant des glycanes de type biantenné (86 %), comprenant environ 25 % d'agalactosylés, 35 % de monogalactosylés, 20 % de digalactosylés (G2), et 20 % de sialylés. De plus, 30 % des glycanes ont un GlcNAc bissecteur attaché au premier mannose, et entre 80 et 92 % sont fucosylés^{97,100-102}. Ces proportions sont altérées dans certaines maladies comme la polyarthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn¹⁰³.

Les deux glycanes des chaînes lourdes interagissent et maintiennent la conformation du Fc. Ainsi, suivant la glycosylation de ce Fc, s'opèrent des modifications de sa conformation, notamment dans l'ouverture et l'orientation des CH2. Le retrait graduel des résidus osidiques de ce glycanne réduit l'espace entre les deux CH2, sans affecter le CH3^{95,104,105}. Le retrait des deux GlcNAc biantennés et des trois mannoses diminue encore la distance entre les CH2 et réduit également la température de fusion du Fc, traduisant une diminution de stabilité^{106,107}.

Ces glycoformes impactent également directement ou indirectement les fonctions effectrices en lien avec le Fc, et permettent de moduler les propriétés cytolytiques de la molécule¹⁰³. L'absence de fucose est notamment bien connue pour améliorer les capacités cytolytiques de

IgG^{108,109}. Ceci sera décrit plus en détail dans les parties suivantes traitant des propriétés pharmacologiques des IgG et plus particulièrement des variants Fc.

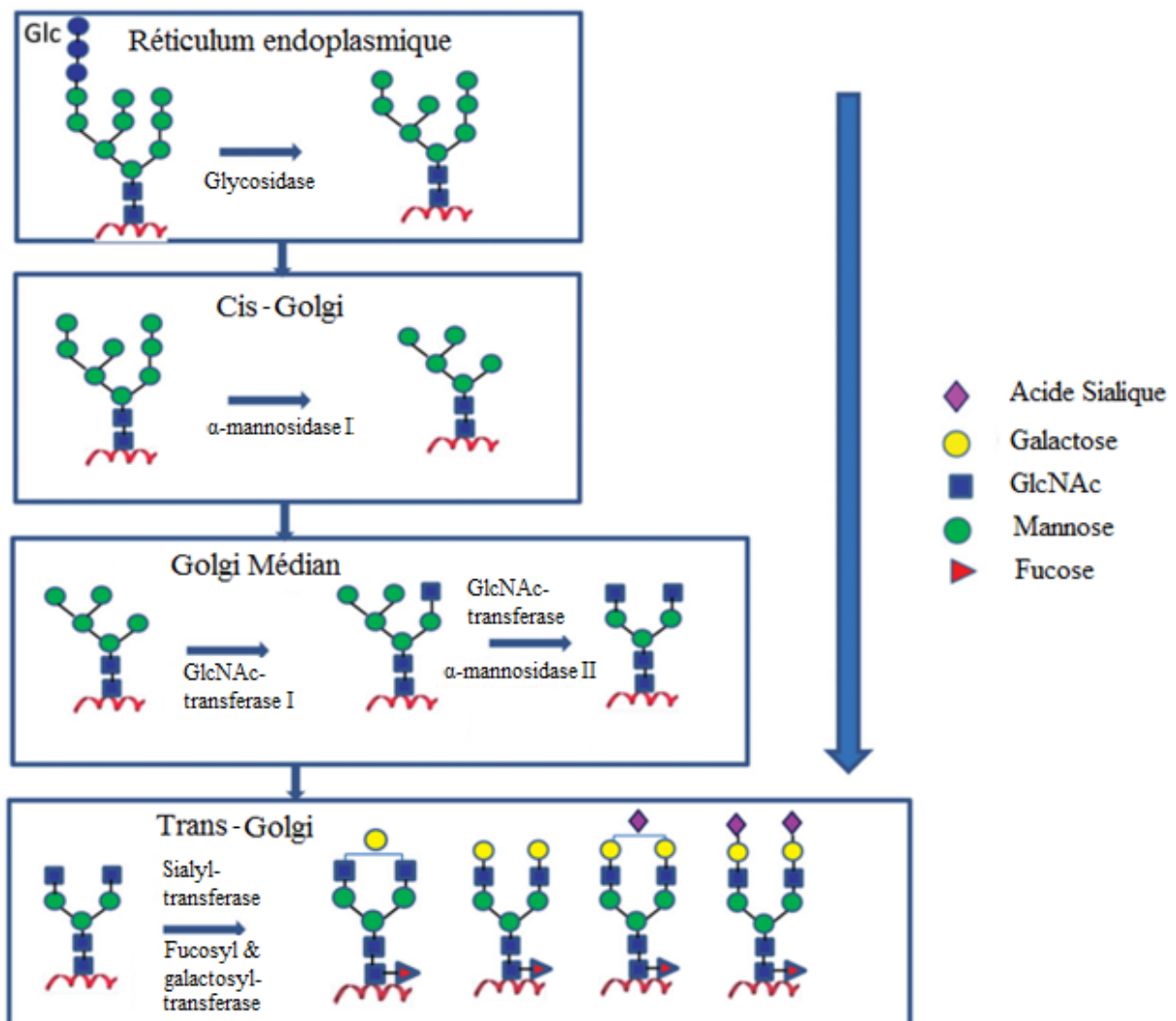


Figure 14 : Cascade de biosynthèse du glycanne à travers le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi

Adapté de Liu *et al.*⁹⁹. Un oligosaccharide Glc₃Man₉GlcNAc₂ est transféré sur l'asparagine 297 par un complexe oligosaccharyltransférase dans le réticulum endoplasmique, où son décapage par des glycosidases peut commencer. Celui-ci débute par le retrait des trois résidus glycosyles (Glc) et d'un mannose pour former Man₈GlcNAc₂. Après transition vers le cis-Golgi, trois mannoses sont à nouveau retirés par d'autres mannosidases, pour former un oligosaccharide Man₅GlcNAc₂. Une fois passé dans le Golgi médian, la *N*-acétylglucosaminyltransférase-I (GlcNAc-transférase I, ou GnT-I) engendre le transfert d'un GlcNAc sur le mannose terminal de la branche α 3 du Man₅GlcNAc₂. Un retrait de deux mannoses s'opère ensuite sur la branche α 6 grâce à une mannosidase, donnant un oligosaccharide de configuration GlcNAcMan₃GlcNAc₂. Dernière étape dans le Golgi médian, la *N*-acétylglucosaminyltransférase-II (GlcNAc-transférase II, ou GnT-II) transfère un GlcNAc additionnel sur le mannose terminal en α 6, pour former GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂. Enfin, dans le trans-Golgi, l'addition de galactose, d'un GlcNAc bisecteur, d'acides sialiques ou encore de fucose s'opère par addition enzymatique de ces résidus saccharidiques, suivant le patrimoine enzymatique de la cellule productrice.

IV-Propriétés biologiques des immunoglobulines G

Comme abordé précédemment, les deux bras Fab lient l'antigène. Le Fc, quant à lui, interagit avec différents récepteurs ou protéines du système immunitaire. Pour éliminer les agents pathogènes, des cellules cancéreuses ou des cellules indésirables avec des anticorps thérapeutiques, cette portion Fc peut permettre de recruter les cellules immunitaires du patient via les récepteurs Fc gamma, menant à des phénomènes de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) ou de phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP), ou encore d'amorcer la voie classique du complément (CDC) par interaction avec son premier élément, le C1q. Le Fc interagit également avec le récepteur néonatal à la portion Fc des IgG (FcRn), favorisant sa biodistribution dans l'organisme, et augmentant sa demi-vie. Enfin, le Fc est également un outil particulièrement efficace pour la purification des IgG, grâce à son interaction avec la protéine A et la protéine G. L'interaction avec tous ces éléments se fait de différentes façons sur le Fc, et sera développée plus en détail dans les paragraphes suivants.

① Le C1q et la voie classique du complément

Le complément est un système biologique comprenant de multiples molécules et dont l'activation peut aboutir à une lyse des cellules. Celle-ci peut avoir lieu selon 3 voies différentes : la voie classique du complément, la voie alterne et la voie des lectines liant les mannanes des membranes microbiennes. Les anticorps sont uniquement capables d'activer la voie classique, c'est pourquoi seule cette voie sera détaillée ici.

Seules les IgM et les IgG sont capables d'activer le complément. La fixation de deux ou plusieurs molécules d'IgG ou une molécule d'IgM (pentamérique) à des antigènes permettent la fixation du premier composant de la voie classique : le C1. Le C1 est un complexe composé de trois sous-composants, C1q, C1r et C1s (**Figure 15A**) qui se fixe par la région globulaire de C1q sur la région CH2 des anticorps. La voie classique du complément se met en place et se terminera par la formation d'un complexe d'attaque membranaire, qui conduit à un déséquilibre osmotique, entraînant la lyse de la cellule cible^{110,111}

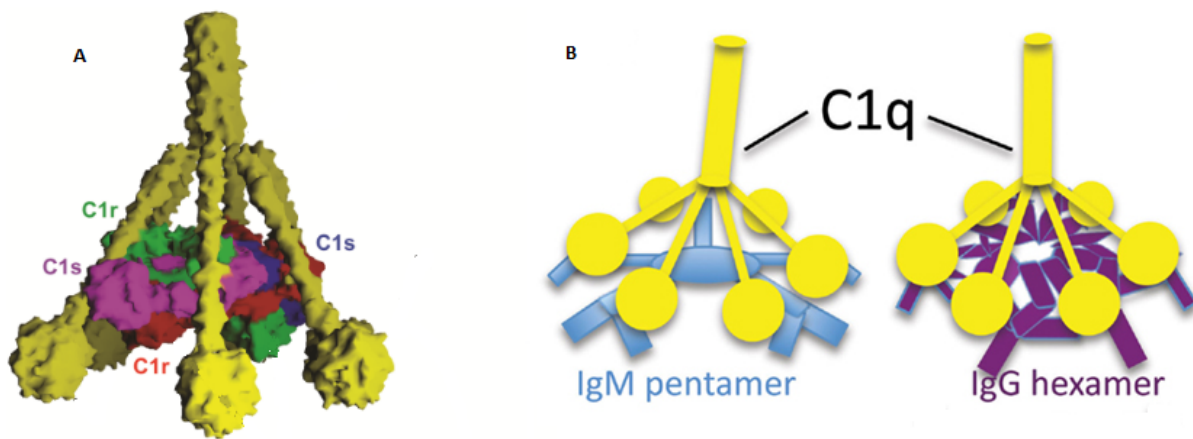


Figure 15 : Le complexe C1

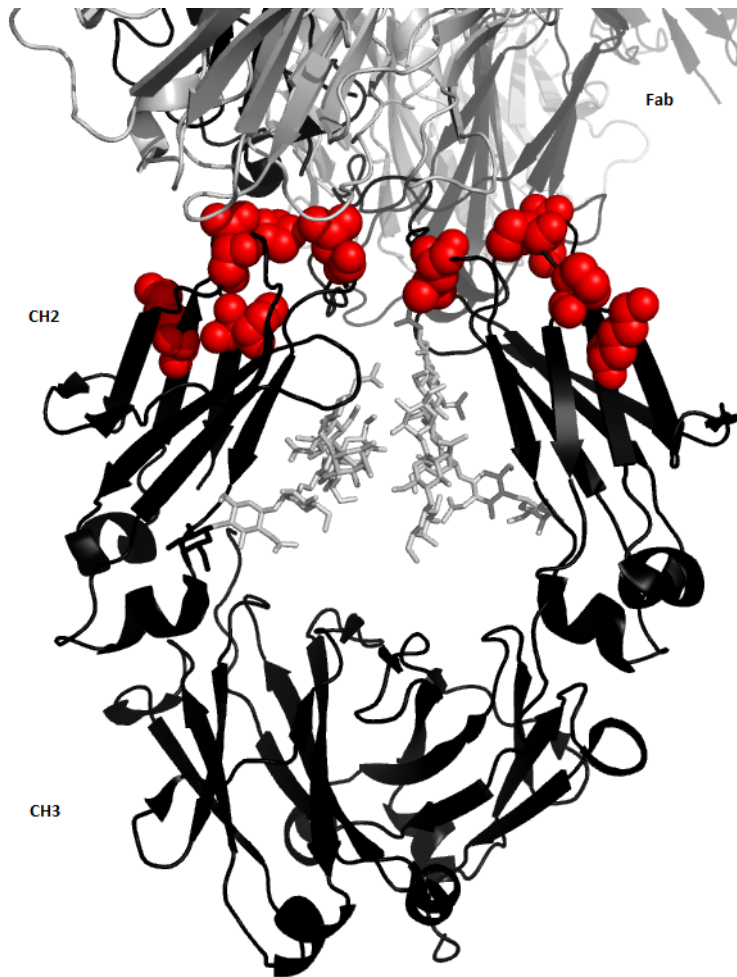
A : Modèle de représentation du complexe C1, composé du C1q (en jaune), de 2 molécules de C1r (rouge et vert) et de 2 molécules de C1s (bleu et violet). Le C1q est une protéine de reconnaissance composée de 6 unités identiques, chacune comportant une tête globulaire qui fixe l'anticorps, et une queue de type collagène (en haut). Adapté de *Frachet et al.*¹¹².

B : Héxamérisation des IgG par liaison au niveau de l'interface CH2-CH3, favorisant l'interaction avec le C1q. L'IgM est en bleu, l'IgG en violet, et le C1q en jaune. Selon *Gaboriaud et al.*¹¹³.

L'activation de la voie classique du complément diffère suivant les sous-classes d'IgG. Les IgG1 et les IgG3 sont ainsi connues pour être de bons activateurs de cette voie^{114,115}, contrairement aux IgG2 et aux IgG4^{64,116}. Pour ces deux dernières, ceci est dû en grande partie à la liaison réduite au C1q^{114,117,118}. IgG2 semble cependant garder des propriétés supérieures, motivant l'utilisation thérapeutiques des IgG4 quand aucune activité cytolytique n'est souhaitée^{114,115,117-119}. D270, K322, P329, et P331 sont les acides aminés importants pour la liaison au C1q dans le CH2^{117,120-122} (**Figure 16**). Pour l'IgG2, la réduction de la liaison au C1q semble être largement due à la présence d'une alanine en 235¹²², à la place d'une leucine chez les autres sous-classes. Pour l'IgG4, il semble que ce soit plutôt la présence d'une proline en position 331 qui soit responsable de la réduction de liaison^{117,120}. La fin de la charnière (positions 226-230) semble également influencer la liaison au C1q¹²³. En effet, la rigidité de celle-ci contribue favorablement à la liaison au C1q, alors que le retrait des ponts disulfures l'affecte négativement. La très longue charnière d'IgG3 pourrait aussi rendre le site de liaison au C1q plus accessible, permettant une meilleure activation du complément^{124,125}. Cependant, une IgG3 dans laquelle une charnière d'IgG4 a été incorporée se lie efficacement au C1q, mais entraîne une activation du complément réduite⁸².

Lorsqu'une cellule est densément opsonisée par des IgG, il peut se former des hexamères via des interactions au niveau des interfaces CH2-CH3, créant une interface optimale pour la liaison des 6 têtes globulaires du C1q¹²⁶ (**Figure 15B**). Pour IgG4, la faible liaison au C1q semble influencée par le repliement des Fab sur le Fc, réduisant l'accessibilité à son site de liaison, en

raison d'une charnière très courte^{75,125,127,128}. Bien que l'IgG2 ait une charnière aussi courte que celle d'IgG4, cette IgG peut activer efficacement le complément à des densités élevées en



antigènes à la surface, comme c'est le cas pour les polysaccharides, pour lesquels des IgG2 semblent intervenir en majorité¹²⁹. A cette forte densité, l'IgG2 semble être plus à même de former des hexamères, augmentant l'avidité de cette sous-classe pour le C1q¹²⁶.

Figure 16 : Mise en évidence des acides aminés importants pour la liaison au C1q sur la représentation tridimensionnelle d'un Fc d'IgG1

Les acides aminés importants pour la liaison au C1q (L235, D270, K322, P329, et P331) sont identifiés en rouge. Le Fc est représenté en noir, avec son glycanne en gris. Cette figure a été réalisée en utilisant PyMOL Molecular Graphics System, version 1.7.4 (Schrödinger) à partir du fichier PDB : 1HZH⁵⁶

② La phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP) et la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)

La phagocytose est l'absorption active par voie d'endocytose de particules plus grandes que 0,5 μm . Ce mécanisme peut être favorisé par la présence de facteurs opsonisants, comme le complément ou les anticorps, qui fournissent ainsi de nouveaux sites d'interactions pour les récepteurs de surface des phagocytes. Dans le cas de la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP), la liaison de ces derniers à la surface de la particule cible active ainsi les cellules phagocytaires et déclenche le mécanisme de phagocytose¹³⁰. Pour capturer efficacement les particules opsonisées par les IgG, les phagocytes (monocytes, macrophages,

neutrophiles...) sondent continuellement leur environnement par extension des protubérances de la membrane¹³¹.

Ces phagocytes portent des récepteurs à leur surface permettant d'interagir avec la portion Fc des immunoglobulines. Pour les IgG, on parle de récepteurs Fc gamma ou FcγR, dont on trouve trois classes FcγRI, FcγRII et FcγRIII comptant au total six membres FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA et FcγRIIIB (cf. chapitre suivant).

La densité d'IgG ayant opsonisé la particule corrèle avec l'amplitude des premiers signaux transmis par les FcγR¹³². La preuve de l'importance des FcγR dans cette phagocytose liée à l'opsonisation par des IgG a été donnée par l'introduction de multiples Fc sur des IgGs, montrant une augmentation de la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps¹³³. FcγRI¹³⁴, FcγRIIA¹³⁵ et FcγRIIIA¹³⁶ sont capables de promouvoir ce mécanisme d'ADCP, alors que FcγRIIB le régule négativement sur les monocytes et les macrophages^{137,138}.

La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) est également un mécanisme d'élimination des cibles, qui se met en place notamment si celle-ci ne peut être phagocytée par la cellule effectrice. L'ADCC classique s'opère par sensibilisation de la cible par des anticorps et reconnaissance de leurs portions Fc par les récepteurs Fc de la cellule effectrice, qui libérera des granules cytotoxiques pour éliminer la cellule cible. L'ADCC par armement des effecteurs, quant à elle, est liée à la forte affinité du récepteur FcγRI pour les IgG, entraînant un « armement » des cellules effectrices par des IgG à leur surface, avant la rencontre avec la cible.

Les cellules effectrices du mécanisme d'ADCC doivent donc exprimer des récepteurs interagissant avec la portion Fc des IgG et être capables de libérer un arsenal cytotoxique. Des cellules mononucléées (cellules NK, macrophages et les lymphocyte T CD16+) et des polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles) interviennent ainsi dans le mécanisme d'ADCC¹³⁹⁻¹⁴². Ces effecteurs cytotoxiques varient dans les mécanismes de cytotoxicité mis en jeu, et ils varient aussi dans la palette des FcγR qu'ils expriment (cf. chapitre suivant). Ceci aboutit à un paysage assez complexe, rendant difficile l'identification des mécanismes réellement importants chez le patient traité par des anticorps thérapeutiques.

L'importance des récepteurs Fcγ a ainsi été démontrée *in vivo* grâce à l'utilisation de souris dont les récepteurs FcγR ont été génétiquement modifiés¹⁴³. Comme les récepteurs FcγR activateurs de la souris (FcγRI, FcγRIII et FcγRIV) nécessitent la coexpression de FcR-γ, les souris dont le gène codant le FcR-γ a été invalidé sont déficientes pour toutes les propriétés de

phagocytose, de cytotoxicité et de facilitation de la présentation d'antigène. A l'inverse, chez les souris déficientes en FcγRII (récepteur inhibiteur, comme le FcγRIIB chez l'homme), ces propriétés se trouvent amplifiées. L'étude de la réponse de tumeurs humaines xénogreffées à l'administration de rituximab ou de trastuzumab, deux anticorps thérapeutiques, a permis de révéler pour *in vivo* l'importance de ces FcγR : l'effet antitumoral du rituximab est aboli chez les souris déficientes en FcγR activateurs tandis que celui du trastuzumab est drastiquement réduit¹⁴³. A l'inverse, l'effet antitumoral de ces deux anticorps est accru chez les souris déficientes en FcγRII inhibiteur¹⁴³. Cette publication a joué un rôle majeur dans la prise de conscience de l'importance du Fc et des FcγR dans le mécanisme d'action des anticorps thérapeutiques.

Comme il est exprimé de façon prédominante par les cellules NK, le récepteur FcγRIIIA humain est connu comme le principal récepteur Fc prenant part au mécanisme d'ADCC. Des études *in vitro* ont cependant montré que les monocytes et les granulocytes pouvaient réaliser de l'ADCC a un niveau aussi important que les NK, grâce à d'autres récepteurs Fc^{139,144,145}.

③ Les Récepteurs Fc gamma (FcγR)

Ces récepteurs sont étudiés depuis le début des années 80, sans qu'on eût suspecté alors leur complexité et leur diversité. L'isolement d'anticorps monoclonaux spécifiques de différents récepteurs permit un progrès rapide des connaissances sur les récepteurs Fc propres aux IgG. En 1987, une nomenclature pour ces récepteurs fut définie lors d'un congrès, imposant l'abréviation FcγR suivie de chiffres romains¹⁴⁶, décrivant ainsi plusieurs classes de récepteurs Fc gamma humains.

Chez l'homme, trois classes de récepteurs Fc gamma ont ainsi été décrites, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) et FcγRIII (CD16), avec un total de six membres FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA et FcγRIIIB, distincts par des propriétés structurales et fonctionnelles. Ces récepteurs sont des glycoprotéines transmembranaires de type I constituées d'une sous-unité alpha de liaison à l'IgG composée de deux (FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA et, FcγRIIIB) ou trois (FcγRI) domaines immunoglobuliniques de type C (**Figure 17**). Tous les FcγR montrent un degré d'identité élevé, mais diffèrent grandement par leurs domaines cytoplasmiques¹⁴⁷. Fonctionnellement, les FcγR peuvent être divisés en activateurs ou inhibiteurs, suivant que le signal est transmis par un motif ITAM (« *Immunoreceptor Tyrosine-*

based Activation Motif») comme FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIC et FcγRIIIA, ou par un motif ITIM (« Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif »), comme FcγRIIB^{148–151}. FcγRIIA et FcγRIIC ont leur propre ITAM dans leur domaine cytoplasmique, alors que FcγRI et FcγRIIIA s'associent avec une chaîne de signalisation FcR-γ contenant un ITAM¹⁵². Seul FcγRIIIB ne contient pas de domaine de signalisation activateur ou inhibiteur, car il est lié à la membrane par une ancre glycosylphosphatidylinositol (glypiée ou GPI) (Figure 17). Ce récepteur semble agir en synergie avec d'autres récepteurs tel FcγRIIA, et utilise leur équipement ITAM pour des signaux de transduction ou d'activation cellulaire^{153–155}.

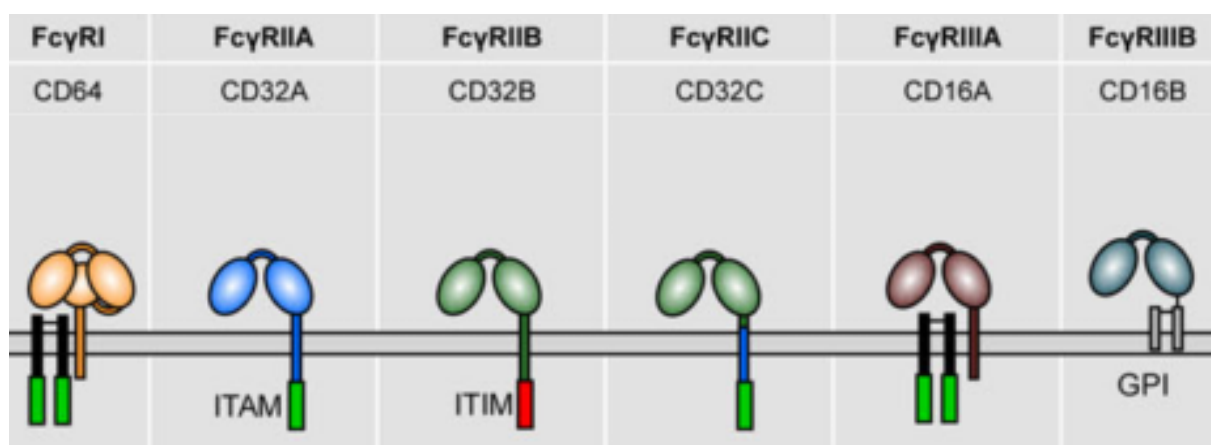


Figure 17 : Représentation schématique des FcγR

Adapté de Bruhns *et al.*¹⁵⁶. Les motifs ITAM sont indiqués en rectangle vert, et le motif ITM en rectangle rouge.

Le FcγRI est le seul récepteur FcγR de forte affinité pour les IgG, permettant de lier les IgG monomériques *in vivo* (d'où l'armement des effecteurs)¹⁵⁷. Ce récepteur activateur de 374 acides aminés contient un domaine supplémentaire comparé aux autres FcγR, dont on a longtemps cru qu'elle expliquait sa forte affinité pour les IgG^{158,159}. Ce récepteur est de plus fortement glycosylé (7 sites de *N*-glycosylation), notamment dans ce domaine supplémentaire, laissant également suggérer un rôle important dans sa forte interaction avec les IgG¹⁶⁰. En réalité, il semblerait que cette forte affinité soit plutôt le résultat d'une plus courte boucle entre les feuillets β F et G dans le deuxième domaine extracellulaire¹⁶¹. Ce récepteur est exprimé par les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques, et peut être induit sur les neutrophiles^{162,163} et les mastocytes¹⁶⁴ par stimulation avec des cytokines comme l'interféron-γ.

La famille des récepteurs FcγRII (CD32) comprend trois récepteurs, FcγRIIA, FcγRIIB et FcγRIIC, très proches dans la structure de leurs domaines extracellulaires, mais différent

grandement dans leurs fonctions biologiques. De par leur faible affinité, ces récepteurs ne se lient qu'à des complexes immuns, et non à des IgG monomériques (d'où l'ADCC par sensibilisation des cibles ou la phagocytose après opsonisation).

FcγRIIA (CD32a) est le FcγR activateur humain le plus répandu, présent sur les monocytes, les macrophages^{165,166}, les neutrophiles, les éosinophiles, les lymphocytes B en petite quantité, les plaquettes en grande quantité¹⁶⁷, les mastocytes¹⁶⁸, les îlots de Langerhans¹⁶⁹, les cellules endothéliales placentaire¹⁷⁰, et sur les cellules dendritiques¹⁷¹. C'est le seul récepteur activateur présent sur les plaquettes, les mastocytes, les basophiles, les neutrophiles et les éosinophiles. Il déclenche puissamment l'inflammation induite par des complexes immuns. Ce récepteur de 317 acides aminés, comprenant deux sites de glycosylation, présente également un polymorphisme à la position 131 (histidine ou arginine) qui influence notamment la liaison de ce récepteur aux IgG2 humaines¹⁷².

FcγRIIB (CD32b), composé de 310 acides aminés et contenant trois sites de glycosylation, est le seul récepteur inhibiteur. Il est exprimé de façon importante à la surface des lymphocytes B circulants, et on le trouve également sur les basophiles, les cellules dendritiques, les monocytes et parfois sur les macrophages, les cellules NK, et les neutrophiles¹⁷³⁻¹⁷⁶. Ce récepteur régule négativement les récepteurs Fcγ activateurs présents sur ces cellules, et ainsi régule de façon négative l'activation cellulaire^{138,177}. On ne le trouve pas sur les mastocytes humains¹⁶⁶, où il ne peut ainsi pas réguler négativement l'activité des récepteurs Fcγ activateurs, de même qu'il est absent sur la plupart des neutrophiles, cellules NK et macrophages¹⁷⁸.

FcγRIIC (CD32c) est un récepteur de faible affinité qui est issu au cours de l'évolution d'une recombinaison (crossover) inégale des gènes FCGR2A et FCGR2B, codant respectivement FcγRIIA (CD32a) et FcγRIIB (CD32b), donnant le gène FCGR2C¹⁷⁹. Ce récepteur est exprimé sur les cellules NK, les monocytes, les macrophages, et les neutrophiles, mais est présent dans seulement 20 à 30 % de la population à cause d'un polymorphisme allélique formant un codon stop dans le troisième exon^{180,181}. De par sa présence sur les cellules NK, il agit comme un récepteur activateur capable d'induire l'ADCC¹⁸².

La famille des FcγRIII comprend deux membres très proches dans la structure de leurs domaines extracellulaires, FcγRIIIA et FcγRIIIB.

FcγRIIIA (CD16A) est un récepteur de moyenne affinité constitué de 254 acides aminés (**Figure 18**), dont cinq sites de glycosylation. Il est exprimé à la surface des cellules NK et de certains

monocytes et macrophages¹⁷⁸, et promeut le phénomène d'ADCC. Ce récepteur montre deux polymorphismes, l'un en position 48 (leucine ou arginine), l'autre en position 158 (valine ou phénylalanine)^{183,184}. Ce dernier sera plus amplement discuté dans le chapitre suivant.

Enfin, le FcγRIIIB (CD16b) est également un récepteur de faible affinité, constitué de 233 acides aminés. Il est exprimé sur les neutrophiles et peut l'être en faible quantité sur les basophiles^{178,185}. Ce récepteur montre également un polymorphisme multi-positions, nommé NA1 (R36 N65 D82 V106), NA2 (S36 S65 N82 I106), ou SH (S36 S65 D78 N82 I106). Les fonctions du FcγRIIIB sont encore mal comprises. L'importance démontrée du FcγRIIIB dans la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles s'accorde mal avec l'absence d'une signalisation propre, et suggère l'intervention de coopérations avec d'autres récepteurs membranaires (FcγRIIA, récepteurs du complément...).

④ Les zones d'interactions Fc-FcγR

Plusieurs travaux de mutagenèse des FcγR^{186,187} ou des IgG1^{108,188–190}, couplés à des études de cristallisation des FcγR^{191–196}, ont été réalisés pour identifier les acides aminés importants pour cette liaison. Pour tous les FcγR, la fixation s'opère de façon asymétrique au niveau supérieur du CH2, le récepteur s'insérant entre les deux chaînes lourdes, proche de la charnière (**Figure 18**). Pour le récepteur, la zone de contact est située dans le deuxième domaine extracellulaire.

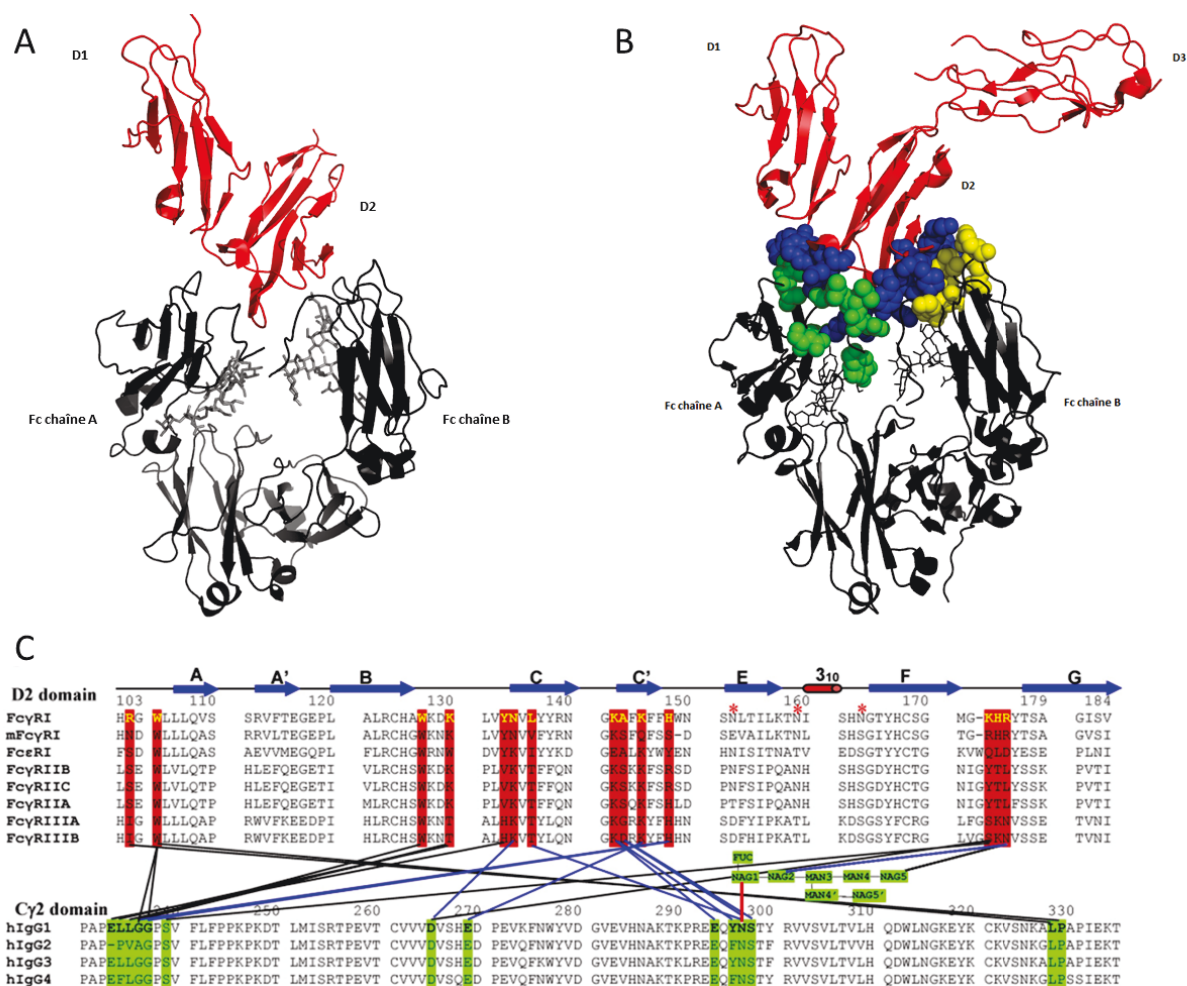


Figure 18 : Les zones d'interaction entre les récepteurs Fcγ et la portion Fc d'une IgG

A : Représentation tridimensionnelle d'un Fc d'IgG1 lié au FcγRIIIA. Le Fc est représenté en noir avec ses glycanes en gris et le FcγRIIIA en rouge. L'interaction se forme entre un FcγRIIIA et un Fc (stoechiométrie 1:1) asymétriquement. Le domaine D2 du récepteur interagit ainsi avec les deux domaines CH2 de manière différente mais avec en partie les mêmes acides aminés. Cette figure a été réalisée en utilisant PyMOL Molecular Graphics System, version 1.7.4 (Schrödinger) à partir du fichier PDB : 1E4K¹⁹⁷. **B :** Représentation tridimensionnelle d'un Fc d'IgG1 lié au FcγRI. Le Fc est représenté en noir avec ses glycanes en gris, et le FcγRI en rouge. Les zones d'interaction entre le FcγRI et le Fc sont respectivement indiquées en bleu pour ce premier, et en vert et jaune pour ce dernier. Cette figure a été réalisée en utilisant PyMOL Molecular Graphics System, version 1.7.4 (Schrödinger) à partir du fichier PDB : 1HZH¹⁹⁶. **C :** Séquences peptidiques des domaines D2 des récepteurs Fc gamma et du début du CH2 des différents sous-classes d'IgG. En noir et en bleu sont indiquées les interactions entre le FcγRI et les chaînes A et B du Fc. Les acides aminés inclus dans ces zones de liaison sont indiqués en rouge et vert, respectivement sur les Fcγ et le CH2 de l'IgG. Les astérisques rouges sont les sites de glycosylation du récepteur. Selon Lu et al.¹⁹⁶. Les résidus en bleu sur la **Figure 18B** et surlignés en rouge sur la **Figure 18C** sont les zones de contact au niveau des récepteurs Fcγ : 103, 105, 128, 131, 134-135, 137, 143-144, 146, 149, 174-176. Les résidus en vert sur la **Figure 18B** et reliés par des traits noirs sur la **Figure 18C** sont les zones de contact de la chaîne A de l'IgG : acides aminés 233-236, 239, 265, 328-329, et sur l'un des GlcNAc présent sur l'une des antennes du glycanne. Les résidus en jaune sur la **Figure 18B** et reliés par des traits bleu sur la **Figure 18C** sont les zones de contact avec la chaîne B de l'IgG : acides aminés 237, 265, 269, 294, 296-298, et sur le deuxième GlcNAc du glycanne lié à l'asparagine 297.

⑤ Les différences de liaison au FcγR entre les sous-classes d'IgG

Au niveau des positions discutées dans le paragraphe précédent (Figure 18), principalement dans la zone 233-237, la séquence d'acides aminés des quatre sous-classes d'IgG diffère. Ceci entraîne une différence d'affinité de liaison pour ces récepteurs.

IgG1 et IgG3 se lient favorablement à tous les FcγR. IgG2 se lie plus favorablement à l'allotype 131H du FcγRIIA qu'à l'allotype 131R. Cette sous-classe montre également une liaison au FcγRIIB, au FcγRIIC, et aux deux formes du FcγRIIIA (V ou F en position 158)^{157,178}. Enfin IgG4, que l'on pensait seulement capable de liaison au FcγRI¹⁹⁸, se lie également à FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, et FcγRIIIA, particulièrement l'allotype V158^{184,157}.

⑥ Le polymorphisme du récepteur FcγRIIIa

Le chapitre de livre qui suit nommé « Mobilisation des effecteurs de l'immunité par les anticorps anticancéreux nus »¹⁹⁹ a été publié en 2014 dans l'ouvrage Immunothérapie des cancers au troisième millénaire, coordonné par L. Zitvogel, D. Hannani et F. Martin²⁰⁰. Il aborde premièrement les différentes sous-classes d'immunoglobulines et leur propriétés, et fait un focus sur celles d'IgG1, cruciales dans le traitement des cancers. La description de ces propriétés dans des modèles expérimentaux est suivie de la description de l'historique et de la description de la découverte de l'importance du polymorphisme du récepteur FcγRIIIA dans la réponse aux anticorps thérapeutiques. Confirmée par des tests *in vitro*, l'importance de ce polymorphisme a contribué à populariser la notion d'ADCC. Ce chapitre se termine en décrivant les anticorps thérapeutiques commercialisés et en développement, modifiés dans leur portion Fc de façon à augmenter la liaison au FcγRIIIA.

14 MOBILISATION DES EFFECTEURS DE L'IMMUNITÉ PAR LES ANTICORPS ANTICANCÉREUX NUS

Jérémy Pottier^{1,2,3}, Gilles Thibault^{1,2,3,4},
Hervé Watier^{1,2,3,4}

Depuis l'arrivée du rituximab en 1998, 15 autres anticorps thérapeutiques ont suivi pour des indications en cancérologie. Ces anticorps, le plus souvent dirigés contre des antigènes de surface des cellules cancéreuses ou des récepteurs de facteurs de croissance, sont quasi-exclusivement des IgG1. Ceci est lié aux propriétés de cette sous-classe d'IgG, alliant fortes capacités de mobilisation des effecteurs de l'immunité et demi-vie longue. Les capacités effectrices de ces anticorps sont liées à leur possibilité d'interaction avec le C1q qui permet la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) et d'interaction avec les FcγR des cellules de l'immunité, qui permet notamment la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).

La découverte de notre équipe, établissant un lien entre le polymorphisme du gène codant FcγRIIIA, un récepteur pour la portion Fc des IgG exprimé sur les cellules cytotoxiques, et la réponse au rituximab, eut un effet fondateur. La transposition *in vitro* de la relation génotype/phénotype a également accrédité l'idée que l'amélioration de l'ADCC pouvait permettre un gain d'activité thérapeutique. L'effet du polymorphisme ayant été observé chez des patients traités par rituximab aussi bien que par trastuzumab ou cétuximab, c'est l'ensemble des anticorps ciblant les cellules cancéreuses qui se trouve être concerné par des stratégies visant notamment à modifier la portion Fc afin d'en améliorer les propriétés de liaison au FcγRIIIA.

¹Université François-Rabelais, Tours, France.

²CNRS, UMR 7292, équipe « Anticorps, récepteurs Fc et réponses cliniques ».

³LabEx MAbImprove.

⁴CHRU de Tours, France.

SOMMAIRE

Introduction	234
1. IgG1, sous-classe préférentielle	235
2. Propriétés du Fc des IgG1 dans les modèles expérimentaux	235
3. Polymorphisme FCGR3A et réponse aux anticorps cytolytiques	239
4. Relation génotype/phénotype <i>in vitro</i> : importance du FcγRIIIA/CD16a	240
5. Variants Fc améliorant la liaison au FcγRIIIA/CD16a	241
Conclusion	242
Références bibliographiques	245

INTRODUCTION

Avec l'explosion des anticorps thérapeutiques, les thérapies contre le cancer ont pris une nouvelle direction. En effet, depuis la mise sur le marché en 1998 du premier anticorps monoclonal thérapeutique utilisé en oncologie, le rituximab, ce sont pas moins de 15 autres anticorps monoclonaux recombinants qui sont dorénavant approuvés dans le cancer, soit presque 50 % des anticorps sur le marché [1]. Parmi eux, le rituximab (anti-CD20) et le trastuzumab (anti-Her-2) représentent des « valeurs sûres » de ce champ thérapeutique puisqu'ils sont comptés parmi les blockbusters des ventes de biomédicaments [2].

Sur la dizaine de cibles préférentielles des anticorps anticancéreux commercialisés, beaucoup sont des antigènes membranaires, exprimés à la surface des cellules cancéreuses. L'exemple le plus frappant est le CD20, un antigène spécifique de surface des lymphocytes B permettant de traiter par rituximab de nombreuses hémopathies lymphoïdes B. Les récepteurs des facteurs de croissance sont également des cibles privilégiées pour les tumeurs solides. Ce sont notamment les protéines EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) et Her-2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*), cibles respectives du cétuximab et du panitumumab (anti-EGFR) d'une part, et du trastuzumab et du pertuzumab (anti-Her-2) d'autre part. On trouve encore d'autres antigènes membranaires, comme le CD52 (cible de l'alemtuzumab), le CD30 (cible du brentuximab vedotin), CCR4 (cible du mogamulizumab) ou EpCAM (cible du catumaxomab), et depuis peu le CTLA-4 (cible de l'ipilimumab).

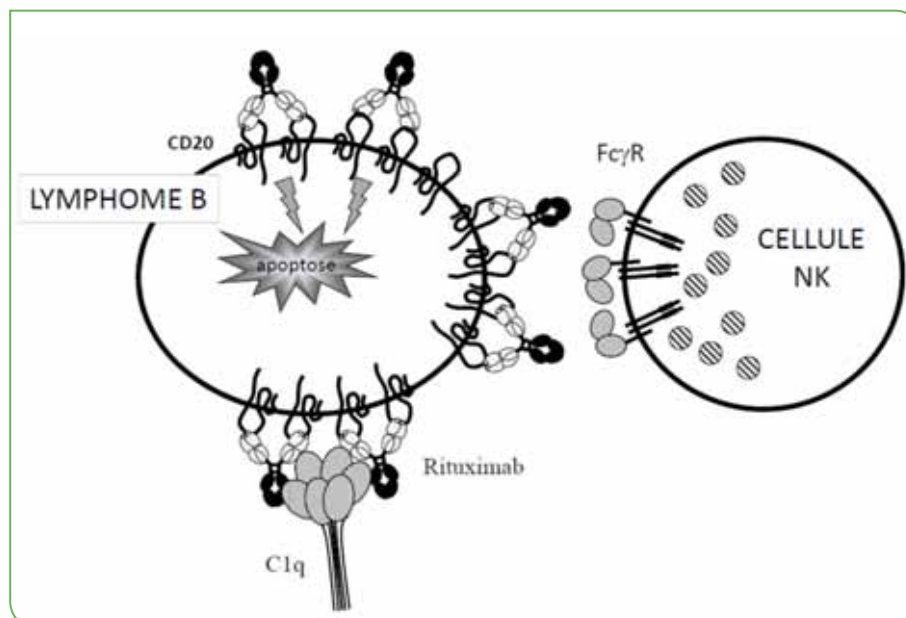
Si l'on ne retient que les anticorps nus, en excluant les anticorps conjugués à des radioisotopes ou à des médicaments cytotoxiques (immunoconjugués), la quasi-totalité des anticorps anticancéreux commercialisés (rituximab, alemtuzumab, cétuximab, trastuzumab, pertuzumab) sont des immunoglobulines G1 (IgG1), alors qu'il existe trois autres sous-classes d'IgG chez l'Homme (IgG2, 3 et 4). Ce choix n'est pas anodin, puisqu'il est ou non associé à la possibilité qu'ont les anticorps fixés à leur cible cellulaire par leurs Fab (*Fragment antigen binding*) de pouvoir recruter des effecteurs de l'immunité par leur portion Fc (*Fragment cristallizable*). Ainsi, bien que la thérapie par anticorps soit dénommée « immunothérapie passive spécifique » en opposition à l'immunothérapie active spécifique (vaccination) qui suppose une réaction immunitaire de l'organisme vis-à-vis de l'antigène, cette immunothérapie par anticorps, bien que « passive », laisse envisager une mobilisation active des effecteurs de l'immunité, qu'il s'agisse des effecteurs humoraux (le système du complément), ou des effecteurs cellulaires, c'est-à-dire les cellules de l'immunité porteuses de récepteurs pour la portion Fc des IgG, les FcγR. Ce chapitre sera consacré à la découverte de l'importance de ces mécanismes dans l'efficacité des traitements par anticorps anticancéreux et aux moyens actuellement envisagés pour renforcer ces propriétés, en optimisant notamment la structure de l'anticorps.

1 IGG1, SOUS-CLASSE PRÉFÉRENTIELLE

Quand la biologie moléculaire rendit possible, à partir d'anticorps monoclonaux de souris, de concevoir des anticorps très largement humains, se posa rapidement la question de savoir lequel des 4 isotypes humains ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ ou $\gamma 4$) devait être utilisé pour la chaîne lourde, autrement dit quelle sous-classe d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4) convenait en fonction des propriétés thérapeutiques requises. Le Campath-1H (anti-CD52) reste le premier et le seul exemple d'un anticorps testé en clinique sous la forme d'une IgG1 et d'une IgG4 [3]. Comme l'IgG1 induisait une lymphopénie plus constante et plus forte chez les patients, c'est au final cette sous-classe qui fut développée sous le nom d'alemtuzumab pour le traitement de la leucémie lymphoïde chronique [4]. Ces observations furent également observées avec le c2B8 (anti-CD20), mais seulement chez le macaque : contrairement au c2B8 IgG4, seul le c2B8 IgG1 induit une lymphopénie B [5]. C'est donc la forme IgG1 qui fut développée pour le traitement des hémopathies B, sous le nom de rituximab. Ces deux études démontrent bien, dans des modèles pertinents, que la nature de la portion Fc contribue aux propriétés pharmacologiques des anticorps, et que l'IgG1 doit être la sous-classe préférée lorsqu'il s'agit de cibler des antigènes membranaires et d'entraîner une cytolysse des cellules cibles, particulièrement en cancérologie. La seule exception concerne le panitumumab, un anticorps anti-EGFR de la sous-classe IgG2. Comme les IgG4, les IgG2 ont une très faible capacité de mobilisation des effecteurs de l'immunité. Il est donc vraisemblable que l'efficacité de cet anticorps dans le cancer du côlon ne repose que sur l'effet antagoniste de cet anticorps pour l'EGFR (propriété dépendante du Fab), privant les cellules des signaux induits par les facteurs de croissance. Ceci étant, à la différence du cétuximab qui est lui aussi antagoniste sur l'EGFR mais qui est une IgG1, le panitumumab n'est pas efficace dans le traitement des cancers oropharyngés [6]. Il est donc vraisemblable que l'activité du cétuximab, spécifiquement dans cette indication, résulte de sa capacité à mobiliser les effecteurs de l'immunité.

2 PROPRIÉTÉS DU Fc DES IGG1 DANS LES MODÈLES EXPÉRIMENTAUX

La mobilisation des effecteurs humoraux de l'immunité correspond *in vitro* à l'activation du complément par la voie classique. Dès lors que le C1q trouve au moins deux IgG1 fixées à leur cible et à proximité l'une de l'autre, il peut s'y fixer (**figure 1**) et entraîner l'activation en cascade des protéines du complément. Les fortes concentrations en antigène membranaire, ou la concentration des antigènes cibles dans des micro-domaines membranaires tels que les radeaux lipidiques favorisent l'activation du complément. C'est notamment le cas du CD52, fortement exprimé et concentré dans les radeaux lipidiques. Le rituximab a également la capacité de déplacer (transloquer) le CD20 dans les radeaux lipidiques, favorisant la liaison du C1q [7]. Si l'activation du



➔ **Figure 1** : Recrutement des effecteurs de l'immunité par le Fc des anticorps : l'exemple du rituximab.

Le rituximab se lie au CD20 de la membrane des lymphocytes B et des cellules lymphomateuses ; il s'agit d'un antigène comportant quatre domaines transmembranaires, le rituximab se fixant sur la plus grande des deux boucles extracellulaires. Trois mécanismes peuvent contribuer à la mort des cellules-cibles, l'apoptose résultant de la simple fixation de l'anticorps à la cible, la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et la cytotoxicité dépendante du complément (CDC). En pontant deux antigènes CD20 par ses bras Fab (en blanc), le rituximab peut provoquer une apoptose de la cible, totalement indépendante du Fc (en noir) et de la présence d'effecteur de l'immunité. Le fait que le c2B8 IgG4 (*cf. texte*) ne provoque pas de lymphopénie ne plaide pas en faveur d'une importance de ce mécanisme. L'ADCC est secondaire à la reconnaissance du Fc des anticorps fixés à la cible par les cellules immunitaires (effecteurs) cytotoxiques du patient *via* des FcγR. Sur le schéma, est représenté le FcγRIIIA (en gris) des cellules NK. L'engagement de nombreux FcγRIIIA entraîne une libération des granules cytotoxiques (en hachuré noir) de l'effecteur en direction de la cible, déclenchant une apoptose de cette dernière. Plusieurs arguments expérimentaux et cliniques plaident en faveur de l'importance de ce mécanisme (*cf. texte*). La CDC est secondaire à la fixation du C1q (composé de 6 têtes globulaires remplies en gris), premier élément de la cascade du complément, sur le Fc d'IgG déjà fixées à la cellule-cible. Cette fixation du C1q entraîne une activation de la voie classique du complément et peut aboutir à la destruction de la cellule-cible, après formation du complexe d'attaque membranaire (*cf. texte*). Ce mécanisme a surtout été démontré expérimentalement.

complément est menée à son terme, se forme un complexe d'attaque membranaire (C5b-9) qui détruit la cellule ; aucune intervention des cellules de l'immunité n'est nécessaire. C'est la cytotoxicité dépendante du complément, ou CDC, qui peut se mesurer *in vitro*. On sait que plusieurs protéines membranaires peuvent freiner voire éteindre l'activation du complément ; ainsi, l'expression de ces protéines de régulation (CD46, CD55, CD59) protège les cellules de la CDC [8, 9]. La résistance à la CDC des cellules tumorales, en particulier les tumeurs solides, s'explique par une forte expression de ces protéines. Si l'activation du complément avorte, l'inactivation du C3b en C3bi permet cependant encore la reconnaissance des cibles ayant fixé le C3bi (on parle d'opsonisation) par des cellules de l'immunité exprimant CR3 (CD11b/CD18) et CR4 (CD11c/CD18), rendant possibles des phénomènes de phagocytose ou de cytotoxicité cellulaire exercée par le complément [10]. Ces mécanismes ont été très peu étudiés pour les anticorps thérapeutiques.

L'implication réelle du complément dans le mécanisme d'action des anticorps thérapeutiques est peu documentée. Dans certains modèles de lymphomes développés chez la souris (lymphome murin exprimant le CD20 humain), le rituximab perd son activité chez des souris dont le gène codant le C1q a été invalidé [11]. Malgré tout, en absence de documentation clinique solide, l'activation du complément par la voie classique reste un mécanisme assez négligé dans la plupart des développements récents, hormis pour un anti-CD20, l'ofatumumab, qui se distingue du rituximab par sa plus grande capacité à transloquer le CD20 dans les radeaux lipidiques et donc à activer le complément. Il est indiqué dans le traitement de la LLC [12].

En ce qui concerne le recrutement (ou la mobilisation) des cellules porteuses de FcγR par des cellules-cibles sensibilisées par des anticorps IgG1, les mécanismes potentiellement en jeu vont varier d'une cellule « effectrice » à l'autre. Si l'effecteur est un phagocyte (monocyte, macrophage, polynucléaire neutrophile), et que la cellule-cible est de petite taille, l'opsonisation de la cible par l'anticorps pourra favoriser des mécanismes de phagocytose des cibles. Ce mécanisme peut s'envisager pour des tumeurs hématopoïétiques, moins pour des lignées tumorales. Si la cible est de plus grande taille que la cellule effectrice, ce qui est un cas fréquent en cancérologie, le mécanisme de destruction de la cellule-cible passera notamment par une exocytose de granulations cytotoxiques : il s'agit alors du phénomène de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) en anglais (**figure 1**). Peuvent exercer cette propriété les monocytes, les macrophages, les lymphocytes NK, les polynucléaires éosinophiles, et même les plaquettes. Enfin, si la cellule exprimant les FcγR est une cellule présentatrice d'antigène (cellules dendritiques), elle pourra endocyter des fragments de la cible encore opsonisée, ce qui peut favoriser la présentation d'antigènes tumoraux [13]. En pratique, ce sont essentiellement les tests d'ADCC qui sont réalisés en laboratoire, et le plus souvent avec des lymphocytes NK ; néanmoins, les commodités expérimentales ne renseignent pas nécessairement sur les mécanismes à l'œuvre chez les patients !

Les effecteurs cytotoxiques varient dans les mécanismes de cytotoxicité mis en jeu, et ils varient aussi dans la palette des FcγR qu'ils expriment. Les monocytes expriment le FcγRI, le FcγRIIA, le FcγRIIB et parfois le FcγRIIIA, les macrophages le FcγRI, le

FcγRIIA et le FcγRIIIA ; les lymphocytes NK le FcγRIIIA et parfois le FcγRIIC ; les polynucléaires éosinophiles le FcγRIIA et le FcγRIIIB (après activation), les plaquettes le FcγRIIA... [13]. Ces récepteurs varient dans leur affinité pour les IgG, et dans la nature des signaux qu'ils transmettent à la cellule effectrice. FcγRI est le seul récepteur de forte affinité, capable de lier les IgG circulantes (comme les mastocytes lient les IgE par leur FcεRI). Pour tous les autres récepteurs, la moindre affinité nécessite généralement que se forment d'abord des « complexes immuns » (cibles d'abord sensibilisées par l'anticorps) pour que ces récepteurs et les cellules qui les portent reconnaissent les IgG et entrent en action. Ce sont donc les récepteurs de faible/moyenne affinité qui sont les plus susceptibles d'intervenir dans les mécanismes de phagocytose, d'ADCC ou de présentation d'antigène. La plupart des récepteurs ont des fonctions activatrices (déclenchement des phénomènes), *via* les domaines ITAM de leur chaîne accessoire, le FcR-γ (FcγRI, FcγRIIIA), ou *via* un domaine ITAM-like qui leur est propre (FcγRIIA, FcγRIIC) ou encore *via* une coopération avec un autre récepteur activateur (FcγRIIIB). Le seul récepteur qui ne soit pas activateur est le FcγRIIB qui, par son motif ITIM peut bloquer l'action des motifs ITAM des FcγR activateurs, à la condition que les cellules expriment les deux types de récepteurs, ce qui est en fait peu fréquent (monocytes). Ce grand nombre de récepteurs avec des fonctions aussi diverses aboutit à un paysage assez complexe, peu propice à identifier lequel de ces mécanismes peut être important *in vivo* chez le patient [13].

Un progrès important a pu être franchi grâce à l'utilisation de souris dont les récepteurs FcγR ont été génétiquement modifiés [14]. Comme les récepteurs FcγR activateurs de la souris (FcγRI, FcγRIII et FcγRIV) nécessitent la coexpression de FcR-γ, les souris dont le gène codant le FcR-γ a été invalidé sont déficientes pour toutes les propriétés de phagocytose, de cytotoxicité et de facilitation de la présentation d'antigène. À l'inverse, chez les souris déficientes en FcγRII (récepteur inhibiteur, comme le FcγRIIB chez l'Homme), ces propriétés se trouvent amplifiées. L'étude de la réponse de tumeurs humaines xénotreffées à l'administration de rituximab ou de trastuzumab a permis de révéler pour la première fois *in vivo* l'importance de ces FcγR : l'effet antitumoral du rituximab est aboli chez les souris déficientes en FcγR activateurs tandis que celui du trastuzumab est drastiquement réduit [14]. À l'inverse, l'effet antitumoral de ces deux anticorps est accru chez les souris déficientes en FcγRII inhibiteur [14]. Cette publication a joué un rôle majeur dans la prise de conscience de l'importance du Fc et des FcγR dans le mécanisme d'action du rituximab, mais encore plus dans celui du trastuzumab dont beaucoup pensaient qu'il ne faisait qu'antagoniser le récepteur Her-2. Le recrutement des effecteurs exprimant les FcγR n'était donc plus limité à l'oncohématologie, mais devenait important aussi pour les tumeurs solides.

Malgré tout, compte tenu de la complexité du modèle utilisé (tumeurs humaines, anticorps humains, cellules effectrices de la souris, souris immunodéficientes croisées avec des souris invalidées génétiquement...), il importait de rester prudent sur la transposition de ces résultats à l'Homme. Qui plus est, on sait maintenant que les récepteurs FcγR de la souris diffèrent de ceux de l'Homme par leur nombre, leur nature, leur expression cellulaire, leur signalisation, leur affinité pour les IgG1 humaines, etc. [13]. Il était donc impossible sur la base de ces travaux de savoir

quel(s) FcγR humain(s) pouvaient être impliqués, et si même ils l'étaient, car il ne faut pas oublier que les IgG1 recrutent également le complément.

3 POLYMORPHISME FCGR3A ET RÉPONSE AUX ANTICORPS CYTOLYTIQUES

Une nouvelle étape clinique décisive fut franchie en 2001 par notre équipe en cherchant à aborder la question de la variation interindividuelle de réponse au rituximab et leurs éventuelles causes génétiques [15]. Une telle approche de pharmacogénétique n'avait jamais été mise en œuvre pour un anticorps monoclonal recombinant. L'approche gène-candidat nous apparaissait la plus directe, en sélectionnant les gènes codant les FcγR (*FCGR*). Ceux-ci sont regroupés sur le bras long du chromosome 1 humain et présentent un important polymorphisme génétique, y compris dans les régions codantes. On sait par exemple qu'un polymorphisme de *FCGR2A* entraîne une modification de la position 131 du FcγRIIA et fait varier l'affinité pour les IgG2. En réalité, c'est surtout le polymorphisme de *FCGR3A* décrit dès 1989 que nous soupçonnions de pouvoir influencer la réponse au rituximab. En effet, le changement d'acide aminé en position 158 du FcγRIIIA avait été décrit en 1997 comme influençant la liaison aux IgG1. Nous avons pu bénéficier d'une génothèque collectée en marge d'un essai thérapeutique de phase II, consistant à l'administration de rituximab seul (sans chimiothérapie) dans des lymphomes de faible masse tumorale [16]. Le résultat de l'étude fut sans appel, tandis que le polymorphisme *FCGR2A* n'influencait pas la réponse, celui de *FCGR3A* l'influencait clairement, et ce malgré le petit nombre de patients. Plus précisément, les patients homozygotes pour l'allèle le plus rare (codant l'alloforme 158V (valine) du FcγRIIIA) répondaient nettement mieux à deux mois et à un an que les patients porteurs de l'allèle le plus fréquent (codant l'alloforme 158F (phénylalanine)), qu'ils soient homozygotes ou hétérozygotes [15].

Bien que l'étude n'ait pu être répliquée sur une autre cohorte, sa publication eut un retentissement considérable dans l'industrie pharmaceutique, car elle révélait un mécanisme d'action possiblement critique, celui de l'interaction du rituximab avec le FcγRIIIA [17]. Il convenait cependant d'être prudent, car une simple association entre un phénotype clinique (la réponse au rituximab) et un polymorphisme génétique (le polymorphisme de *FCGR3A*) pouvait ne pas s'expliquer par l'intervention du FcγRIIIA, en raison notamment de déséquilibres de liaison toujours possibles entre *FCGR3A* et d'autres gènes, en particulier les autres *FCGR* du cluster. D'ailleurs, lorsque fut publiée la première étude confirmant nos données [18], une double association fut retrouvée avec le *FCGR3A* d'une part, et avec le *FCGR2A* d'autre part. D'autres observations semblables furent publiées, ce qui nous amena à étudier de plus près le déséquilibre de liaison entre ces deux gènes. Dans la population caucasienne, il apparut alors que l'association avec *FCGR2A* s'expliquait en fait par l'association avec *FCGR3A*. D'autres déséquilibres de liaison restent également possibles, comme

celui que nous avons récemment montré entre *FCGR3A* et *FCGR2C* [19]. La complexité de cette région génétique, avec la possibilité de variations du nombre de copie de gènes, doit en fait inciter à une grande prudence.

Le fait que l'influence du polymorphisme de *FCGR3A* sur la réponse aux anticorps cytotolytiques soit devenu un standard tient aussi au fait que cette association ait été retrouvée à de nombreuses reprises pour le rituximab, dans des indications diverses, mais qu'il a aussi été démontrée pour d'autres anticorps cytotolytiques. Nous-mêmes avons été les premiers à démontrer une association avec la réponse à l'infliximab (anti-TNF- α , antigène qui peut être membranaire) dans la maladie de Crohn et avec la réponse au sérum antilymphocytaire [20]. L'intérêt pour le polymorphisme *FCGR3A* dans la réponse aux anticorps anticancéreux s'est également accru lorsqu'une équipe italienne a pu montrer une association avec la réponse au trastuzumab dans le cancer du sein [21] et qu'une équipe de Montpellier [22] suivie par d'autres, a pu montrer une association avec la réponse au cétuximab dans le cancer du côlon. Quelle que soit la cible membranaire, la variation *FCGR3A* peut influencer la réponse aux anticorps cytotolytiques. À chaque fois, ce sont les patients homozygotes pour l'allèle V qui répondent le mieux au traitement.

Certes, l'association avec *FCGR3A* n'est pas systématiquement retrouvée, mais de nombreux facteurs peuvent « noyer » l'effet de ce polymorphisme, à commencer par les associations avec la chimiothérapie où les posologies, et les effectifs peuvent alors s'avérer insuffisants pour faire ressortir un effet moins dominant. L'absence d'association observée ne contredit donc pas les nombreuses associations qui ont été trouvées, avec de nombreux anticorps.

La détermination en routine clinique de ce polymorphisme génétique ne présente à l'heure actuelle qu'un intérêt très limité. En effet, à quoi sert-il de diagnostiquer les ~16 % de patients (homozygotes VV) qui sont susceptibles de mieux répondre que la grande majorité des patients. On ne peut pas priver de traitement 84 % des patients au prétexte qu'ils seraient moins certains de répondre !

4 RELATION GÉNOTYPE/PHÉNOTYPE IN VITRO : IMPORTANCE DU Fc γ RIIIA/CD16A

Prouver l'implication directe de la variation du récepteur Fc γ RIIIA/CD16a sur la variation de réponse au rituximab et aux autres anticorps nécessitait de transposer *in vitro* la relation génotype/phénotype. La modélisation moléculaire du Fc γ RIIIA sous ses deux alloformes, et de son interaction avec le Fc de l'IgG1 prédisait un encombrement par la phénylalanine et une moins bonne interaction qu'avec la valine à la position 158 [23]. Néanmoins, il fallut attendre quelques temps pour observer de façon directe que l'affinité de l'IgG1 pour l'alloforme Fc γ RIIIA-158V était supérieure à celle pour l'alloforme Fc γ RIIIA-158F [24]. Ces mesures faites avec du Fc γ RIIIA soluble recombinant

nécessitaient d'être confirmées avec du FcγRIIIA natif, ce que nous avons pu montrer sur des cellules isolées de donneurs de sang [25]. Malgré ces éléments prouvant une variation d'affinité, l'hypothèse d'une plus grande expression du FcγRIIIA-158V à la surface des lymphocytes NK semblait pouvoir être étayée par divers arguments [26]. De nouveaux travaux nous ont alors permis de prouver qu'il n'y avait aucune surexpression de l'alloforme FcγRIIIA-158V, et que seule l'augmentation d'affinité expliquait l'effet observé [27]. De fait, l'activation des NK provenant de donneurs de différents génotypes par du rituximab immobilisé s'accroît avec le nombre d'allèle FCGR3A-158V [27].

Dans un test d'ADCC classique mettant en jeu des lymphocytes NK purifiés de donneurs, la concentration de rituximab permettant d'obtenir 50 % de lyse des cellules-cibles s'est révélée en moyenne quatre fois moindre avec des NK d'individus VV qu'avec des NK d'individus FF, tandis que la cytotoxicité maximale n'était pas différente, traduisant un potentiel équivalent des effecteurs quel que soit le polymorphisme génétique [25]. Ainsi, la variation d'affinité se traduit bien par une variation de la concentration d'anticorps requise pour exercer l'effet attendu ; en d'autres termes, les patients VV doivent pouvoir continuer à répondre au traitement par rituximab lorsque les concentrations de rituximab chutent, ce qui explique bien le décalage des courbes de survie sans progression que l'on observe en fonction du polymorphisme [15]. Cette découverte a bien entendu des conséquences en matière d'optimisation des posologies d'anticorps administrés [28], et elle offre la possibilité à un industriel d'augmenter les doses s'il s'avère que seuls les patients homozygotes VV répondent à un anticorps en phase de développement clinique.

L'insuffisance d'affinité de l'alloforme FcγRIIIA-158F ouvre aussi la possibilité de travailler à améliorer l'affinité des anticorps pour le FcγRIIIA. Les tests que nous-mêmes ou les industriels ont développés pour documenter la variation d'affinité des alloformes de FcγRIIIA se trouvent alors pouvoir être utilisés pour cribler différents variants d'anticorps. Ces tests, le plus souvent des tests d'ADCC ou des variantes étudiant l'activation de cellules ou de lignées NK, ont contribué à populariser la notion d'« ADCC », sachant que rien ne permet d'évaluer la part de ce mécanisme parmi ceux liés au FcγRIIIA, dans l'effet thérapeutique.

5 VARIANTS Fc AMÉLIORANT LA LIAISON AU FcγRIIIA/CD16A

Différents industriels se sont alors intéressés à la façon d'améliorer l'affinité de la portion Fc de l'IgG1 pour le FcγRIIIA-158F, soit en introduisant des mutations dans la séquence peptidique, soit en jouant sur la composition du N-glycane en position 297 dans le domaine CH2. Si quelques technologies existaient déjà avant notre publication de 2002, comme celles du LFB, de Glycart, d'IDEC ou de Genentech, la prise de conscience de l'importance du FcγRIIIA a apporté du crédit à l'ingénierie du Fc en vue d'accroître son affinité pour FcγRIIIA et a incité de nombreux industriels

à en mettre au point de nouvelles. Conséquences de cet enthousiasme, plusieurs anticorps ayant bénéficié d'une telle ingénierie se trouvent à différents stades de développement clinique (**tableau 1**). Deux anticorps sont mêmes déjà sur le marché, l'obinutuzumab, et le mogamulizumab. Dans les deux cas, l'élément déterminant pour l'accroissement de l'affinité pour le FcγRIIIA est une moindre présence de fucose sur le N-glycane du CH2, quelle que soit la façon de l'obtenir. Les nombreux autres anticorps en développement (**tableau 1**) permettront de dire si l'amélioration de l'affinité pour le FcγRIIIA apporte réellement un gain d'activité clinique ; il est encore trop tôt pour le dire.

DCI / Nom commercial Noms développement	Cible	Indications	Sociétés	Phase Clinique
mogamulizumab / POTELIGEO KW-0761 / AMG761	CCR4	Leucémie aiguë T de l'adulte (HTLV-1)	Kyowa Hakko Kirin	C
obinutuzumab / GAZYVA GA101 / RO5072759	CD20	LLC	Roche - GlycArt	C
ocaratuzumab AME-133v / LY2469298	CD20	Lymphomes folliculaires Polyarthrite rhumatoïde	Mentrik Biotech	III
benralizumab KHK4563 / BIW-8405 / MEDI-563	IL-5R	Asthme	Kyowa Hakko Kirin MedImmune AstraZeneca	III
roledumab / DMATRIA	Rhésus D	Prévention de l'allo- immunisation fœto-maternelle	LFB	IIb
ecromeximab KM871 / KW2871	Ganglioside GD3	Mélanome malin	Kyowa Hakko Kogyo	II
TrasGEX / GT-Mab 7.3-GEX	HER-2	Cancer du sein	Glycotope	II
margetuximab MGAH22	HER-2	Cancer du sein	MacroGenics	II
MEDI-551	CD19	Hémopathies lymphoïdes B	MedImmune Kyowa Hakko Kirin	II
Xmab5574 / MOR208	CD19	Leucémie aiguë lymphoblastique	Xencor MorphoSys AG	II
ublituximab TGTX-1101 / LFB-R603 / EMAB-6	CD20	Hémopathies lymphoïdes B	TG therapeutics LFB	II
GT-MAB 2.5-GEX™	MUC1	Tumeurs solides	Glycotope	II
BIW-8962	Ganglioside GM2	Cancer du poumon à petites cellules	Kyowa Hakko Kirin	I/II
imgatuzumab GA201 / RG7160	HER-1	Tumeurs solides	Roche - Genentech	I/II
GT-MAB 5.2-GEX™ CetuGex	HER-1	Tumeurs solides	Glycotope	I

DCI / Nom commercial Noms développement	Cible	Indications	Sociétés	Phase Clinique
CSL362	IL-3R α / CD123	Leucémie aiguë myéloblastique	CSL Limited Janssen Biotech	I
KHK2804 / CEP-37250	Anti-Tumor Specific Glycoprotein	Tumeurs solides	Kyowa Hakko Kirin Teva	I
KHK2898	CD98	Tumeurs solides	Kyowa Hakko Kirin	I
MEDI-570	ICOS	Lupus érythémateux disséminé	MedImmune AstraZeneca	I
MGA271	B7-H3	Tumeurs solides	MacroGenics Servier	I
RG7116 / RO5479599	HER-3	Tumeurs solides	Roche - Genentech	I
KHK-4083	OX40	Psoriasis	Kyowa Hakko Kirin	I
XmAb2513	CD30	Lymphomes	Xencor	I
KHK2866	HB-EGF	Tumeurs solides	Kyowa Hakko Kirin	I
mAb 33.1 / BI 836858	CD33	Leucémie aiguë myéloblastique	Boehringer Ingelheim	I
mAb 37.1 / BI 836826	CD37	Hémopathies lymphoïdes B	Boehringer Ingelheim	I
3C23K	MISRII	Cancer de l'ovaire	GamaMabs (LFB)	-
KM2760	CCR4	Lymphomes hodgkiniens	Kyowa Hakko Kirin	-
KM3065	CD20	-	Kyowa Hakko Kogyo	-
XmAb5592	HM1.24	Myélomes multiples	Xencor Chugai Pharmaceutical	-
BLX-300	CD20	Hémopathies lymphoïdes B LLC	Biolex Therapeutics	-

En blanc, les variants peptidique ; en vert, les variants de glycosylation.

DCI : dénomination commune internationale ; LLC : leucémie lymphoïde chronique

Tableau 1 : Anticorps en développement modifiés dans leurs parties Fc, dans le but d'augmenter les capacités ADCC.

CONCLUSION

Si la découverte de l'influence du polymorphisme *FCGR3A* sur la réponse aux anticorps cytolytiques a eu notamment pour conséquences de stimuler le développement d'anticorps dont le Fc a une meilleure affinité pour le Fc γ RIIIA, les entreprises biotechnologiques ont en rayon de nombreux autres variants d'IgG ayant par exemple une affinité améliorée pour le C1q afin d'amplifier l'activation du complément, ou une

moindre affinité pour le récepteur inhibiteur FcγRIIB afin d'accroître les mécanismes dépendants des FcγR activateurs. Néanmoins, faute d'argument clinique solide qui puisse permettre de guider le développement de tels variants, aucune percée n'a encore été tentée dans ce domaine.

D'autres stratégies ont d'ores et déjà été testées, comme l'association avec des cytokines ou des agents immunostimulants, afin de renforcer l'activation des cellules exprimant le FcγRIIIA. Cette *success story* du polymorphisme *FCGR3A* aura donc bien ouvert de multiples nouveaux champs d'investigation dans le domaine de l'immunothérapie par anticorps.

► Références bibliographiques

1. Watier H. (2014) Biothérapies, immunothérapies, thérapies ciblées, biomédicaments... De quoi faut-il parler ? Med. Science.
2. Huggett B. (2013) Public biotech 2012--the numbers. Nat. Biotechnol. 31: 697-703.
3. Isaacs J.D., et al. (1996) A therapeutic human IgG4 monoclonal antibody that depletes target cells in humans. Clin. Exp. Immunol. 106: 427-33.
4. Hale G., et al. (2002) Alemtuzumab (Campath-1H) for treatment of lymphoid malignancies in the age of nonmyeloablative conditioning? Bone Marrow Transplant. 30: 797-804.
5. Reff, M.E., et al. (1994) Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. Blood 83: 435-45.
6. Vermorken J.B., et al. (2013) Cisplatin and fluorouracil with or without panitumumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck (SPECTRUM): an open-label phase 3 randomised trial. Lancet Oncol. 14: 697-710.
7. Cragg M.S., et al. (2003) Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. Blood 101: 1045-52.
8. Golay J., et al. (2001) CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. Blood 98: 3383-9.
9. Manches O., et al. (2003) In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. Blood 101: 949-54.
10. Wang S.-Y., Racila E., Taylor R.P., Weiner G.J. (2008) NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement. Blood 111: 1456-63.
11. Di Gaetano N., et al. (2003) Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. J. Immunol. 171: 1581-7.
12. Pawluczko A.W., et al. (2009) Binding of submaximal C1q promotes complement-dependent cytotoxicity (CDC) of B cells opsonized with anti-CD20 mAbs ofatumumab (OFA) or rituximab (RTX): considerably higher levels of CDC are induced by OFA than by RTX. J. Immunol. 183: 749-58.
13. Guillems M., Bruhns P., Saeys Y., Hammad H., Lambrecht B.N. (2014) The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. Nat. Rev. Immunol. 1-15.
14. Clynes R.A., Towers T.L., Presta L.G., Ravetch J.V. (2000) Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. Nat. Med. 6: 443-6.
15. Cartron G., et al. (2002) Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. Blood 99: 754-8.

16. Colombat P., et al. (2001) Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients with follicular lymphoma with a low tumor burden: clinical and molecular evaluation. *Blood* 97: 101-6.
17. Maloney D.G. (2002) Another piece of the puzzle. *Blood* 99: 729b-730.
18. Weng W.-K., Levy R. (2003) Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 21: 3940-7.
19. Lejeune J., et al. (2008) Evidence for linkage disequilibrium between Fcgamma RIIa-V158F and Fcgamma RIIa-H131R polymorphisms in white patients, and for an Fcgamma RIIa-restricted influence on the response to therapeutic antibodies. *J. Clin. Oncol.* 26: 5489-91; author reply 5491-2.
20. Louis E., et al. (2004) Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 19: 511-9.
21. Musolino A., et al. (2008) Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 26: 1789-96.
22. Bibeau F., et al. (2009) Impact of Fc{gamma}RIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J. Clin. Oncol.* 27: 1122-9.
23. Oshima Y., Fujimura A. (2002) Implication for how the single nucleotide polymorphism (SNP) of Fc receptor, Fc gamma RIIa alters the interaction with anti-CD20 monoclonal antibody. *Blood* 99: 4649; author reply 4650.
24. Okazaki A., et al. (2004) Fucose depletion from human IgG1 oligosaccharide enhances binding enthalpy and association rate between IgG1 and FcgammaRIIIa. *J. Mol. Biol.* 336: 1239-49.
25. Dall'Ozzo S., et al. (2004) Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res.* 64: 4664-9.
26. Hatjiharissi E., et al. (2007) Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the Fc{gamma}RIIIa-158 V/V and V/F polymorphism. *Blood* 110: 2561-4.
27. Congy-Jolivet N., et al. (2008) Fc gamma RIIa expression is not increased on natural killer cells expressing the Fc gamma RIIa-158V allotype. *Cancer Res.* 68: 976-80.
28. Ternant D., et al. (2012) Model-based design of rituximab dosage optimization in follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 73: 597-605.

⑦ Impact de cette découverte

L'impact de cette découverte de notre équipe se mesure également au regard des publications portant sur des résultats d'essais cliniques évaluant le polymorphisme du FcγRIIIA et la réponse à un traitement par anticorps thérapeutique. Plus d'une centaine de publications ont ainsi été recensées (Tableau 1), démontrant pour la majorité une corrélation entre l'allotype FcγRIIIA-158V et la bonne réponse au traitement.

Tableau 1 : Essais cliniques testant la corrélation entre le polymorphisme du FcγRIIIA et la réponse à un anticorps

Anticorps	Pathologies	Association démontrée*	Pas d'association*
Rituximab, IgG1 anti-CD20			
HEMOPATHIES			
	Lymphomes non-Hodgkiniens	201-216	217-233
	Leucémie lymphoïde chronique		234,235
	Maladie de Waldenström	236-238	
	Désordres lymphoprolifératifs post-transplantation CD20-positifs		239
MALADIES AUTO-IMMUNES			
	Lupus érythémateux disséminé	240,241	
	Polyarthrite rhumatoïde	242-244	245
	Purpura thrombopénique idiopathique	246,247	
	Glomérulonéphrite dans les cryoglobulinémies associées au VHC	248,249	
	Neutropénie induite par le rituximab	250-252	
	Neuromyéélite optique	253	
	Neuropathie à anticorps anti-MAG	254	
HEMOPATHIES MALIGNES Lymphoïdes B			
Ocaratuzumab, IgG1 anti-CD20			
	Lymphome folliculaire	255	256
Tositumomab, mIgG2a anti-CD20			
	Lymphome folliculaire	203,204	

Galiximab IgG1 anti-CD80		
Lymphome folliculaire		257
Alemtuzumab, IgG1 anti-CD52		
Leucémie lymphoïde chronique		258
Dacetuzumab IgG1 anti-CD40		
Lymphome B à grande cellules		259
MALADIES AUTO-IMMUNES		
Infliximab, IgG1 anti-TNF α		
Psoriasis	260	
Arthrite inflammatoire	261	
Polyarthrite rhumatoïde	262,263	264–267
Maladie de Crohn	2,268	269,270
Spondylarthrite	266	
Etanercept, protéine de fusion anti-TNF α		
Psoriasis	260	
Arthrite inflammatoire et arthrite psoriasique	261	271
Polyarthrite rhumatoïde		264,267,272
Adalimumab, IgG1 anti-TNF α		
Psoriasis	260	
Arthrite inflammatoire	261	
CANCERS SOLIDES		
Cetuximab, IgG1 anti-EGFR		
Cancer colorectal	273–283	277,284–289
Carcinome épidermoïde de la tête et du cou		290
Cancer de l'estomac		291
Carcinome épidermoïde de la peau		292
Panitumumab, IgG2 anti-EGFR		
Cancer colorectal	279	284,285

Edrecolomab, mIgG2a anti-17-1A		
Cancer colorectal	293	
Ganitumab, IgG1 anti-IGF-1R		
Cancer colorectal		294
Trastuzumab, IgG1 anti-ERBB2		
Cancer du sein	295,296	297-305
Conatumumab, IgG1 anti-TRAIL-R2		
Cancer du poumon non à petites cellules	306,307	
Cancer colorectal métastatique	306	294
Cancer du pancréas métastatique		306
hu14.18-IL2, protéine de fusion, anti-GD2		
Neuroblastome		308
ETUDES de PHARMACOCINETIQUE		
Pharmacocinétique des Traitements de greffés rénaux		
Antilymphocyte serum (cheval)		
Greffés rénaux	3	
Antithymocyte serum (lapin)		
Greffés rénaux	309	
Pharmacocinétique des Traitements préventif de l'allo-immunisation Rhésus		
BRAD-3 IgG3, anti-D		
Anti-RhD	310	
BRAD-5 IgG1, anti-D mixé avec BRAD-3 75%-25% (approximation de polyclonaux anti-D)		
Anti-RhD		310
anti-RhD IgG mAb		
Anti-RhD	311	

*Les nombres correspondent aux articles disponibles dans la partie Bibliographie.

⑧ Le FcRn, la demi-vie des anticorps et la biodistribution

En 1909, Ransom rapporte le cas d'une femme enceinte atteinte de diphtérie, traitée par sérothérapie, et qui accoucha 24 heures après avoir reçu les deux injections curatives, d'un enfant ne présentant étonnamment pas de signe de la maladie. Il supposa alors avoir donné une dose prophylactique à l'enfant « via le sang de sa mère »³¹². Le phénomène ne fut élucidé que 53 ans plus tard. En 1964, Brambell et ses collègues imaginent l'existence d'un récepteur spécifique responsable du transport des IgG de la mère à l'enfant, en se fondant sur l'observation que seule cette classe d'immunoglobuline avait une demi-vie plasmatique longue et traversait le placenta, et que le phénomène était saturable et nécessitait une portion Fc³¹³. Les cellules impliquées dans le transfert des IgG présentant des microvillosités, Brambell imagina que les IgG pouvaient être internalisées, et avança l'hypothèse que la fixation à ce récepteur pouvait les protéger de la dégradation par les enzymes lysosomales, retardant leur catabolisme³¹³⁻³¹⁵. Un peu plus tard, il fut identifié que le mécanisme de transport se réalisait d'une façon dépendante du pH³¹⁶. Simister et Mostov clonèrent ce récepteur en 1989, à partir de cellules épithéliales de l'intestin grêle de rats nouveau-nés³¹⁷, et le dénommèrent récepteur néonatal à la portion Fc des IgG, ou *neonatal Fc receptor* en anglais (FcRn). Depuis cette découverte, le FcRn est maintenant parfaitement caractérisé du point de vue de sa structure et de sa distribution dans l'organisme.

Le FcRn est une protéine membranaire qui diffère des FcγR notamment par le fait qu'il appartient à la famille des molécules de la famille du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I³¹⁷, et qu'il est exprimé aussi bien sur les cellules hématopoïétiques que non hématopoïétiques³¹⁸. Le FcRn est un hétérodimère composé de la β2-microglobuline associée de façon non covalente à une chaîne lourde α transmembranaire repliée en trois domaines extracellulaires : α1, α2, et α3 (**Figure 19**). Il contient également une hélice transmembranaire et une queue cytoplasmique³¹⁹. Bien qu'il soit apparenté aux molécules de classe I du CMH, celui-ci ne peut accueillir de peptide et exercer une fonction de présentation d'antigène. Il se lie cependant au Fc des IgG et à l'albumine (**Figure 19**), au niveaux de sites différents, de telle façon que la fixation des IgG sur le FcRn n'influence pas celle de l'albumine³²⁰. La liaison au Fc s'opère selon une interaction dépendante du pH, l'IgG se liant favorablement à pH acide (< 6,5), et pas à pH neutre (> 7)^{321,322}. De par sa nature homodimérique, l'IgG peut simultanément lier deux molécules de FcRn, résultant en une interaction de forte affinité à pH 6³²³.

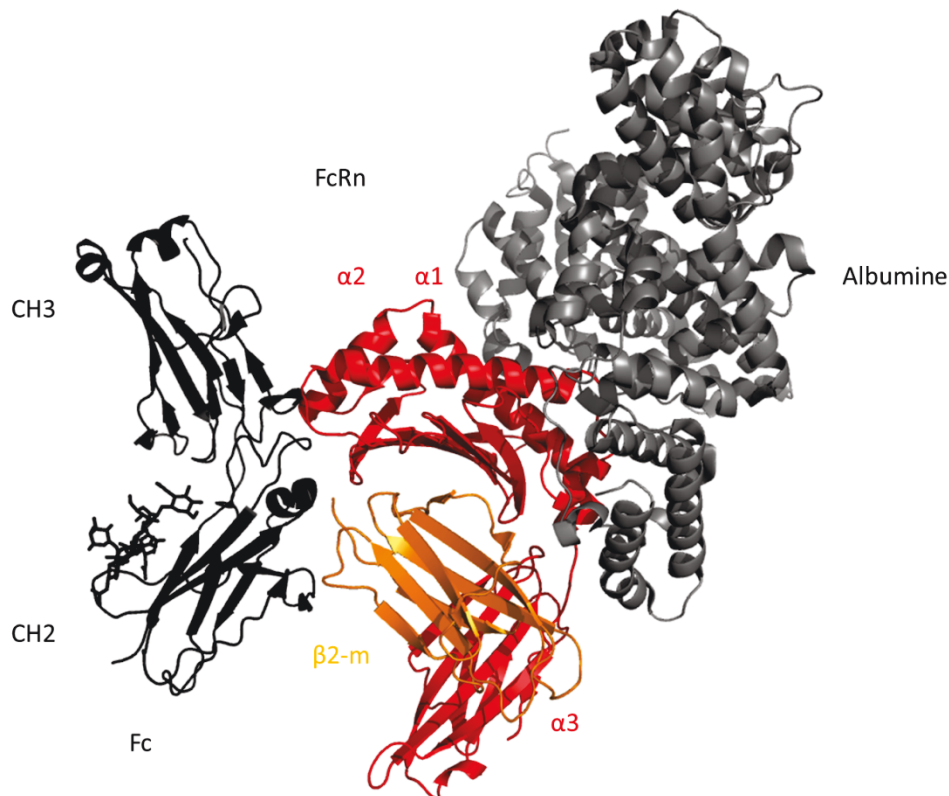


Figure 19 : Représentation tridimensionnelle du FcRn humain et de ses deux ligands

Les trois domaines α sont indiqués en rouge et la β 2-m est indiquée en orange. Le Fc est indiqué à gauche en noir, et l'albumine à droite en grise. Cette figure a été réalisée en utilisant PyMOL Molecular Graphics System, version 1.7.4 (Schrödinger) à partir du fichier PDB : 4N0U³²⁴.

La liaison au Fc des IgG s'opère au niveau de l'interface entre les domaines CH2 et CH3 (Figure 19 et Figure 20), selon trois sites, un cœur hydrophobe et deux sites électrostatiques. L'isoleucine en position 253 de l'IgG est conservée à travers les espèces, et elle est critique pour l'interaction avec le FcRn, en faisant de nombreux contacts hydrophobes avec des acides aminés du domaine α 2 du FcRn (leucine en position 112, phénylalanine en position 117, et tryptophane en position 131)³²⁵. La caractéristique de liaison dépendante du pH est menée par un résidu histidine clé en position 310 du Fc d'IgG, qui devient chargé positivement quand le pH approche de 6-6,5, résultant en la formation d'une liaison électrostatique avec l'acide glutamique en position 115 du FcRn. L'histidine en position 435 sur le Fc interagit également par liaison électrostatique avec l'acide aspartique en position 130 du FcRn et contribue également à la liaison dépendante du pH³²⁴.



Figure 20 : Mise en évidence des acides aminés de contact avec le FcRn sur une représentation tridimensionnelle d'un Fc d'IgG1

Le Fc est représenté en noir, et les acides aminés important pour la liaison au FcRn en rouge (I253, H310, H435). Cette figure a été réalisée en utilisant PyMOL Molecular Graphics System, version 1.7.4 (Schrödinger) à partir du fichier PDB : 1HZH⁵⁶

Dans le cadre de sa liaison aux immunoglobulines, le FcRn a deux fonctions majeures, le recyclage et la transcytose des IgG. Dans presque tous les types cellulaires, FcRn est localisé principalement dans des vésicules intracellulaires, comme les endosomes de recyclage³²⁶. Son expression à la surface des cellules est ainsi limitée, et le pH de l'environnement extracellulaire n'est pas favorable à l'interaction IgG-FcRn. Ainsi, les IgG semblent entrer dans la cellule par pinocytose non spécifique (**Figure 21**). Les IgG endocytées suivent la voie endosomale, et se fixent au FcRn dans l'endosome précoce, où le microenvironnement acide (pH ~6) favorise cette interaction³²⁷. Le complexe IgG-FcRn évite ainsi la dégradation dans la voie lysosomale (**Figure 21**) et retourne à la membrane plasmique, où, lors de la fusion membranaire, le complexe IgG-FcRn se dissocie en raison du pH extracellulaire qui remonte³²⁸. Ce mécanisme permet ainsi d'améliorer grandement la demi-vie de la protéine, et est responsable de la très bonne demi-vie des immunoglobulines G, qui avoisine les 21 jours. Les IgG excédentaires et les autres

protéines qui ne se sont pas associées au FcRn suivent la voie lysosomale de plus en plus acide, et sont dégradées (**Figure 21**). En plus de ce recyclage, le FcRn participe à la transcytose des IgG d'un pôle à l'autre des épithéliums ou des endothéliums, permettant d'assurer la biodistribution dans l'organisme (**Figure 21**). En plus de ces fonctions bien connues, le FcRn a également été décrit comme étant un élément crucial dans la phagocytose. L'absence de ce récepteur ou la réduction de la liaison de l'IgG à celui-ci ayant montré une réduction significative de la phagocytose³²⁹.

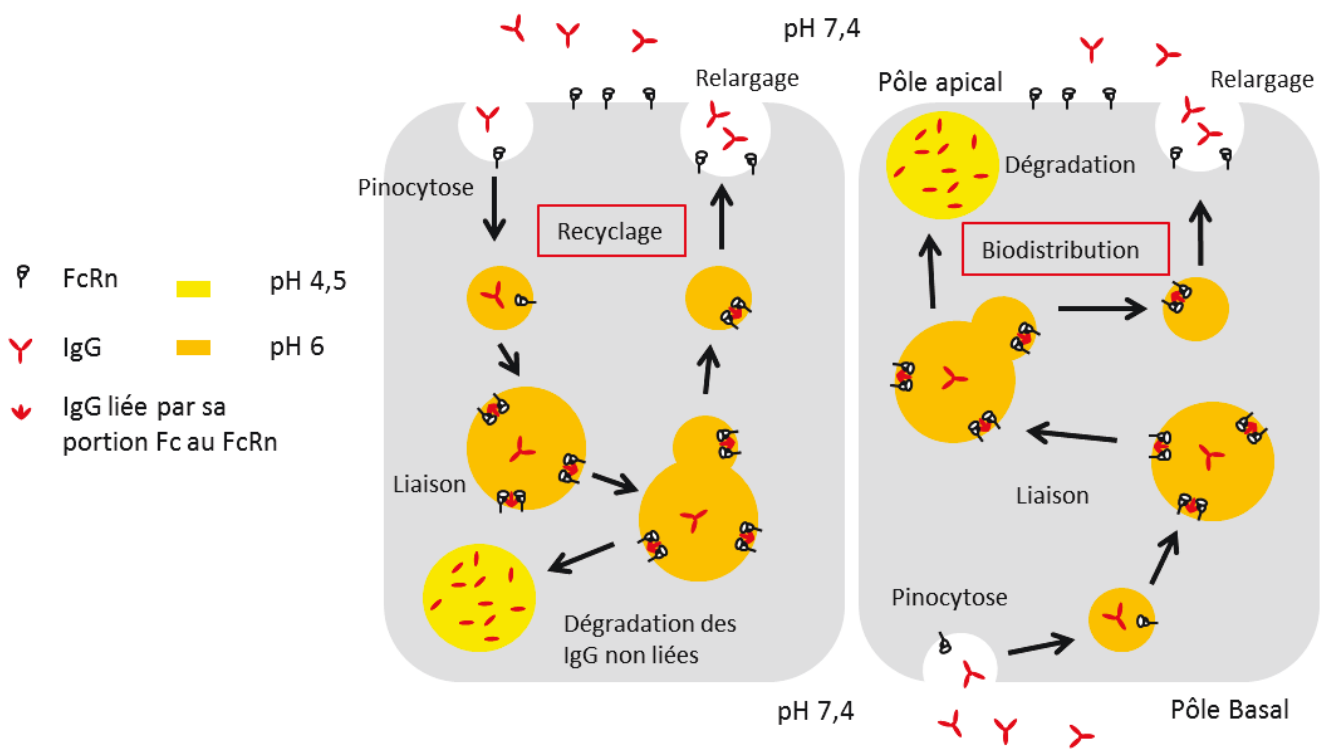


Figure 21 : Représentation schématique du recyclage et de la transcytose des IgG par le FcRn

La cellule internalise les IgG par pinocytose dans des vésicules de transport qui fusionnent avec d'autres pour produire un endosome dont le pH s'acidifie, permettant au FcRn de se lier aux IgG, dans la limite des molécules de FcRn disponibles. Les FcRn liés à des IgG s'organisent dans les vésicules de transport, et relarguent les IgG de façon à recycler ou procéder à la transcytose au niveau de la membrane plasmique le pH est plus élevé. Les IgG sont ainsi de nouveau en extracellulaire.

Trois des quatre sous-classes d'immunoglobulines, IgG1, IgG2 et IgG4 ont une demi-vie de 21 jours, résultant d'une liaison importante au FcRn. La dernière, l'IgG3, contient une mutation en position 435, où l'histidine est remplacée par une arginine (Figure 16), entraînant une diminution de liaison au FcRn, et une demi-vie de seulement 8 jours. Cependant, certains allotypes d'IgG3 montrent une restauration de la présence de cette histidine en position 435, et ont ainsi une meilleure demi-vie que leurs consœurs⁶⁴. Une différence de liaison au FcRn a

également été caractérisée pour les différents allotypes d'IgG1, montrant qu'un allotype non présent actuellement dans les anticorps thérapeutiques, G1m (3,1), contenant une arginine en position 214, un acide aspartique en position 356 et une leucine en position 358, se liait davantage au FcRn et réalisait une meilleure transcytose⁹². Ceci est d'autant plus étonnant que ces trois positions sont éloignées du site de liaison à FcRn.

⑨ Interaction avec la protéine A et la protéine G pour la purification

Les protéines A et G sont des protéines bactériennes qui se lient au Fc des IgG humaines, mais également à celles des autres espèces. Ces deux protéines interagissent avec le Fc au niveau de l'interface CH2-CH3, chevauchant le site de liaison au FcRn³³⁰⁻³³². Elles sont largement utilisées dans des matrices d'affinité pour purifier des IgG. La protéine G se lie aux quatre sous-classes d'IgG^{333,334}, alors que la protéine A se lie seulement aux IgG1, 2 et 4, et à certains allotypes d'IgG3 contenant une histidine en position 435 plutôt qu'une arginine³³⁵. En plus de ce site « classique » d'interaction avec l'IgG, la protéine G semble également se lier plus faiblement au niveau du CH1 des IgG^{336,337}, sauf l'IgG2³³⁸. Industriellement, la protéine A est préférée en raison de sa plus faible affinité pour les IgG, puisqu'elle nécessite ainsi une diminution de pH moins importante que pour la protéine G, facilitant la purification.

⑩ Conclusion du chapitre et description d'IgG4

La liaison à ces différents ligands de la partie Fc caractérise les propriétés des quatre sous-classes d'immunoglobulines, permettant ainsi pour un anticorps thérapeutique un « choix » d'isotype de chaîne lourde en fonction des propriétés pharmacologiques désirées. Ainsi, l'IgG1 et l'IgG3 furent rapidement identifiées comme les isotypes « cytolytiques », et furent envisagées quand l'élimination de la cible était nécessaire. En réalité, l'IgG3 n'est jamais utilisée dans le cadre des anticorps thérapeutiques en raison de sa plus faible demi-vie, qui est en général de 8 jours contre 21 pour les autres sous-classes. IgG2 et IgG4 montrèrent au contraire dès les premières études un manque flagrant de capacités cytolytiques, principalement dans leur activité de complément et d'ADCC^{114,115,339}. L'importance que tenait le complément

dans les esprits à la fin des années 80 pour ce qui était de l'élimination de la cellule-cible, fit que la faible différence de liaison au C1q entre l'IgG2 et l'IgG4 alla en faveur d'un développement des IgG4 quand l'activité cytolytique n'était pas désirée. Depuis, avec l'amélioration des connaissances sur les récepteurs Fcγ, on sait qu'IgG4 ne se lie pas seulement au FcγRI¹⁹⁸, mais également à FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, et FcγRIIIA, particulièrement l'allotype V158^{157,184}. Cette dernière information est particulièrement importante, puisque l'IgG4 était considérée, comme énoncé précédemment, comme une sous-classe incapable de cytotoxicité, notamment liée à sa non-liaison au FcγRIIIA. Une étude clinique comparant chez l'homme les deux isotypes de chaîne lourde γ1 et γ4 sur le Campath, un anticorps anti-CD52, avait d'ailleurs déjà montré une activité cytolytique avec l'isotype γ4 chez plusieurs patients avant l'administration de l'isotype γ1³⁴⁰. De plus, une autre étude clinique, plus tragique cette fois, a montré que l'administration du TGN1412, une IgG4 anti-CD28, était loin d'être passive, puisque ayant entraîné un orage cytokinique chez tous les patients, lors d'une phase I tragique, du fait d'un cross-linking avec le FcγRIIB³⁴¹. Ainsi, pour IgG4, bien que les propriétés effectrices soient moindre comparées à IgG1¹⁵⁷, elles méritent d'être prise en compte, et l'utilisation de cette sous-classe comme une immunoglobuline non cytolytique est erronée (Tableau 2).

Tableau 2 : Résumé des propriétés pharmacologiques des quatre sous-classes d'immunoglobulines G

Sous-classe	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
C1q	++	+	+++	-
FcγRI	++++	-	++++	++++
FcγRIIA H131	+++	++	++	++
FcγRIIA R131	+++	+	++	++
FcγRIIB/C	++	+	++	++
FcγRIIIA V158	+++	+	++++	++
FcγRIIIA F158	+++	+	+++	++
FcγRIIIB SH	++	-	+++	-
FcγRIIIB NA1	++	-	+++	-
FcγRIIIB NA2	++	-	+++	-
FcRn (à pH <6.5)	+++	+++	++*	+++
Protéine A	+++	+++	-*	++
Protéine G	+++	+++	+++	+++

++++ Liaison de haute affinité ; +++ Bonne liaison ; ++ Liaison d'affinité moyenne ; + liaison de faible affinité ; - Pas de liaison ; * : dépend de l'allotype d'IgG. Adapté de Rispens et al.³⁴² et de Bruhns et al.¹⁵⁷.

V-Les anticorps thérapeutiques

① La technologie des hybridomes

L'avènement des anticorps monoclonaux thérapeutiques démarre par une découverte publiée en 1975 par George Köhler et Cesar Milstein³⁴³. Cette découverte réside en la génération d'une cellule, dénommée hybridome, exprimant une seule espèce d'anticorps contre un seul et même épitope, d'où le terme de monoclonal. Pour ce faire, ils eurent l'idée de fusionner un lymphocyte normal avec un myélome en présence de virus de Sendai (permettant de fusionner les membranes plasmiques), créant une cellule hybride combinant deux propriétés des cellules parentales : la cellule hybride produirait le même anticorps que son lymphocyte B parental, et se multiplierait indéfiniment comme son myélome parental.

Il est intéressant de noter que malgré une discussion de Milstein avec le MRC britannique concernant un possible dépôt de brevet³⁴⁴, celui-ci n'eut pas lieu. Ainsi, la technique de production d'anticorps monoclonaux est restée libre de droit. Déjà à cette époque, les deux scientifiques semblaient mesurer les possibles retombées de cette découverte, comme en atteste la dernière phrase de leur papier : « *Such cultures could be valuable for medical and industrial use* ». Ils obtinrent finalement le prix Nobel de médecine en 1984 pour cette découverte.

② L'avènement des anticorps thérapeutiques

Köhler et Milstein ne croyaient pas si bien dire. A partir de leur technique restait cependant un long chemin à effectuer avant d'arriver aux anticorps thérapeutiques commercialisés aujourd'hui. La technique des hybridomes permettait seulement de produire des anticorps murins, dits « de première génération ». Plusieurs d'entre eux arrivèrent en développement clinique à la fin des années 1980, révélant de nombreuses difficultés.

Un premier anticorps murin monoclonal thérapeutique fut néanmoins commercialisé en 1986 : le muromonab-CD3, dans la prévention du rejet de greffe rénale. Cet anticorps est le seul à n'avoir pas hérité d'une Dénomination Commune Internationale (DCI) en -mab, puisqu'à l'époque les règles de nomenclature n'avaient pas encore été établies. Son immunogénicité ne pose pas problème ici puisqu'il est utilisé en « flash » thérapeutique.

Grâce aux avancées considérables de la biologie moléculaire au cours des années 1980, il fut possible de rendre les anticorps monoclonaux plus humains, avec l'espoir de réduire leur immunogénicité. Dès 1984, Morrison *et al.*³⁴⁵ décrivent la possibilité de coupler des régions variables murines (VH-VL), permettant de garder la spécificité, avec des régions constantes humaines (CH1-Fc pour la chaîne lourde et CH pour la chaîne légère) (**Figure 22**). Le premier anticorps chimérique arrivé sur le marché en 1994 est l'abciximab, et n'est en réalité qu'un Fab dépourvu de Fc antagonisant la glycoprotéine IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) plaquettaire et utilisé comme antiagrégant en soins intensifs cardiologiques. Le premier anticorps chimérique entier commercialisé fut le rituximab, approuvé en 1997. Cette IgG1 chimérique cible le CD20, et a permis d'obtenir des résultats cliniques exceptionnels dans la prise en charge des hémopathies B et de nombreuses affections auto-immunes. C'est également le premier anticorps anticancéreux approuvé.

L'ingénierie des anticorps fit encore un pas en avant en 1986, quand pour la première fois fut décrite une technique d'humanisation des domaines variables d'un anticorps. Contrairement aux anticorps dits chimériques, seuls les CDR restent murins, et la charpente est humaine (**Figure 22**). Le daclizumab fut le premier anticorps humanisé approuvé en 1997. C'est une IgG1 anti-CD25 approuvée dans la prise en charge du rejet de greffe. Il a rapidement été concurrencé par le basiliximab, qui donnait de meilleurs résultats, et a été retiré. Il revient aujourd'hui avec une nouvelle indication dans la sclérose en plaques. La première approbation d'une protéine de fusion contenant une portion Fc d'IgG eut lieu en 1998, avec l'étanercept (**Figure 23**). Composé du domaine extracellulaire du récepteur II du TNF α , fusionné à un Fc d'IgG1, l'étanercept est très utilisé en rhumatologie et en dermatologie.

Les premières approbations d'anticorps conjugués arrivèrent dès le début des années 2000, avec un anticorps couplé à un cytotoxique (ADC), un radioimmunoconjugué, et un fragment pegylé (**Figure 23**). Le premier ADC est le gemtuzumab ozogamicin, une IgG4 anti-CD33 conjuguée à l'ozogamicine, un agent cytotoxique dérivé de la calichéamycine. Utilisé dès 2000, cet ADC a finalement été retiré dix ans plus tard, du fait d'un manque évident de bénéfice. Le premier réel succès clinique pour un ADC est à mettre à l'actif du brentuximab vedotin, une IgG1 anti-CD30 approuvée en 2011 dans la Maladie de Hodgkin et le lymphome anaplasique systémique à grandes cellules. Le premier anticorps radiomarqué est l'ibritumomab tiuxetan, approuvé en 2002. Cet anticorps est composé d'une liaison thiourée covalente stable entre l'ibritumomab, IgG1 anti-CD20 murine, et le tiuxetan, un agent de chélation capable de piéger l'yttrium-90. L'émission bêta du radioisotope provoque des dégâts aux cellules cibles et aux cellules voisines,

ici permettant le traitement des lymphomes non hodgkiniens. Le premier fragment d'anticorps pegylé est le certolizumab pegol (**Figure 23**), approuvé en 2008. Ce Fab' humanisé anti-TNF est conjugué à du polyéthylène glycol pour le protéger de la dégradation, et est très utilisé en rhumatologie.

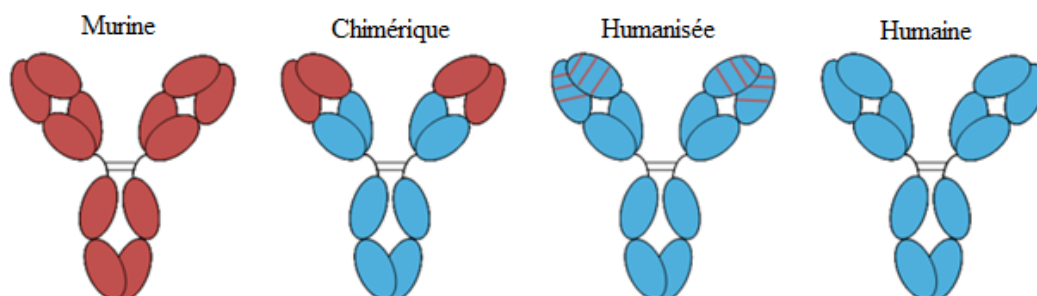


Figure 22 : Représentation schématique de l'humanisation progressive des anticorps thérapeutiques

Adapté d'Absolute Antibody³⁴⁶. Les portions murines sont indiquées en rouge, et les portions humaines en bleu. Les traits rouges sur l'anticorps humanisé indiquent les CDR murins.

Enfin, la possibilité de création d'anticorps totalement humains fut offerte grâce à deux approches différentes. La première est la technique de « phage display » décrite pour les anticorps en 1990 par McCafferty *et al.*³⁴⁷, et qui consiste en la construction d'une banque combinatoire de VH et VL humains exprimés à la surface de phages³⁴⁸. Ces phages sont ensuite criblés pour leur liaison à l'antigène-cible. Les phages pertinents sont ensuite amplifiés en *E. coli*. La deuxième est l'obtention de souris transgéniques exprimant un répertoire d'anticorps humains, par Green *et al.*³⁴⁹ (Souris Abgenix) ou Lonberg *et al.*³⁵⁰ (souris Medarex) en 1994, permettant après stimulation par l'antigène d'intérêt d'obtenir des anticorps entièrement humains. Le premier anticorps totalement humain commercialisé est l'adalimumab en 2002 (issu d'une banque de phage), une IgG1 anti-TNF dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Le premier anticorps issu des souris transgéniques est le panitumumab, commercialisé en 2006.

Le premier anticorps bispécifique est approuvé en 2009, avec le catumaxomab, après de nombreuses années de développement. L'approbation en Europe de cet anticorps ciblant l'antigène EPCAM et le CD3 permet de former une synapse entre le lymphocyte T et une cellule tumorale, permettant via des mécanismes de libération de cytokine inflammatoire et de production de protéines cytolytiques la lyse de la cellule tumorale. Le catumaxomab est dérivé d'un anticorps chimérique rat/souris. Le premier réel succès pour les bispécifiques est en réalité à mettre à l'actif du blinatumomab (**Figure 23**), un double scFv ciblant le CD3 et le CD19, retrouvé à la surface des lymphocytes B, pour traiter la leucémie aiguë lymphoblastique.

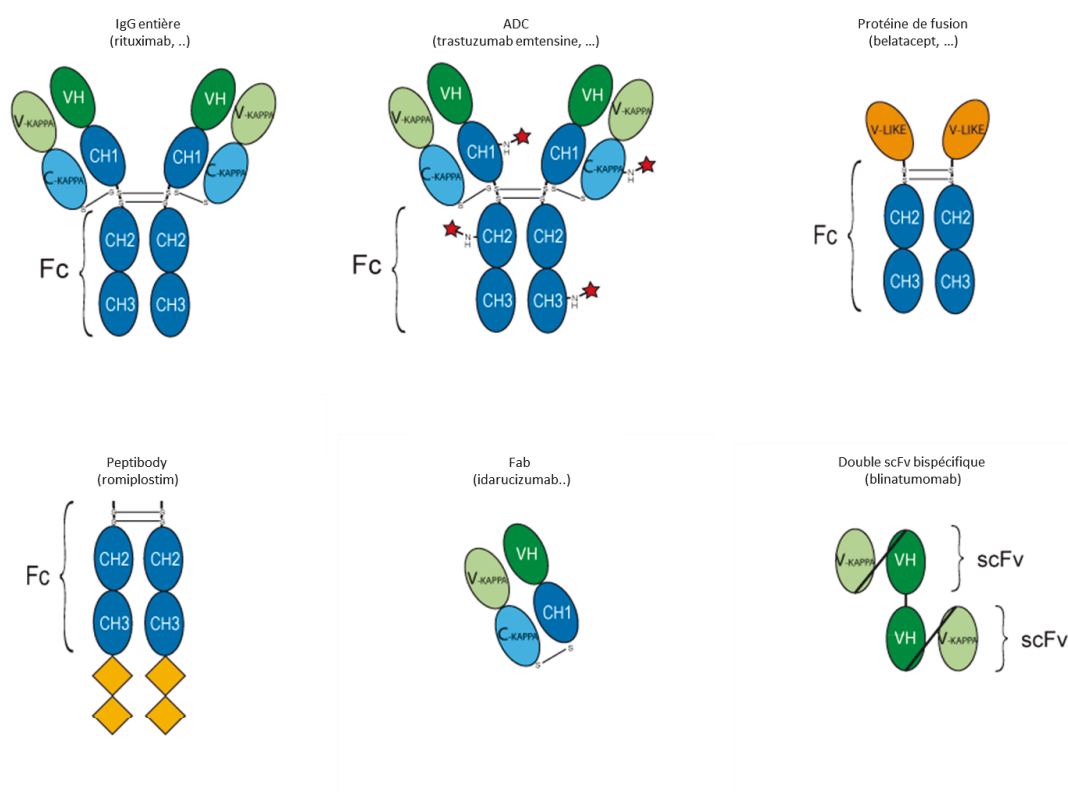


Figure 23 : Représentation schématique des différents formats d'anticorps commercialisés

Adapté d'IMGT²⁶. Les domaines constants sont indiqués en bleu foncé, et la partie constante de la chaîne légère est représentée en bleu clair. Les domaines variables sont indiqués en vert, foncé pour la chaîne lourde, clair pour la chaîne légère. Les domaines ne provenant pas d'immunoglobuline G sont représentés en orange et jaune. Les étoiles rouges représentent les molécules cytotoxiques liées aux immunoglobulines G dans le cadre des ADC.

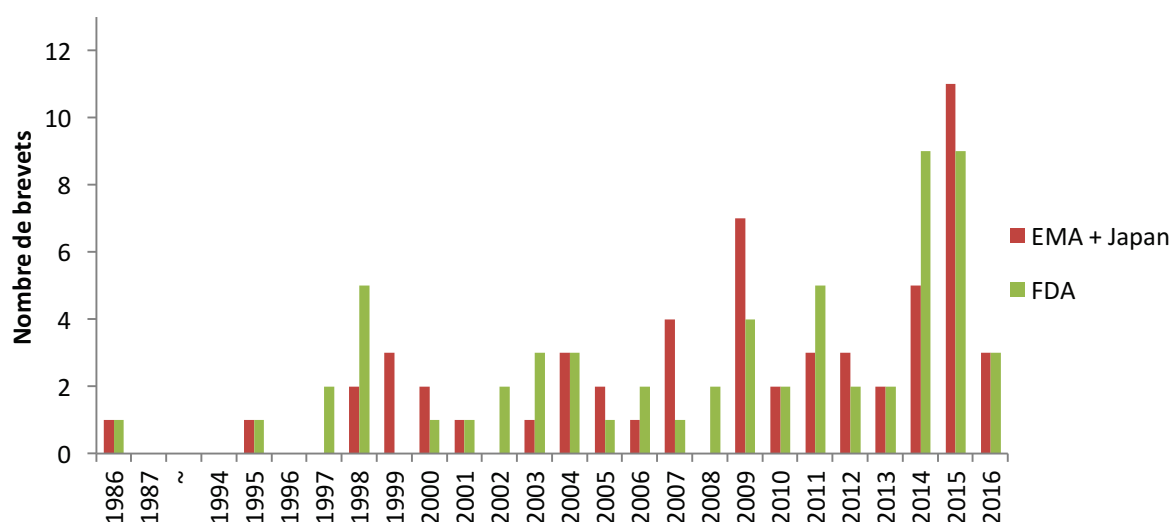


Figure 24 : Nombre d'anticorps thérapeutiques et assimilés approuvés par an à l'EMA et à la FDA

Durant toutes ces années, le nombre d'essais cliniques et les approbations d'anticorps thérapeutiques n'ont cessé d'augmenter. Plus de 500 essais cliniques portent aujourd'hui sur

des anticorps thérapeutiques, et presque 70 molécules commercialisées aujourd'hui contiennent des domaines d'immunoglobulines G (**Figure 24** et **Tableau 3**). Certaines de ces molécules arrivent même à « expiration », leurs brevets arrivant à terme. Le marché étant juteux, de nombreuses sociétés pharmaceutiques se sont lancées dans la conception de « biosimilaires ». Ces médicaments dits biosimilaires sont des copies (à la manière des génériques pour les molécules chimiques) de biomédicaments princeps, qui seront définis plus en détail dans la partie Brevet. Les coûts de développement étant évidemment moindres, ces molécules peuvent être vendues à des montants inférieurs aux princeps, ce qui peut introduire de la concurrence.

Tableau 3 : Les anticorps commercialisés ou en passe de l'être

Dénomination commune internationale	Nom commercial®	Cible	Format	Première indication	Année AMM Eu	Année AMM US
	Xilonix	IL-1 alpha	IgG1 humaine	Cancer colorectal	En revue	NA
bezlotoxumab	Zinplava	Entérotoxine B de Clostridium difficile	IgG1 humaine	Prévention des infections à Clostridium difficile	En revue	En revue
brodalumab		IL-17R	IgG2 humaine	Troubles à médiation immunitaire	En revue	En revue
sarilumab		IL-6R	IgG1 humaine	Polyarthrite rhumatoïde	NA	En revue
begelomab	Begedina	CD26	IgG2b murine	Maladie du greffon contre l'hôte	En revue	NA
olaratumab		PDGFR	IgG1 humaine	Sarcome des tissus mous	En revue	En revue
atezolizumab		PD-L1	IgG1 humanisée	Cancer de la vessie	NA	En revue
reslizumab	Cinqair	IL-5	IgG4 humanisée	Asthme	En revue	2016
obiltoxaximab	Anthim	Antiène protecteur de l'exotoxine de Bacillus anthracis	IgG1 chimérique	Prévention de la maladie du charbon (anthrax)	NA	2016
ixekizumab	Taltz	IL-17a	IgG4 humanisée	Psoriasis	2016	2016
daratumumab	Darzalex	CD38	IgG1 humaine	Myélome multiple	Décision en attente	2015
elotuzumab	Empliciti	SLAMF7	IgG1 humanisée	Myélome multiple	2016	2015
necitumumab	Portrazza	EGFR	IgG1 humaine	Cancer du poumon non à petites cellules	2015	2015
idarucizumab	Praxbind	Dabigatran	Fab humanisé	Réversion de l'effet anticoagulant du dabigatran	2015	2015
mepolizumab	Nucala	IL-5	IgG1 humanisée	Asthme sévère à éosinophiles	2015	2015
alirocumab	Praluent	PCSK9	IgG1 humaine	Hypercholestérolémie	2015	2015
evolocumab	Repatha	PCSK9	IgG2 humaine	Hypercholestérolémie	2015	2015
dinutuximab	Unituxin	GD2	IgG1 chimérique	Neuroblastome	2015	2015
secukinumab	Cosentyx	IL-17a	IgG1 humaine	Psoriasis	2015	2015
eftrenonacog α	Alprolix	Facteur IX	Protéine de fusion facteur IX - Fc	Hémophilie B	2016	2014
nivolumab	Opdivo	PD1	IgG4 humaine	Melanome, Cancer du poumon non à petites cellules	2015	2014
blinatumomab	Blinicyto	CD19, CD3	Double scFv bispécifique	Leucémie aiguë lymphoblastique	2015	2014
pembrolizumab	Keytruda	PD1	IgG4 humanisée	Mélanome	2015	2014
efmoroctocog α	Eloctate	Facteur VIII	Protéine de fusion facteur VIII - Fc	Hémophilie A	2015	2014
ramucirumab	Cyramza	VEGFR2	IgG1 humaine	Cancer de l'estomac	2014	2014
dulaglutide	Trulicity	GLP-1 R	Protéine de fusion domaines GLP-1 - Fc d'IgG4	Diabète de type 2	2014	2014
vedolizumab	Entyvio	$\alpha 4\beta 7$ integrin	IgG1 humanisée	Colite ulcéreuse, Maladie de Crohn	2014	2014
siltuximab	Sylvant	IL-6	IgG1 chimérique	Maladie de Castleman	2014	2014

obinituzumab	Gazyva	CD20	IgG1 humanisée	Leucémie lymphoïde chronique	2014	2013
ado-trastuzumab emtansine	Kadcyla	HER2	IgG1 humanisée	Cancer du sein	2013	2013
raxibacumab		Antigénique protecteur de l'exotoxine du <i>Bacillus anthracis</i> (Anthrax)	IgG1 humaine	Infection à l'anthrax	NA	2012
pertuzumab	Perjeta	HER2	IgG1 humanisée	Cancer du sein	2013	2012
brentuximab vedotin	Adcetris	CD30	IgG1 chimérique	Maladie de Hodgkin, lymphome anaplasique systémique à grandes cellules	2012	2011
aflibercept	Eylea/ Zaltrap	VEGF-A	Protéine de fusion domaines extracellulaires des récepteurs 1 et 2 du VEGF - Fc	DMLA	2012	2011
mogamulizumab	Poteligeo	CCR4	IgG1 humanisée	Leucémie lymphoïde T de l'adulte à virus HTLV-1	2012 (Japan)	
belimumab	Benlysta	BLyS	IgG1 humaine	lupus érythémateux disséminé	2011	2011
ipilimumab	Yervoy	CTLA-4	IgG1 humaine	Mélanome métastatique	2011	2011
belatacept	Nulojix	CD80, CD86	Protéine de fusion domaine extracellulaire de CTLA-4 - Fc	Prévention du rejet de greffes rénales	2011	2011
denosumab	Prolia	RANK-L	IgG2 humaine	Ostéoporose	2010	2010
tocilizumab	RoActemra, Actemra	IL-6R	IgG1 humanisée	Polyarthrite rhumatoïde	2009	2010
ofatumumab	Arzerra	CD20	IgG1 humaine	Leucémie lymphoïde chronique	2010	2009
canakinumab	Ilaris	IL-1 β	IgG1 humaine	Syndrome de Muckle-Wells	2009	2009
golimumab	Simponi	TNF	IgG1 humaine	Rhumatisme psoriasique, polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante	2009	2009
ustekinumab	Stelara	IL-12/23	IgG1 humaine	Psoriasis	2009	2009
certolizumab pegol	Cimzia	TNF	Fab humanisé pegylé	Maladie de Crohn	2009	2008
romiplostim	Nplate	CD110	Peptibody (Fc d'anticorps est couplé en C-terminal de façon covalente à une chaîne peptidique contenant deux domaines de liaison au récepteur à la TPO)	Purpura thrombopénique auto-immun	2009	2008
catumaxomab	Removab	EPCAM/CD3	Anticorps bispécifique rat/souris	Ascite maligne	2009	NA
eculizumab	Soliris	C5	IgG2/4 humanisée (switch à T260)	Hémoglobininurie paroxystique nocturne	2007	2007
ranibizumab	Lucentis	VEGF	Fab d'IgG1 humanisée	DMLA	2007	2006
panitumumab	Vectibix	EGFR	IgG2 humaine	Cancer colorectal	2007	2006
abatacept	Orencia	CD80, CD86	Protéine de fusion domaine extracellulaire de CTLA-4 - Fc	Polyarthrite rhumatoïde	2007	2005
natalizumab	Tysabri	α 4 integrin	IgG4 humanisée	Sclérose en plaque	2006	2004
bevacizumab	Avastin	VEGF	IgG1 humanisée	Cancer colorectal	2005	2004

cetuximab	Erbitux	EGFR	IgG1 chimérique	Cancer colorectal	2004	2004
efalizumab	Raptiva	CD11a	IgG1 humanisée	Psoriasis	2004#	2003#
omalizumab	Xolair	IgE	IgG1 humanisée	Asthme	2005	2003
tositumomab- i131	Bexxar	CD20	Murine IgG2a	Lymphome non- hodgkinien	NA	2003#
ibritumomab tiuxetan	Zevalin	CD20	Murine IgG1	Lymphome non- hodgkinien	2004	2002
adalimumab	Humira	TNF	IgG1 humaine	Polyarthrite rhumatoïde	2003	2002
alemtuzumab	MabCampat h, Campath- 1H; Lemtrada	CD52	IgG1 humanisée	Leucémie myéloïde chronique#; Sclérose en plaque	2001#; 2013	2001#; 2014
gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	CD33	IgG4 humanisée	Leucémie aiguë myéloïde	NA	2000#
trastuzumab	Herceptin	HER2	IgG1 humanisée	Cancer du sein	2000	1998
etanercept	Enbrel	TNF- α	Protéine de fusion couplant la fraction p75 du récepteur au TNF couplé - Fc	Polyarthrite rhumatoïde	2000	1998
infliximab	Remicade	TNF	IgG1 chimérique	Maladie de Crohn	1999	1998
palivizumab	Synagis	RSV	IgG1 humanisée	Prévention de l'infection par le virus respiratoire syncytial	1999	1998
basiliximab	Simulect	IL-2R	IgG1 chimérique	Prévention du rejet de greffe rénal	1998	1998
daclizumab	Zenapax; Zinbryta	IL-2R	IgG1 humanisée	Prévention du rejet de greffe rénal; Sclérose en plaque	1999#; 2016	1997#; 2015
rituximab	MabThera, Rituxan	CD20	IgG1 chimérique	Lymphome non- hodgkinien	1998	1997
abciximab	Reopro	GPIIb/IIIa	IgG1 chimérique Fab	Prévention des caillots de sang dans l'angioplastie	1995*	1994
muromonab- cd3	Orthoclone Okt3	CD3	Murine IgG2a	Prévention du rejet de greffe rénale	1986*	1986#

Adapté à partir d'un tableau de Janice M. Reichert, PhD, Reichert Biotechnology Consulting LLC;
#, Retiré ou vente arrêté pour la première indication / NA, non approuvé

③ La dénomination commune internationale des anticorps thérapeutiques

Les dénominations communes internationales (DCI) ou « International Nonproprietary Names » (INN) sont des noms génériques non commerciaux créés par la résolution WHA 3.11 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1950. Ces noms sont donnés à toutes les substances et principes actifs pharmaceutiques et permettent une caractérisation abrégée de termes chimiques souvent complexes en renseignant sur les fonctions ou la composition d'un produit³⁵¹. Ces dénominations se doivent d'être uniques, distinctes, transposables dans plusieurs langues et ne doivent pas être liées aux noms de marques déposées et appellations commerciales. Il faut également qu'elles soient utiles et pratiques pour les utilisateurs et doivent de ce fait être limitées à 3 ou 4 syllabes³⁵².

Les DCI sont arrêtées par l'OMS suivant l'avis d'experts inscrits au « Tableau consultatif d'experts de la Pharmacopée internationale et des Préparations pharmaceutiques ». Les informations relatives aux détails de structure de la molécule (qui doivent être fournis par le fabricant ou l'inventeur) sont cruciales pour décider de la DCI appropriée. C'est donc au fabricant de contacter l'OMS et les organismes réglementaires pour postuler pour une DCI. Ces experts sont également responsables de vérifier et valider si une DCI est correctement utilisée et correspond à la substance qui est le sujet d'une autorisation de mise sur le marché³⁵¹.

Les entreprises doivent obligatoirement demander une DCI quand l'évaluation clinique de leur produit débute, car un moyen alternatif d'identification serait trop déroutant. Après le dépôt de la demande par le fabricant ou l'inventeur, celle-ci est examinée et une DCI est proposée et publiée pour observations. Si aucune objection n'est effectuée, la dénomination obtient donc le statut de DCI et est définitivement publiée³⁵³. Ces noms sont destinés à être employés dans les pharmacopées, l'étiquetage, l'information relative au produit, la publicité et le matériel promotionnel, la réglementation pharmaceutique et la littérature scientifique, ainsi que comme noms de produits. Leur emploi est normalement exigé par la législation nationale ou, dans le cas de l'Union Européenne, par la législation communautaire. Du fait d'une constante collaboration, les dénominations de plusieurs systèmes nationaux tels que les *British Approved Names* (BAN), *Dénominations Communes Françaises* (DCF), *Japanese Adopted Names* (JAN) et *United States Adopted Names* (USAN) sont aujourd'hui généralement identiques aux DCI³⁵¹. Néanmoins, des exceptions existent, comme c'est le cas pour le ziv-aflibercept aux Etats-Unis par exemple. L'aflibercept est une protéine de fusion développée par Regeneron pour le traitement de la dégénérescence maculaire d'une part, et du traitement du

cancer colorectal métastatique d'autre part, selon deux dosages différents. Pour éviter la confusion entre les deux dosages, l'agence de santé américaine, la *Food and Drug Administration* (FDA), a assigné un nouveau nom, le ziv-aflibercept, à la substance active en ce qui concerne le traitement du cancer colorectal. Le « z- » a été choisi probablement par rapport au nom commercial, ZALTRAP®, alors que le « -iv » correspond à « intraveineux ». Cette décision unilatérale enfreint totalement la réglementation internationale des DCI pour les anticorps et molécules apparentées.

La première DCI adoptée pour un anticorps monoclonal est le muromonab-CD3 (pour « *murine monoclonal antibody* » anti-CD3) il y a environ 30 ans. A l'exception de ce dernier, tous les anticorps monoclonaux thérapeutiques comportent désormais le suffixe « *-mab* » pour « *monoclonal antibody* ».

Le système des DCI pour les anticorps thérapeutiques a été développé entre 1991 et 1993. À un préfixe propre à la molécule, ayant été choisi par la société créant l'anticorps, suit un radical relié à la nature de la cible puis un autre portant sur l'origine ou la manière de produire l'anticorps (Tableau 4). Par exemple, le rituximab, un anticorps anti-CD20, s'identifie comme étant un anticorps monoclonal (*-mab*), chimérique (*-xi-*) et anti-tumoral (*-tu-*).

Tableau 4 : Radicaux utilisés dans la conception des dénominations communes internationales

Cible	Source/Production
Système immunitaire : <i>-li(m)-</i>	Murin : <i>-o-</i>
Système cardiovasculaire : <i>-ci(r)-</i>	Rat : <i>-a-</i>
Tumeur : <i>-tu(m)-</i>	Hybride rat/souris : <i>-axo-</i>
Virus : <i>-vi(r)-</i>	Chimérique : <i>-xi-</i>
Toxine : <i>-tox(a)-</i>	Humanisé : <i>-zu-</i>
Bactéries : <i>-ba(c)-</i>	Humain : <i>-(m)u-</i>
Interleukine : <i>-ki(n)-</i>	(Hamster : <i>-e-</i>)
Champignons : <i>-fu(n)-</i>	(Primate : <i>-i-</i>)
Système nerveux : <i>-ne-</i>	
Os : <i>-(n)o(s)-</i>	
Infection/Lésion : <i>-le(s)-</i>	
Angiogenèse : <i>-anibi-</i>	

Selon la WHO^{354,355}.

④ Les difficultés du système des DCI anticorps

La classification des anticorps thérapeutiques par des DCI comporte certaines difficultés, notamment la longueur et la complexité des mots et syllabes utilisés. Avec une moyenne de 11 lettres, les DCI des anticorps thérapeutiques sont plus longues que celles des autres classes de produits biologiques ou chimiques. Le nombre d'anticorps en développement ne cessant de croître, et leur DCI restant attribuée même après un éventuel arrêt du développement de celui-ci, ceci entraîne nécessairement une augmentation de la longueur de ces DCI et la surcharge du système.

Ces DCI risquent également de voir se développer des homonymies et homophonies par similitudes graphiques et/ou sonores. Enfin, cette complexité s'accroît encore au moment d'inclure des précisions sur les anticorps pégylés, radiomarqués ou encore conjugués^{354,355}.

Les produits biologiques pégylés pour lesquels deux dénominations différentes sont utilisées posent également problème. Une des dénominations est un système en deux mots, comme c'est le cas pour le certolizumab pegol, un anticorps utilisé dans le traitement de la spondyloarthrite ankylosante. L'autre implique un mot avec un préfixe « peg- » ou un radical « -peg -» après un préfixe fantaisiste, comme le pegsunercept.

Les ADC ou anticorps conjugués, en français, sont composés d'un ou plusieurs agents cytotoxiques connectés à un anticorps monoclonal par une liaison covalente stable. On donne donc généralement deux noms à ceux-ci mais le second est souvent oublié, ce qui pourrait affecter la sécurité du patient³⁵⁶, comme par exemple pour le trastuzumab emtansine, une IgG1 anti-HER2 conjuguée à l'emtansine, différente du trastuzumab qui est le même anticorps mais non conjugué³⁵⁷. Un nouveau système pour ces DCI lié aux anticorps thérapeutiques a récemment été proposé par l'OMS.

⑤ Le nouveau système des DCI anticorps

Depuis un update de 2014 de l'OMS, les définitions entourant les définitions d'anticorps chimériques ou humanisés ont changé³⁵⁸. Auparavant fondée sur la méthodologie de production de ces anticorps, l'OMS a estimé que la différenciation entre anticorps chimériques (-xi), humanisés (-zu) et humains (-u) ne reposait sur aucune base moléculaire et qu'il fallait plutôt effectuer une comparaison des séquences d'acides aminés. Ainsi les nouvelles définitions

rapportent qu'une chaîne d'anticorps (lourde ou légère) est désignée chimérique quand la séquence de sa partie variable est plus proche d'une espèce non-humaine que de l'humain. Pour un anticorps humanisé, cette séquence variable est au contraire plus proche de l'humain que d'une autre espèce. Ceci introduit ainsi un nouveau radical « -xizu- », qui est utilisé pour un anticorps ayant des chaînes chimériques et humanisées (par exemple une chaîne lourde humanisée et une chaîne légère chimérique)³⁵⁸.

La comparaison de séquence est réalisée en interrogeant la base International ImMunoGeneTics (IMGT®), grâce à l'Information System Domain GapAlign Tool. Cet outil similaire à BLAST est une méthode de recherche heuristique utilisée en bio-informatique permettant d'identifier les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences de nucléotides ou d'acides aminés et de réaliser un alignement de régions homologues, en se référant à la base de données de l'IMGT® des gènes codant les régions variables des anticorps. Le score d'alignement est calculé uniquement sur la partie du domaine variable codée par le gène V (IGHV pour la chaîne lourde et IGKV ou IGKL pour la chaîne légère) en omettant le CDR3, site de la recombinaison V(D)J, et le gène J de l'analyse. Ce nouveau système a suscité de nombreux commentaires de la part des professionnels et des industriels du secteur³⁵⁹ pour différentes raisons qui seront discutées dans les résultats, en introduction de notre article sur le sujet, dont l'objectif est de prendre part au débat.

VI-Les variants dans la partie Fc

Pour affiner les propriétés pharmacologiques d'un anticorps thérapeutique, plusieurs choix sont possibles. Naturellement, les quatre sous-classes d'IgG offrent un éventail de fonctions effectrices et de demi-vie permettant de faire un premier choix. Les allotypes, qui sont des modifications peptidiques naturelles des sous-classes, offrent également la possibilité d'un affinage des propriétés pharmacologiques, encore peu utilisé. Une fois passé ce stade du naturel, les premières manipulations permettant de moduler les fonctions effectrices furent d'utiliser des enzymes protéolytiques, comme la pepsine ou la papaïne, pour obtenir des fragments d'anticorps, Fab ou F(ab')₂, sans Fc et donc sans fonction effectrice. Des modifications plus fines sont également envisageables pour agir plus précisément sur la capacité de l'anticorps à recruter ses effecteurs, en jouant sur sa liaison avec le C1q ou les FcγR, et sur sa capacité de demi-vie, en jouant sur son interaction avec le FcRn. De nombreuses technologies ont ainsi été développées pour réaliser ces modifications dans la partie Fc des IgG thérapeutiques.

Comme abordé précédemment, le Fc comprend les zones de liaison au C1q et aux FcγR, dont la fixation entraîne la lyse de la cellule cible, via la voie classique du complément, l'ADCC, ou l'ADCP (**Figure 25**). Cette portion comprend également la zone d'interaction avec le FcRn, qui permet une bonne distribution de l'IgG dans l'organisme et une forte demi-vie ainsi que les zones d'interaction avec les protéines A et G, permettant une purification efficace des anticorps thérapeutiques.

Trois stratégies ont été entreprises pour modifier cette portion Fc, en vue de moduler les propriétés pharmacologiques en corrélation avec des besoins thérapeutiques. Une modification du Fc peut reposer sur un :

- Retrait ou modification du glycanne lié à l'asparagine 297
 - Modifications de glycosylation
- Remplacement, ajout, retrait de région charnière et/ou d'un ou des domaines CH2 et CH3
 - Modifications de domaines
- Remplacement, ajout, retrait d'un ou plusieurs acides aminés dans le Fc
 - Modifications d'acides aminés

L'anticorps modifié par l'un ou plusieurs de ces trois types de modifications devient ainsi un « variant » Fc.

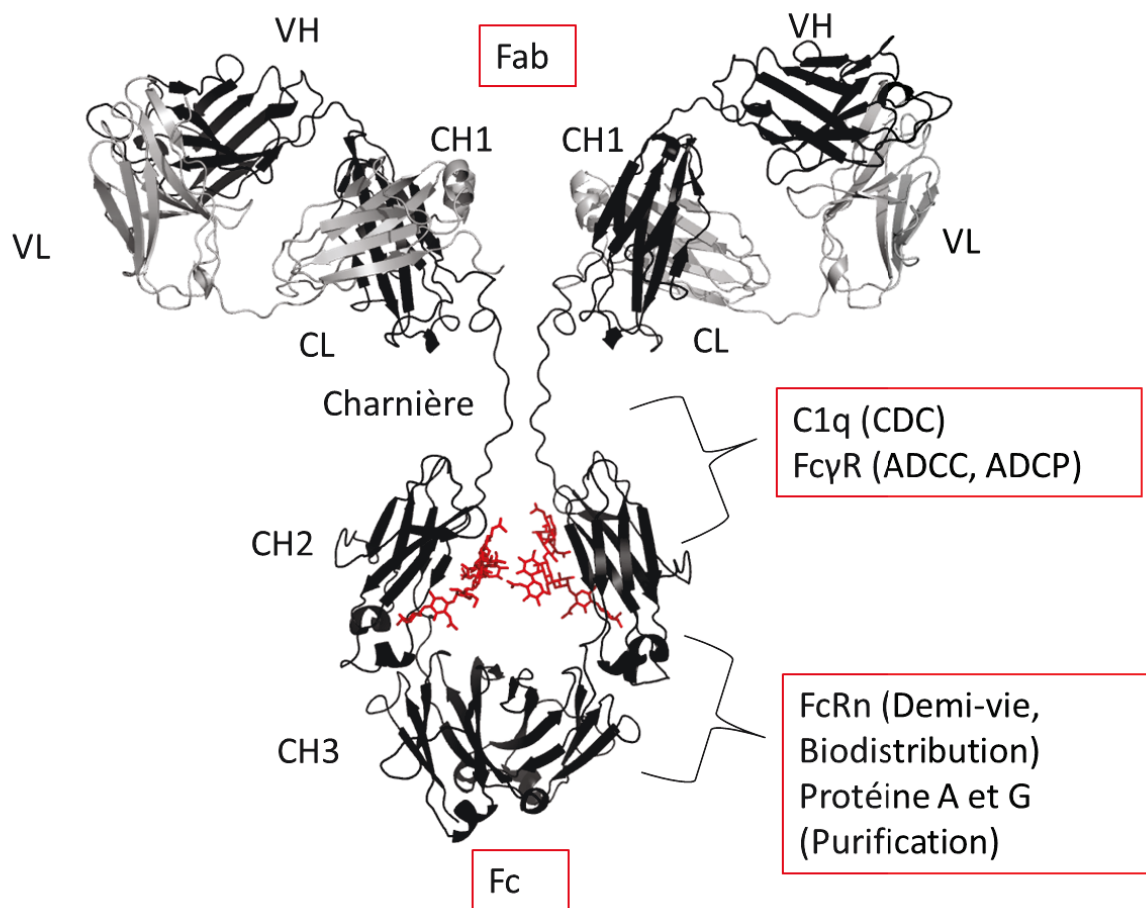


Figure 25 : Représentation tridimensionnelle d'un modèle d'IgG1 avec son glycanne et les zones d'interaction aux récepteurs

Les chaînes lourdes sont en noir, les légères en gris, et le glycanne est en rouge. Sont indiquées les zones schématiques de fixation des ligands du Fc. Cette figure a été réalisée en utilisant PyMOL Molecular Graphics System, version 1.7.4 (Schrödinger) à partir d'un modèle fourni par M. R. Clark.

① Les modifications de glycosylation

Le glycanne de l'IgG peut interagir avec les récepteurs Fcγ directement, et/ou modifier la conformation du Fc, modifiant par la même occasion la zone d'interaction aux FcγR. Ce glycanne de l'IgG existe sous différentes glycoformes, et la répartition de ces glycoformes est différente chez les autres espèces, variant en fonction du bagage enzymatique de la cellule qui

va produire l'anticorps, et de l'expression de ce bagage au moment de la production des anticorps. Deux voies sont envisageables pour agir sur ce glycanne :

- Traitement enzymatique ou chimique durant ou après la synthèse des anticorps
- Utilisation d'une cellule de production particulière et/ou modification du patrimoine enzymatique de celle-ci

Le traitement enzymatique ou chimique durant ou après la synthèse pour agir sur la glycosylation arrive très tôt dans l'histoire des anticorps. Dès les années 1970, la *N*-glycanase F est utilisée pour retirer partiellement ou entièrement le glycanne de l'IgG, montrant notamment une diminution des activités ADCC et de complément³⁶⁰⁻³⁶². Ceci permit d'ailleurs de mesurer l'importance du glycanne dans l'interaction au C1q et aux récepteurs Fc gamma. Le travail de Koide et ses collègues³⁶⁰ montre également que des traitements à la neuraminidase, pour retirer les acides sialiques terminaux (**Figure 26**), ou à la β -galactosidase pour retirer les galactoses (**Figure 26**), n'étaient pas suffisants pour inactiver la molécule. Seul le traitement par des β -N-acetylglucosaminidase, retirant les premiers GlcNAc (**Figure 26**), montrait la perte des fonctions effectrices. La même chose fut démontrée quelques années plus tard, en produisant les anticorps en présence de tunicamycine, un inhibiteur de la *N*-glycosylation. Le retrait du glycanne fait ainsi perdre à l'anticorps ses capacités effectrices de complément et d'ADCC^{363,364}, mais pas sa liaison à la protéine A³⁶⁵. Ces papiers précoces illustrent parfaitement les modifications par traitement post-production des anticorps.

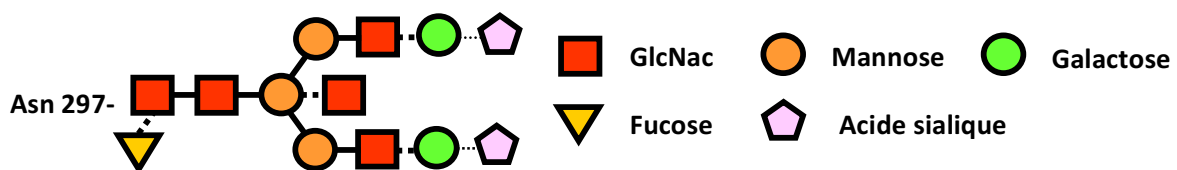


Figure 26 : Représentation schématique du glycanne lié à l'asparagine 297 du CH2

Aujourd'hui, 95% des anticorps thérapeutiques sont produits dans des cellules de mammifères, permettant d'obtenir des anticorps peu différents de ceux sécrétés par le corps humain, et permettant ainsi de limiter l'immunogénicité³⁶⁶. Les principales cellules utilisées sont les cellules ovariennes de hamster (CHO), et les cellules NS0 et SP2/0, issues de myélomes de souris. Ces cellules produisent ainsi majoritairement des anticorps ayant des glycanes de type biantennaires fucosylés (**Figure 26**).

L'utilisation d'une cellule de production particulière et/ou la modification du patrimoine enzymatique d'une cellule de production arrive logiquement avec les techniques de

manipulation génétique. En 1994, Wright et Morrison développent une cellule de production dérivée d'une CHO, nommée Lec 1, déficiente en *N*-acetylglucosaminyltransférase I, pour produire une IgG1 chimérique dont le glycanne est composé de 5 mannoses et aucun GlcNAc bianténaire. Cet anticorps montra une incapacité à se lier au C1q et ainsi à activer la voie du complément, une réduction de sa liaison au FcγRI, et une diminution de sa demi-vie¹⁰³. La manipulation de ce glycanne permit ainsi d'obtenir différentes glycoformes non-naturelles chez l'homme, modifiant les fonctions effectrices.

Les effets de la présence d'une galactosylation ou d'une sialylation terminale sont encore assez discutés (**Figure 26**). Dans certains cas, l'augmentation de la galactosylation a été démontrée comme augmentant la liaison au FcγRIIIA de trois fois³⁶⁷, et dans un autre, son absence a montré une augmentation de l'affinité pour les FcγR¹⁰⁷. Celle-ci a également été démontrée comme augmentant la liaison au C1q³⁶⁸. Concernant l'acide sialique terminal, il semble que sa présence réduise la liaison au FcγRIIIA, et ainsi diminue l'activité ADCC³⁶⁹. La présence d'un taux élevé de mannose (« *high-mannose* ») sur le glycanne d'un anticorps a montré une diminution de sa demi-vie^{370,371}. Une augmentation de l'affinité pour le FcγRIIIA et une diminution pour le FcγRIIB en comparaison à des glycanne bianténaire a également été caractérisée^{372,373}. Il semblerait cependant pour le FcγRIIIA que cette augmentation de liaison soit indirecte, et due à l'absence du fucose lié en α6 au premier GlcNAc du glycanne (**Figure 26**).

Ce fucose est le sucre le plus étudié du glycanne lié à l'asparagine 297 des anticorps. En 2002, l'utilisation d'une cellule de production déficiente en fucose, les « CHO Lec13 », permit d'identifier que l'absence de ce fucose augmentait spécifiquement la liaison des IgG au FcγRIIIA, sans influencer la liaison des autres récepteurs¹⁰⁸. La même année, l'utilisation d'une cellule d'hybridome de rat YB2/0 pauvre en fucose confirma cette découverte³⁷⁴. Son absence augmente de plus de 25 fois la liaison de l'IgG à ce récepteur³⁷⁵, par amélioration de l'interaction entre le *N*-glycanne attaché à l'asparagine 162 du FcγRIIIA et le glycanne du Fc. Cette défucosylation entraîne une augmentation de l'activité ADCC de l'anticorps. Deux ans plus tard, après la découverte de l'importance de la liaison au FcγRIIIA¹ dans la cytotoxicité des anticorps thérapeutiques via l'ADCC, les sociétés développèrent de nombreuses techniques sur le sujet. Outre les technologies liées aux CHO Lec13 et aux YB2/0, a également été développée une cellule CHO, nommée CHO/DG44, dans laquelle les gènes de la fucosyltransférase-8 (FUT8) ont été invalidés, supprimant la capacité d'ajout d'un fucose sur l'anticorps (**Figure 26**), et augmentant ainsi la liaison au FcγRIIIA et l'activité ADCC³⁷⁶. Des

méthodes alternatives ont également vu le jour, comme la surexpression de la $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransférase III (GnTIII), augmentant l'ajout d'un GlcNAc bissecteur sur l'anticorps (**Figure 26**) et l'activité ADCC³⁷⁷. Comme abordé dans le paragraphe précédent, cette addition, découverte avant l'intérêt pour le fucose, empêche l'addition d'un fucose sur le glycanne, et ainsi augmente indirectement la liaison au Fc γ RIIIA et l'ADCC³⁷⁴. Cette technologie et celle liée aux CHO/DG44 donnèrent naissance aux deux seuls anticorps modifiés dans leur glycosylation aujourd'hui commercialisés, respectivement l'obinutuzumab, de Roche, produit par la technologie GlycoMabTM, et le mogamulizumab de Kyowa, développé par la technologie POTELLIGENT[®] (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Les anticorps commercialisés ayant des modifications Fc de glycosylation

Anticorps	Cible	Société	Sous-classe	Modification Fc	Effet modification	Statut (Année)
romiplostim	CD110	Amgen	IgG1	Produit en cellule E.Coli	Aglycosylation, retrait des fonctions effectrices	C (2008)
mogamulizumab	CCR4	Kyowa	IgG1	Cellule de production dont la FUT8 a été retirée	Anticorps pauvre en Fucose, augmentation des fonctions effectrices	C (2012)
obinutuzumab	CD20	Roche	IgG1	Cellule de production surexprimant la GnTIII	Anticorps riche en GlcNAc bissecteur, augmentation des fonctions effectrices	C (2013)

② Les modifications de domaines

Les modifications de domaines consistent au retrait, à l'addition ou au remplacement de domaines ou de régions dans le Fc. C'est historiquement la deuxième des trois stratégies envisagées pour modifier la molécule d'IgG. Celles-ci sont d'abord motivées par l'identification des sites de liaison de l'IgG au C1q et aux Fc γ R. On trouve notamment dès 1981 un retrait de charnière, montrant une perte de l'activité complément en lien avec la perte de la liaison au C1q³⁷⁸. Ceci a également été particulièrement utile pour l'IgG4 dans l'identification de l'importance de la charnière dans le phénomène de séparation en demi-molécules, par incorporation d'une charnière d'IgG3 à la place de celle d'IgG4⁸².

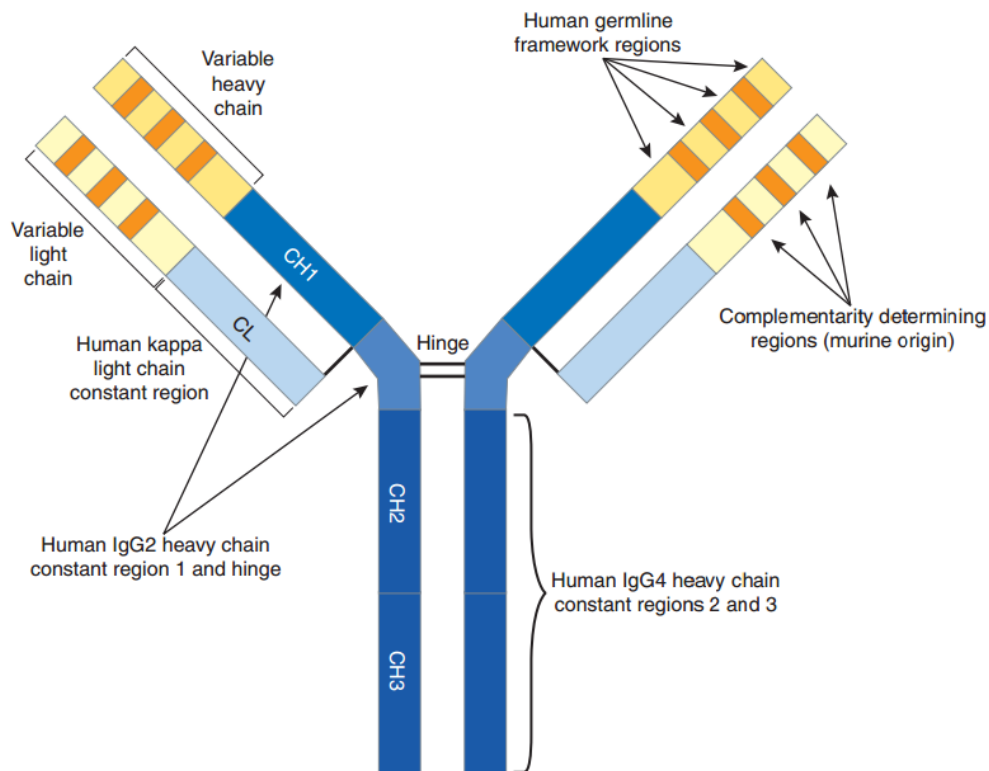


Figure 27 : Représentation schématique de l'écilizumab

Selon Rother *et al.*³⁷⁹.

Les modifications de domaines permettent ainsi de moduler les propriétés biologiques d'une immunoglobuline, en remplaçant l'un de ses domaines par celui d'une autre classe ou sous-classes d'immunoglobuline ayant des propriétés différentes, de retirer un domaine pour abolir certaines propriétés, ou d'en ajouter un pour en apporter davantage. L'exemple le plus connu, aujourd'hui commercialisé, est celui de l'écilizumab (**Figure 27**), une IgG2 anti-C5 dont la fin du domaine CH2 et le CH3 ont été remplacés par des domaines d'IgG4. Cette molécule compile donc la faible liaison aux récepteurs Fcγ des IgG2 avec la faible liaison au C1q de l'IgG4, permettant la suppression complète des fonctions effectrices de la molécule (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Les anticorps commercialisés ayant des modifications Fc de domaines

Anticorps	Cible	Société	Sous-classe	Modification Fc	Effet modification	Statut (Année)
Abciximab	gpIIbIIIa	Centocor	IgG1 (Fab)	Retrait (Charnière-CH2-CH3) après l'acide aminé 224 (clivage papaïne)	Retrait des fonctions effectrices et diminution demi-vie	C (1994)
Ranibizumab	VEGF	Genentech Novartis	IgG1 (Fab)	Retrait (Charnière-CH2-CH3) après l'acide aminé 226 et substitution T225L	Retrait des fonctions effectrices et diminution demi-vie	C (2006)
Eculizumab	C5	Alexion	IgG2/4	IgG2 jusqu'à T260, IgG4 après	Retrait des fonctions effectrices	C (2007)
Certolizumab pégol	TNF	CellTech (UCB)	IgG1 (Fab)	Retrait (Charnière-CH2-CH3) après l'acide aminé 227 et substitution P227A	Retrait des fonctions effectrices et diminution demi-vie	C (2008)

③ Les modifications peptidiques

La modification de la séquence peptidique consiste en l'ajout, le retrait, ou le remplacement d'acides aminés dans le Fc. Comme pour les modifications de domaines, cette technique a d'abord été envisagée pour identifier plus précisément les acides aminés importants dans la liaison de l'IgG au C1q et aux FcγR. On retrouve notamment deux publications de 1988 identifiant par remplacement d'acides aminés que la leucine 235 est importante dans la liaison au FcγRI³⁸⁰, et que le site de liaison du C1q sur une IgG murine se trouve aux positions 318, 320 et 322³⁸¹. Dans cette dernière publication, est réalisée également une mutation N297A, retirant le glycanne présent sur l'anticorps, et montrant une diminution de liaison au C1q, engendrée par l'absence du glycanne³⁸¹. Un peu plus tard, en 2001, les sites de liaison du FcRn, du FcγRI, du FcγRIIa, du FcγRIIB, du FcγRIIIA ont été identifiés par une technique dite d'« *alanine scanning* », consistant au remplacement un à un de nombreux acides aminés du Fc par des alanines, permettant d'identifier l'importance d'une position sur la liaison aux récepteurs d'intérêt¹⁹⁰. Dans ce même papier, se fondant sur ce travail de criblage par alanines, les auteurs ont pu mettre en évidence des variants d'IgG1 montrant une augmentation de liaison aux FcγR¹⁹⁰. Plus fines que les modifications de domaines, ces modifications peptidiques permettent, après identification d'une position importante, de remplacer l'acide aminé présent par un autre, changeant les propriétés pharmacologiques de la molécule. Ces remplacements peuvent être motivés par un effet démontré d'un ou plusieurs acides aminés à certaines positions

dans une autre sous-classe, ou par un criblage plus systématique comme celui réalisé en 2001¹⁹⁰. Des combinaisons de variants sont également disponibles, permettant d'amplifier l'augmentation ou la réduction d'une propriété, ou même de toucher deux types de propriétés différentes comme par exemple la liaison aux FcγR et celle au FcRn. De nombreuses mutations peptidiques sont connues aujourd'hui (**Tableau 7**) permettant de moduler les propriétés pharmacologiques en fonction du but thérapeutique recherché, et ce plus finement qu'en remplaçant tout un domaine entier¹⁵⁶. Furent ainsi identifiés des mutations simples ou combinées pour augmenter l'affinité aux récepteurs Fcγ, comme la combinaison G236A, S239D, I332E (GASDIE), qui montre une augmentation de liaison significative pour FcγIIA quelle que soit sa forme allotypique, FcγIIB, et FcγIIIA également, quelle que soit sa forme allotypique. Cette augmentation de liaison entraîne une augmentation de l'ADCC et de l'ADCP. *A contrario*, des mutations visent à diminuer les fonctions effectrices de la molécule, comme par exemple N297A, déjà abordée plus haut, qui diminue la liaison aux FcγR et entraîne une diminution d'ADCC et d'ADCP, ou encore la combinaison L234A L235A, qui abolit la liaison de l'IgG à tous les récepteurs Fcγ et diminue celle au C1q, donnant une molécule beaucoup moins cytolytique. Le FcRn et la demi-vie sont également visés, principalement par des mutations pour augmenter l'affinité de l'anticorps pour ce récepteur, via notamment des combinaisons de modifications comme M252Y, S254T, T256E (YTE) qui entraînent une hausse importante de liaison au FcRn, et une demi-vie augmentée. Ces variants et d'autres retrouvés dans la littérature sont à retrouver dans le **Tableau 7**, adapté de la revue réalisée par le docteur P. Bruhns¹⁵⁶.

Tableau 7 : Variants peptidiques d'IgG1 identifiés dans la littérature

IgG1 variants (Eu)*	FcγR									Fonctions				Ref.
	I	IIA		IIB	IIIA		IIIB			FcRn	C1q	ADCC	ADCP	
		R131	H131		V158	F158								
L234A/L235A LALA	0	0	0	0	0	0	0	=	-	0	0	-	=	190,382
G236A	-	+	+	=	=	=	?	?	?	-	+	?	?	383,384
S239A	=	?	=	=	?	-	?	=	?	?	?	?	?	190
I253A	=	?	=	=	?	=	?	0	?	?	?	?	-	190,385
S254A	=	?	=	=	?	=	?	0	?	?	?	?	?	190
D265A	-	?	--	-	?	--	?	=	?	-	?	?	?	190
S267E	=	++	=	++	-	0	?	?	+	-	-	-	?	386,387
D270A	=	--	=	--	?	-/0	?	=	-	-	?	+	?	121,190
R292A	=	?	-	-	?	=	?	=	?	?	=	?	?	190,383
N297A NA	-	?	--	--	?	--	0	=	0	0	0	0	=	190,386,388
S298N	?	?	--	--	?	--	?	?	?	?	?	?	?	190
K322A	?	?	?	?	?	?	?	?	-	?	?	-	?	121
K326W	?	?	?	?	?	?	?	?	+	?	?	+	?	389
A327Q	=	?	-	-	?	--	?	=	?	?	?	?	?	190
P329A	=	?	--	-	?	-	?	=	-	?	?	-	?	121,190
I332E	=	=	=	=	?	+	?	?	?	+	+	?	?	383,384
E333A	?	?	?	?	+	?	?	?	?	+	?	+	?	121,389
K338A	=	?	=	=	?	-	?	=	?	?	?	?	?	190
N434A	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	+	390
E233P/L234V/L235A	0	?	?	?	?	?	?	?	?	-	?	-	?	190,391
E233P/L234V/L235A/ Δ236G + A327G/ A330S/P331S	-	?	?	?	?	?	?	?	?	-	?	-	?	190,391
L234A/L235A/K322A	0	0	0	0	0	0	0	=	0	0	0	0	?	382
L234F/L235E/P331S	0	0	0	0	0	?	0	=	0	0	0	0	?	324
G236A/I332E	=	+	+	=	=	+		?	?	?	?	?	?	384
G236A/S239D/I332E GASDIE	=	+++	+++	++	++	+++	?	?	?	+	+	?	?	383,384
G236A/S239D/ A330L/I332E GASDALIE	=	++	++	=	=	+++	?	?	?	+	+	?	?	384,386
S239D/I332E	+	=	+	++	++	+++	?	?	?	+	+	?	?	384,386
S239D/A330L/I332E SDALIE	=	?	=	?	+	?	?	?	0	+	+	?	?	392
S239D/H268F/ S324T/I332E	+	+	+	+	+++	+++	?	?	+	+	+	+	?	387
F243L/R292P/Y300L/ V305I/P396L	?	?	?	=	+	+	?	?	?	+	?	?	?	393
M252Y/S254T/T256E YTE	?	?	?	?	?	?	?	++	?	-	?	?	+	394
M252Y/S254T/T256E + S239D/A330L/I332E YTE-SDALIE	?	?	?	?	?	?	?	++	?	=	?	?	+	394
P257I/Q311I	?	?	?	?	?	?	?	++	?	?	?	?	=	395
S267E/L328F	=	++	=	++	-/0	--/0	?	?	?	-	#	?	?	386,396
T307A/E380A/N434A	?	?	=	=	?	=	?	++	?	?	?	?	+	190,397
K326W/E333S	?	?	?	?	?	?	?	?	+	?	?	+	?	389
E380A/N434A	?	?	=	=	?	=	?	+	?	?	?	?	?	190

Adapté de Bruhns *et al.*¹⁵⁶. **Couleur des colonnes** : En vert sont représentées les colonnes pour les FcγR activateurs et les fonctions effectrices associées, en rouge celle pour l'inhibiteur. En marron sont représentées les colonnes pour la liaison au C1q et l'activité complément. Enfin en bleu les colonnes pour le transport et le recyclage par la liaison au FcRn, et la demi-vie. **Changement d'affinité aux récepteurs** : 0 Abolition de la liaison ; = changement non significatif < 5 fois ; - diminution d'entre 5 et 10 fois ; -- diminution d'entre 10 et 20 fois ; + augmentation d'entre 5 et 10 fois ; ++ Augmentation d'entre 10 et 20 fois ; +++ augmentation supérieure à 20 fois. **Changement de fonctions effectrices** : = inchangé ; 0 abolition ; + augmentation ; - diminution. # dépendant du type cellulaire ; ? indéterminé *En gras, les noms communs de ces mutations °La demi-vie a été étudiée chez des primates non humains.

On compte aujourd'hui 13 anticorps commercialisés dont la séquence peptidique du Fc est modifiée (Tableau 8), et beaucoup plus en essai clinique. On y trouve principalement des protéines de fusion dont la charnière a été modifiée pour éliminer les cystéines formant les ponts disulfures, devenus inutiles, et des variants diminuant l'interaction aux récepteurs Fcγ. La part restante porte sur la stabilisation des IgG4, et sera développée plus tard.

Tableau 8 : Anticorps commercialisés ayant des modifications peptidiques dans leur Fc

Anticorps	Cible	Société	Sous-classe	Modification Fc	Effet modification	Statut (Année)
Gemtuzumab ozogamicin	CD33	Pfizer Celltech (UCB)	IgG4	Substitution S228P	Stabilisation de la molécule	C (2000)*
Abatacept	CD80 et CD86	BMS	Protéine de fusion à Fc -IgG1	Remplacement C220S C226S C229S et P238S	Retrait des ponts disulfures inter-chaînes lourdes et légères, et abolition des capacités effectrices	C (2005)
Ranibizumab	VEGF	Genentech Novartis	IgG1 (Fab)	Retrait (Charnière-CH2-CH3) après l'acide aminé 226 et substitution T225L	Retrait des fonctions effectrices et diminution demi-vie	C (2006)
Certolizumab pegol	TNF	Celltech (UCB)	IgG1 (Fab)	Retrait (Charnière-CH2-CH3) après l'acide aminé 227 et substitution P227A	Retrait des fonctions effectrices et diminution demi-vie	C (2008)
Belatacept	CD80 et CD86	BMS	Protéine de fusion à Fc -IgG1	Remplacement C220S C226S C229S et P238S	Retrait des ponts disulfures inter-chaînes lourdes et légères, et abolition des capacités effectrices	C (2011)
Aflibercept	VEGF	Regeneron	Protéine de fusion à Fc -IgG1	Délétion Δ216-220	Retrait des ponts disulfures inter-chaînes lourdes-chaînes légères	C (2011)
vedolizumab	ITGB7	Millenium Genentech	IgG1	Remplacement L235A et G237A	Abolition des capacités effectrices	C (2014)
Efmoroctocog α	Facteur VIII	Biogen	Protéine de fusion à Fc -IgG1	Délétion Δ216-220	Retrait des ponts disulfures inter-chaînes lourdes-chaînes légères	C (2014)
Eftrenonacog α	Facteur IX	Biogen	Protéine de fusion à Fc -IgG1	Délétion Δ216-220	Retrait des ponts disulfures inter-chaînes lourdes-chaînes légères	C (2014)
Dulaglutide	GLP-1 R	Lilly	Protéine de fusion à Fc - IgG4	Substitution S228P, F234A et L235A	Stabilisation de la molécule et retrait des fonctions effectrices	C (2014)
Pembrolizumab	PD-1	Merck	IgG4	Substitution S228P	Stabilisation de la molécule	C (2014)
Nivolumab	PD-1	BMS	IgG4	Substitution S228P	Stabilisation de la molécule	C (2014)
Ixekizumab	IL-17	Lilly	IgG4	Substitution S228P	Stabilisation de la molécule	C (2016)

*Retiré depuis

④ Conclusion du chapitre

Depuis les années 70 et les premières expérimentations modulant les propriétés pharmacologiques de la molécule par déglycosylation d'anticorps, les technologies se sont bien développées. Qu'elles agissent toujours sur la glycosylation de l'anticorps ou sur ses acides aminés, ponctuellement ou plus largement, par modification de domaines, ces technologies permettent d'affiner très précisément les propriétés pharmacologiques de la molécule, autant en terme pharmacodynamique que pharmacocinétique. Jouer sur la pharmacodynamie permet d'augmenter la potentialité de cytotoxicité de l'anticorps, notamment par le retrait du fucose sur le glycanne ou une combinaison de substitution d'acide aminés S239D I332E, ou au contraire de les diminuer, notamment drastiquement par un retrait de la glycosylation. Ceci permet d'adapter précisément les propriétés de l'anticorps thérapeutiques, et ainsi de diminuer des possibles effets secondaires indésirables pour les patients. Modifier la pharmacodynamie de l'anticorps, notamment par des mutations peptidiques M252Y, S254T et T256E (Variant « YTE »), permettra d'augmenter la demi-vie et la biodistribution de l'anticorps, diminuant les fréquences d'administration pour le patient. Au contraire, une mutation I253A diminuera la liaison au FcRn et réduira la demi-vie et la biodistribution de l'anticorps, ce qui peut parfois être nécessaire, par exemple en cas d'administration intraoculaire.

Dix-huit anticorps modifiés dans leur partie Fc sont aujourd'hui commercialisés, et amènent la question des possibles « nouveaux effets secondaires » que ces molécules non-naturelles peuvent apporter. Des cas ont en effet montré des effets indésirables différents entre les versions mutées et non mutés d'une molécule, semblant liés aux modifications des fonctions effectrices. Le dinutuximab est un anticorps anti-GD2 non muté dont l'un des effets secondaires est une douleur neuropathique, semblant avoir un lien avec l'activation du complément³⁹⁸. Une version humanisée et contenant une mutation K322A pour réduire l'activité de complément a été développée, nommée hu14.18. Comme attendu, une réduction de ces douleurs est observée³⁹⁸, mais des mydriases sont identifiées chez un tiers des patients³⁹⁹. Comme cet exemple le justifie, les modifications de la portion Fc des IgG ne doivent pas être idéalisées et doivent reposer sur une étude attentive des propriétés dans une indication donnée, tout en conservant une balance bénéfice-risque favorable au patient.

La protection par brevets des anticorps thérapeutiques

I-Le brevet d'invention

Le brevet d'invention est un outil d'incitation à l'innovation technique servant à conduire le progrès technique, ce dernier étant lui-même une source de progrès économique et de bien-être social⁴⁰⁰. En contrepartie de la divulgation de son invention, permettant l'accroissement de la connaissance technique accessible à tous, le brevet octroie à son inventeur un monopole à durée limitée, dans le but de rentabiliser ses dépenses de recherche-développement par la commercialisation de ses résultats, sans concurrence⁴⁰¹.

① Historique

Les premières notions de protection d'inventions par un titre de propriété similaire au brevet dateraient d'il y a quelques milliers d'années, durant l'Antiquité^{402,403}. Si la République maritime de Venise avait installé au XVème siècle un système connu sous le nom de « *Parte Veneziana* » très proche de notre brevet actuel⁴⁰⁴, la conception du système de brevet moderne est cependant à mettre à l'actif des Etats-Unis, qui inscrivent dans leur constitution (à l'Article 1, Section 8, paragraphe 8), que l'un des attributs du Congrès est de pouvoir « favoriser le développement de la science et des arts utiles, en garantissant pour une période de temps déterminée aux auteurs et inventeurs le droit exclusif à leurs livres et à leurs inventions »⁴⁰⁵. Ainsi, la première loi moderne en matière de brevet fut signée sur cette base par George Washington le 10 avril 1790 et dénommée « Loi sur les brevets ». En France, durant l'Ancien Régime, les « Lettres Patentes », signifiant « lettres ouvertes ou lettres publiques », sont des documents valorisant leurs titulaires en les plaçant en dehors de la loi commune, en leur conférant un certain privilège, un droit, un statut ou un monopole. Ce terme a d'ailleurs été gardé en anglais, le mot « patent » correspondant au brevet français. L'abolition des privilèges à la Révolution fait disparaître les droits de protection pour les auteurs et les inventeurs, et la création des brevets d'invention est régie par les lois du 17 janvier et du 25 mai 1791 qui instaurent que : « L'Assemblée constituante vote une loi qui accorde un droit de propriété aux inventeurs et leur permet d'obtenir un brevet leur garantissant le monopole de fabrication de leur invention pendant quinze ans »⁴⁰⁶. Le Directoire des brevets d'invention est ainsi créé pour les administrer⁴⁰⁷. Le brevet restera cependant très discuté jusqu'à la fin du second empire en 1870⁴⁰⁸, notamment en raison de son système de monopole et de l'accessibilité aux documents,

indispensable aux demandeurs de brevets pour connaître l'art antérieur et ne pas voir leur brevet annulé^{407,409,410}.

Le 20 mars 1883, l'Union internationale de la propriété industrielle, dite « Union de Paris » est conclue. Cette « Convention de Paris » symbolise l'émergence d'une politique de réglementation internationale du droit des brevets. Elle est d'abord signée par la Belgique, le Brésil, l'Espagne, la France, le Guatemala, l'Italie, les Pays-Bas, le Portugal, le Salvador, la Serbie et la Suisse. Les Etats-Unis, présents au moment de cette signature, n'apposeront la leur qu'en 1887. L'un des apports fondamentaux est notamment de contraindre tous les Etats signataires à considérer les citoyens des Etats contractants comme des nationaux⁴⁰⁷. Cette convention prévoit également un droit de priorité pour les brevets d'invention, signifiant que dans un délai de 12 mois, le déposant peut effectuer les démarches nécessaires afin d'obtenir la protection dans n'importe lequel des autres États contractants, le brevet étant considéré comme ayant été déposé à la date du dépôt de la première demande⁴¹¹. Enfin, parmi d'autres dispositions, la convention prévoit la création dans chaque pays signataire d'un service spécial de la propriété industrielle permettant au public de se voir communiquer les brevets, les marques et les dessins et modèles⁴¹². La Convention de Paris sera ensuite révisée à Bruxelles en 1900, à Washington en 1911, à La Haye en 1925, à Londres en 1934, à Lisbonne en 1958 à Stockholm en 1967, et a été modifiée en 1979⁴¹³. L'Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) entre en vigueur en 1970, résultant de la fusion des deux Bureaux Internationaux Réunis pour la protection de la Propriété Intellectuelle (BIRPI) administrant la Convention de Paris sur la propriété industrielle et la Convention de Berne couvrant les œuvres littéraires et artistiques. C'est une organisation intergouvernementale, dirigée par des États membres, dont le siège est situé à Genève⁴¹⁴.

L'office national de la propriété industrielle (ONPI) français est créé en 1901, pour remplir la fonction administrative en matière d'enregistrement, de délivrance et de suivi des brevets⁴⁰⁷. Un comité technique est mis en place, permettant une meilleure prise en considération des avis émanant du monde de la propriété industrielle. C'est notamment ce comité qui prépare l'adoption de la loi du 7 avril 1902, obligeant l'état à assurer une publication *in extenso* des brevets d'invention. Cet office national deviendra l'Institut National de la Propriété Intellectuelle (INPI) en 1951, et est aujourd'hui défini par les articles L. 411-1 à L. 411-5 du code de la propriété intellectuelle (CPI).

Le Traité de coopération en matière de brevets (PCT), signé en 1970 à Washington, est entré en vigueur en 1978, et a été modifié en 1979, 1984 et en 2001. Ce traité permet de demander la protection d'un brevet pour une invention simultanément dans un grand nombre de pays en déposant une demande "internationale" de brevet. Une telle demande peut être déposée par toute personne qui a la nationalité d'un état contractant ou est domiciliée dans un tel état⁴¹⁵.

Le 5 octobre 1973, après plus de vingt ans de négociations et de discussions, seize pays signent la Convention sur le brevet européen (CBE). Ce traité multilatéral institue l'Organisation européenne des brevets ainsi que l'Office Européen des Brevets (OEB), et prévoit un système juridique autonome d'examen et de délivrance de brevets européens. Avec l'entrée en vigueur de la CBE en 1977, les demandeurs peuvent déposer une seule demande de brevet auprès de l'OEB. Le brevet qui, le cas échéant, est délivré à l'issue de la procédure est valable dans tous les États membres désignés. Les États membres restent compétents pour faire appliquer et annuler les brevets individuels⁴¹⁶. Les trois langues officielles de l'OEB sont l'anglais, le français et l'allemand.

② Le brevet d'invention aujourd'hui

A la différence de certaines législations étrangères, l'invention n'est pas définie par la loi française actuelle ou par la CBE. Elle se distingue cependant de la découverte par le fait qu'elle est une création. Sont exclues des inventions par l'article L 611-10-2 du CPI :

« Les découvertes ainsi que les théories scientifiques et les méthodes mathématiques ;

- a) Les créations esthétiques ;
- b) Les plans, principes et méthodes dans l'exercice d'activités intellectuelles, en matière de jeu ou dans le domaine des activités économiques, ainsi que les programmes d'ordinateurs ;
- c) Les présentations d'informations. »

Le brevet peut se définir comme un titre délivré par les pouvoirs publics (INPI en France) ou par une autorité reconnue par l'Etat (OEB) conférant à son titulaire un monopole temporaire d'exploitation sur l'invention qui en est l'objet⁴¹⁷. Ce titre est délivré sur la base d'une demande et confère 20 ans de protection au déposant à partir de la date du dépôt de la demande, lui donnant la possibilité d'interdire à un tiers l'utilisation, la fabrication, ou encore la vente de l'invention objet du brevet, en échange de la divulgation de la connaissance (sa publication)⁴¹⁸.

Le brevet n'est ainsi pas seulement une récompense accordée à l'inventeur pour le fait d'inventer, mais également un droit privatif permettant de protéger les créations industrielles dans le but de favoriser le progrès technique⁴¹⁸. Il doit selon le principe d'unité énoncé à l'article 82 de la CBE « ne concerner qu'une seule invention ou une pluralité d'inventions liées entre elles de telle sorte qu'elles ne forment qu'un seul concept inventif général ». Par le principe du « First to file », le premier déposant, justifiant de la date de dépôt la plus ancienne, obtient l'antériorité en cas de litige. Le droit exclusif d'exploitation d'un brevet n'est pas renouvelable, il est seulement transférable par licence ou cession, sans incidence sur la durée de validité⁴¹⁸.

Pour être délivré en France ou en Europe, un brevet doit répondre favorablement à trois critères :

- La nouveauté (Art. L 611-11 CPI et Art 54 CBE) : « Une invention est considérée comme nouvelle si elle n'est pas comprise dans l'état de la technique ».
- L'activité inventive (Art. L 611-14 CPI et Art 56 CBE) : « Une invention est considérée comme impliquant une activité inventive si, pour un homme du métier, elle ne découle pas de manière évidente de l'état de la technique »
- Une application industrielle (Art. L 611-15 CPI et Art 57 CBE) : « Une invention est considérée comme susceptible d'application industrielle si son objet peut être fabriqué ou utilisé dans tout genre d'industrie, y compris l'agriculture »

L'état de la technique est constitué de l'ensemble des informations accessibles au public avant la date de dépôt de la demande de brevet⁴¹⁸. Parmi ces informations on compte notamment les articles scientifiques, les demandes de brevets publiées, les communications orales, ou encore les résumés de congrès.

La rédaction du brevet doit également, d'après l'article L 613-25 du CPI et l'article 83 CBE, fournir une description claire et complète de l'invention permettant à « l'homme du métier » de l'utiliser, sous peine de nullité du brevet. Cette personne fictive est considérée comme étant qualifiée normalement dans le domaine de l'objet de l'invention à la date du dépôt de la demande. Il possède ainsi les connaissances admises classiquement pour un domaine technique, et est supposé connaître le contenu de tous les documents contenus dans l'état de la technique⁴¹⁸. Pour un déposant français, une première demande de brevet peut être déposée en France, en Europe ou via le système PCT. Seule la demande réalisée auprès de l'OEB va être décrite ici. Cet Office accepte les demandes déposées au titre de la CBE et du PCT. Le dépôt de la demande de brevet européenne permet, au travers d'une procédure unique de dépôt et d'examen, d'obtenir la délivrance d'un brevet dans un nombre déterminé de pays. Cette demande doit se composer selon l'article 78 de la CBE des parties suivantes :

- une requête en délivrance
- une partie description de l'invention, devant d'après la règle 42 CBE :
 - ✓ préciser le domaine technique auquel se rapporte l'invention
 - ✓ indiquer l'état de la technique antérieure qui, dans la mesure où le demandeur le connaît, peut être considéré comme utile à la compréhension de l'invention, à l'établissement du rapport de recherche européenne et à l'examen de la demande de brevet européen, et de préférence citer les documents reflétant cet état de la technique
 - ✓ exposer l'invention, telle qu'elle est caractérisée dans les revendications, en des termes permettant la compréhension du problème technique, même s'il n'est pas expressément désigné comme tel, et celle de la solution de ce problème ; indiquer en outre, le cas échéant, les avantages apportés par l'invention par rapport à l'état de la technique antérieure
 - ✓ décrire brièvement les figures des dessins, s'il en existe
 - ✓ indiquer en détail au moins un mode de réalisation de l'invention revendiquée, en utilisant des exemples, si cela s'avère approprié, et en se référant aux dessins, s'il y en a
 - ✓ expliciter, dans le cas où elle ne résulte pas à l'évidence de la description ou de la nature de l'invention, la manière dont celle-ci est susceptible d'application industrielle
- des revendications, décrivant l'objet de la demande pour lequel la protection est recherchée, comprenant d'après la règle 43 CBE :
 - ✓ un préambule mentionnant la désignation de l'objet de l'invention et les caractéristiques techniques qui sont nécessaires à la définition de l'objet revendiqué mais qui, combinées entre elles, font partie de l'état de la technique
 - ✓ une partie caractérisante introduite par l'expression "caractérisé en" ou "caractérisé par" et exposant les caractéristiques techniques pour lesquelles, en liaison avec les caractéristiques indiquées au tiret précédent, la protection est recherchée
Elles sont composées:
 - ✓ d'une Revendication indépendante. C'est la première revendication, qui expose l'état de la technique sur lequel s'appuie l'invention, et l'apport de l'inventeur à ce domaine, ce qui fait la nouveauté de l'invention
 - ✓ de Revendications dépendantes. Elles découlent de la revendication principale. Elles couvrent les caractéristiques spécifiques de l'invention et devront trouver leur légitimité au sein des éléments de la description.
- des dessins (le cas échéant) qui sont définis à la règle 46 CBE et qui:
 - ✓ Facilitent la compréhension du lecteur, et sert à la compréhension des revendications
- un abrégé, qui doit contenir d'après la règle 47 CBE :

- ✓ Un résumé concis de ce qui est exposé dans la description, les revendications et les dessins

La procédure de délivrance du brevet européen débute par un examen vérifiant que les informations et pièces requises ont été fournies, permettant d'accorder une date de dépôt de la demande (**Figure 28**). Cet examen est suivi par un examen de forme, portant sur les aspects formels de la demande, comme la forme et le contenu de la requête en délivrance, les dessins, l'abrégé, les inventeurs, etc...

Parallèlement à cet examen de forme, un rapport de recherche européenne est établi, énumérant tous les documents identifiés par l'Office et susceptibles d'être pertinents pour apprécier la nouveauté et l'activité inventive de l'invention décrite par le brevet en question (**Figure 28**). Ce rapport de recherche est fondé sur les revendications, la description et les dessins du brevet. Une fois établi, le rapport de recherche est envoyé au demandeur avec une copie de tous les documents cités et un premier avis sur la satisfaction de l'invention revendiquée aux exigences de la CBE.

La demande de brevet est publiée 18 mois après la date de dépôt, ou si une priorité a été revendiquée (date de dépôt d'un brevet antérieur portant sur la même invention), 18 mois après cette date (**Figure 28**). Le rapport de recherche est également publié à cette date (**Figure 28**). Les demandeurs disposent à partir de cette date d'un délai de six mois pour décider s'ils maintiennent ou non leur demande en requérant un examen quant au fond (**Figure 28**). A compter de sa publication, une demande de brevet européen assure provisoirement une protection de l'invention dans les Etats désignés dans la demande (**Figure 28**).

Après cette publication de la demande, et conformément à l'article 93 CBE, tout tiers peut présenter des observations sur la brevetabilité de l'invention faisant l'objet de la demande, notamment au niveau de sa nouveauté, de son activité inventive, ou encore de l'insuffisance de l'exposé. Ces observations doivent être accompagnées de preuve à l'appui des arguments, comme des publications par exemple, et seront, suivant leur pertinence, pris en compte par l'OEB durant son examen de fond (**Figure 28**).

L'examen quant au fond est ainsi effectué par l'OEB, qui examine si la demande de brevet et l'invention couverte satisfont aux exigences de la CBE, et si ce brevet peut être délivré (**Figure 28**). La division d'examen est composée normalement de trois examinateurs, et la décision doit être prise de manière collégiale.

Si la division d'examen conclut qu'un brevet peut être délivré, la mention de la délivrance est publiée au Bulletin européen des brevets, une fois que les traductions des revendications ont

été produites et les taxes de délivrance et de publication payées. La décision de délivrer un brevet prend effet à la date de la publication. Cette délivrance s'opère 4 ans en moyenne après le dépôt de la demande, et le brevet délivré constitue un faisceau de brevets nationaux individuels (**Figure 28**).

Une fois la délivrance publiée, le brevet européen doit être validé dans un délai spécifique pour chacun des Etats désignés, en s'accommodant des possibles traductions ou taxes nécessaires (**Figure 28**). La délivrance ouvre également la porte aux oppositions. En effet, après délivrance, les tiers, qui sont en général les concurrents du déposant, peuvent faire opposition au brevet s'ils l'estiment contraire à certaines des règles de brevetabilité (**Figure 28**). Un manque de nouveauté peut par exemple être invoqué, ou le fait que l'invention n'implique pas une activité inventive. Cette opposition doit être formulée dans un délai de neuf mois à compter de la délivrance du brevet, et elle est traitée par une division d'opposition, composée comme la division d'examen de trois examinateurs. Des recours sont possibles auprès des chambres de recours de l'OEB pour contester les refus de délivrance ou les décisions rendues à l'issue de procédures d'opposition. Enfin, le déposant peut à tout moment après la délivrance de son brevet requérir la révocation ou la limitation de celui-ci⁴¹⁹. Au contraire, le déposant doit s'acquitter de taxes annuelles pour garder la validité de celui-ci, sans quoi la protection de l'invention est perdue.

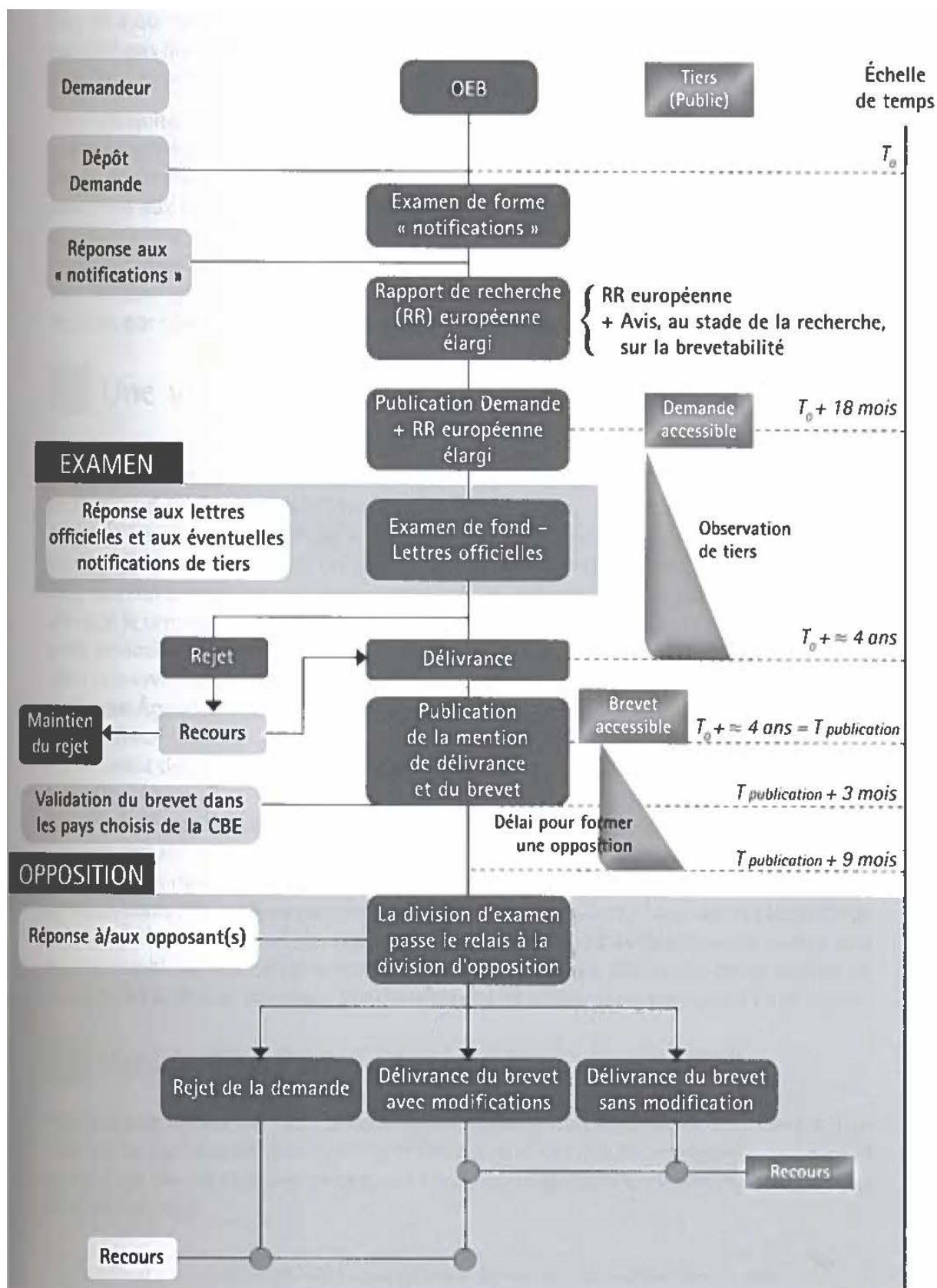


Figure 28 : Schéma synthétique de la procédure de délivrance en Europe

Selon Grosset-Fournier C. & Dacheux A.⁴¹⁸.

II-Les brevets des anticorps thérapeutiques

La brevetabilité des anticorps thérapeutiques s'inscrit dans la très discutée brevetabilité des biotechnologies, définie par les règles 26 à 34 de la CBE. Le premier paragraphe de la règle 29 CBE institue notamment que « le corps humain, aux différents stades de sa constitution et de son développement, ainsi que la simple découverte d'un de ses éléments, y compris la séquence ou la séquence partielle d'un gène, ne peuvent constituer des inventions brevetables ». Le second, *a contrario*, énonce qu'un « élément isolé du corps humain ou autrement produit par un procédé technique, y compris la séquence ou la séquence partielle d'un gène, peut constituer une invention brevetable, même si la structure de cet élément est identique à celle d'un élément naturel ». De plus, la règle 27 CBE ajoute qu'une « matière biologique isolée de son environnement naturel ou produite à l'aide d'un procédé technique, même lorsqu'elle préexistait à l'état naturel, sont brevetables ». Les protéines naturelles recombinantes ou transgéniques comme un anticorps ou un facteur de coagulation, extraites, purifiées, caractérisées, sont ainsi brevetables⁴¹⁸.

Le rapport du Leem sur l'état des lieux des biomédicaments en France en 2014 montre l'importance prise par les anticorps thérapeutiques dans le chiffre d'affaire des sociétés pharmaceutiques⁴²⁰ (**Figure 29**).

Pour les firmes développant des anticorps thérapeutiques, les brevets sont des actifs indispensables permettant de couvrir les dépenses effectuées au cours des années passées à le développer, jusqu'à sa mise sur le marché. La rédaction et le dépôt d'un brevet arrive de fait très tôt dans le développement d'un médicament, durant la recherche dite « exploratoire » (**Figure 30**). Cette recherche ayant donné lieu à un brevet est poursuivie par des études précliniques dans des modèles animaux qui, s'ils s'avèrent favorables, donneront lieu à un passage chez l'homme, avec trois phases d'essais cliniques. Toutes ces phases de développement peuvent entraîner une commercialisation de la molécule 10 ans après le dépôt de brevet, limitant les retombées financières du demandeur aux seules années restantes, avant de voir tomber le brevet dans le domaine public, et voir arriver des biosimilaires, sur lesquels nous reviendrons à la fin de ce chapitre.

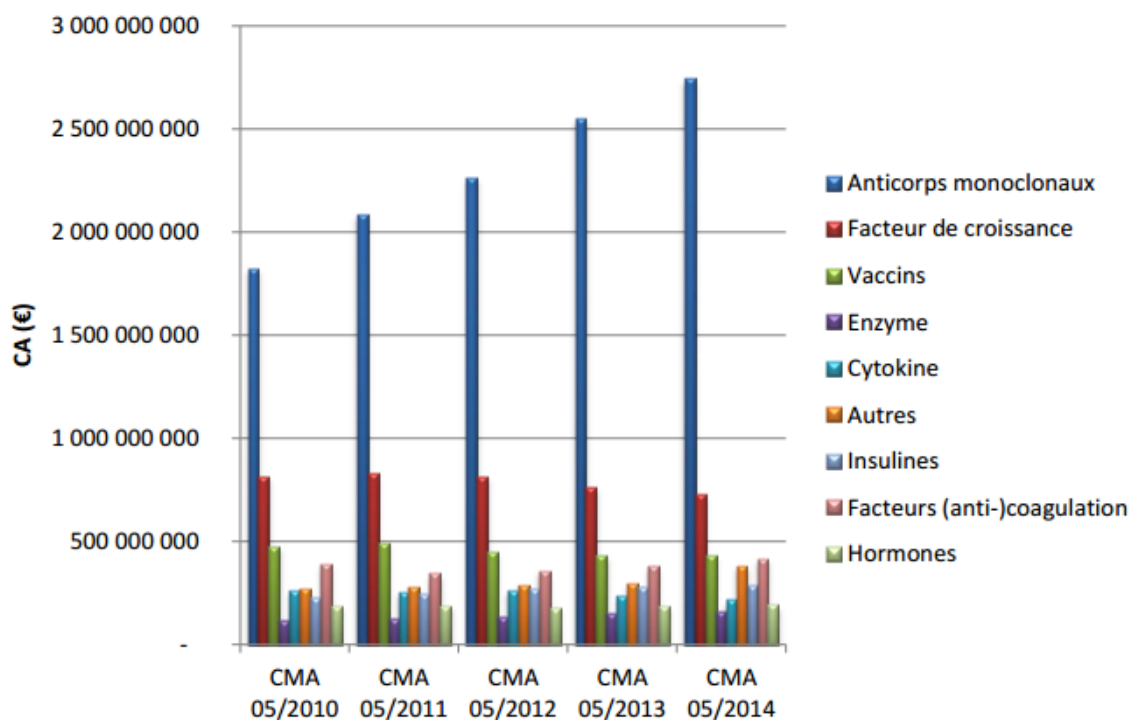


Figure 29 : Chiffre d'affaires total des biomédicaments par classe pharmaceutique en Cumul Mobile Annuel (CMA), de 05/2010 à 05/2014

Selon le LEEM⁴²⁰. Alors qu'ils ne représentent que 17% du marché des biomédicaments, derrière les vaccins à 35%⁴²⁰, les anticorps thérapeutiques montrent une claire domination dans les chiffres d'affaires, atteignant 2.7 milliards d'euros en 2014. Ceci traduit en partie le prix assez élevé des anticorps monoclonaux, motivé notamment par des coûts et un temps de développement très élevé.

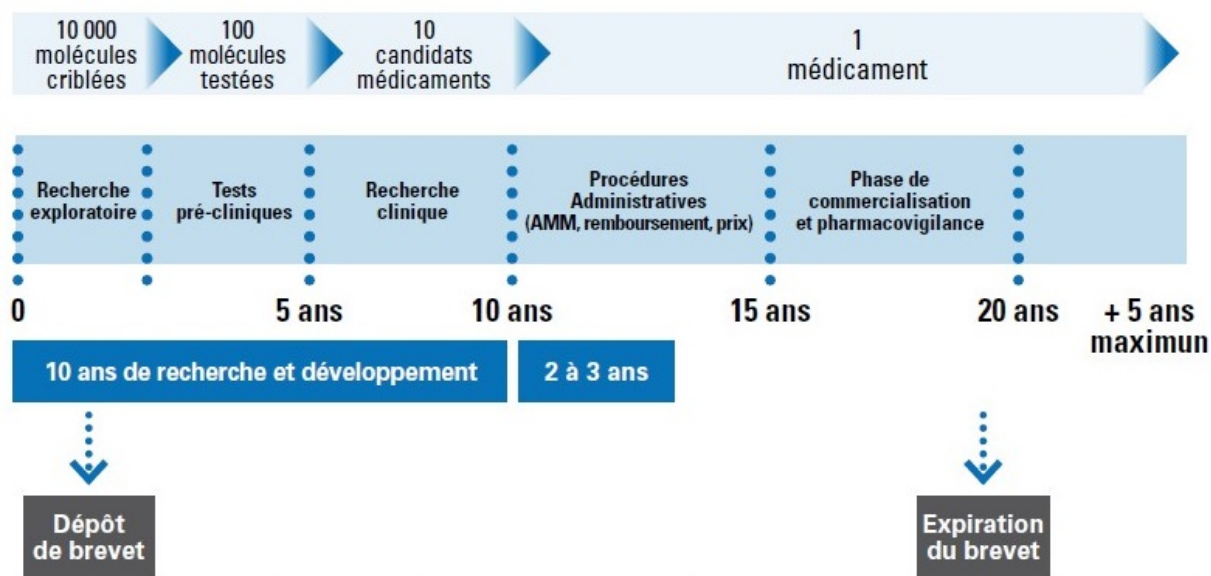


Figure 30 : Les différentes étapes de la vie d'un médicament, de la recherche à sa commercialisation

Selon Sophie Gautier⁴²¹.

① Le certificat complémentaire de protection (CCP)

Des solutions spécifiques ont donc été adoptées pour diminuer la perte de monopole entraînée par les multiples phases de développement propres aux médicaments. Une protection complémentaire, dénommée Certificat Complémentaire de Protection (CCP) est disponible. C'est un droit de propriété industrielle *sui generis* consistant à permettre à l'industrie du médicament de bénéficier d'une protection effective par le brevet en facilitant à la fois la réalisation des études et tests cliniques et la délivrance des autorisations de mise sur le marché⁴²². Cette protection complémentaire débute à l'expiration de la période de protection de 20 ans conférée par le brevet concerné. Il est régi par le règlement du Conseil de l'UE n° 1768/92 relatif aux médicaments et règlement conjoint du Parlement européen et du Conseil de l'UE n° 469/2009 du 6 mai 2009 relatif aux certificats complémentaires de protection pour lesdits médicaments⁴²². Pour obtenir un certificat complémentaire de protection :

- Le brevet protégeant le produit doit être encore en vigueur
- Le produit doit bénéficier d'une autorisation valable de mise sur le marché
- Le produit ne doit pas avoir déjà fait l'objet d'un certificat complémentaire de protection
- L'autorisation de mise sur le marché du produit doit avoir été délivrée pour la première fois

Ce certificat possède une durée maximale normale de validité de cinq ans, dépendante du processus applicable par rapport à l'autorisation de mise sur le marché. D'après le règlement conjoint du Parlement européen et du Conseil de l'UE n° 469/2009 du 6 mai 2009, la durée de la protection conférée par le certificat devrait être déterminée de telle sorte qu'elle permette une protection effective suffisante. À cet effet, le titulaire, à la fois d'un brevet et d'un certificat, doit pouvoir bénéficier au total de quinze années d'exclusivité au maximum à partir de la première autorisation de mise sur le marché, dans la Communauté, du médicament en question⁴²³.

② L'orientation des revendications protégeant les anticorps thérapeutiques

Les sociétés pharmaceutiques investissent beaucoup dans des demandes de brevets, dans le but d'assurer leur propriété intellectuelle et d'écarter les concurrents. La protection des anticorps thérapeutiques est particulière et s'oriente suivant différentes stratégies qui diffèrent légèrement entre l'OEB et l'Office Américain des Brevets (USPTO). Seront définies ici les stratégies propres à l'OEB.

Les revendications contiennent les détails juridiques du cadre protégé par le brevet, et peuvent porter sur différents aspects de l'anticorps. Depuis la décision T 645/01 de 2003, la Cour d'Appel de l'OEB a décidé qu'une revendication portant sur un anticorps se liant à une cible connue peut être considérée comme inventive si l'anticorps montre des propriétés spécifiques que n'ont pas les anticorps existant au préalable. Celles-ci peuvent inclure un autre épitope, une meilleure ou une nouvelle activité pharmacologique, moins d'effets secondaires...⁴²⁴. Ainsi, le brevet doit décrire les caractéristiques essentielles de l'anticorps et les indiquer dans les revendications, pour que la portée du brevet ne soit pas limitée par des restrictions inutiles, et empêcher les concurrents d'échapper au cadre du brevet en faisant une modification mineure de leur anticorps⁴²⁵.

Ces revendications peuvent décrire différentes caractéristiques d'un anticorps concernant sa structure, sa fonction, ou en mêlant ces deux aspects^{426,427}. Concernant la structure, l'anticorps peut être défini par sa séquence en acides aminés, entière ou partielle. Quand celle-ci est partielle, on retrouve majoritairement des revendications contenant le fragment variable VH-VL ou les 6 CDRs.

Exemple de revendication indépendante du brevet US2015266954 de Lilly

- « An antibody that binds to human IL-21, comprising a heavy chain variable region (HCVR) and a light chain variable region (LCVR) wherein the LCVR comprises SEQ.ID. NO:7 at CDRL1, SEQ. ID.NO:8 at CDRL2 and SEQ.ID.NO:9 at CDRL3 and wherein the HCVR comprises SEQ.ID. NO:10 at CDRH1, SEQ. ID.NO:11 at CDRH2 and SEQ.ID.NO:12 at CDRH3 »

Des versions tronquées contenant seulement l'un des deux domaines variables ou certains CDR sont également possibles, ainsi qu'une description des régions constantes seulement⁴²⁵. En termes de structure, l'anticorps peut également être défini par son format, par exemple s'il ne contient qu'un Fab, ou s'il est un scFv, par la structure de celui-ci.

Exemple de revendication indépendante du brevet WO2005007809 portant sur l'écilizumab :

- « A method for reducing antibody-mediated cell activation or inflammation events comprising administering an antibody which binds to either a cell surface molecule or a soluble molecule that binds to a cell surface molecule, the antibody including an engineered heavy chain constant region having a first portion derived from one or more human IgG2 antibodies and a second portion derived from one or more human IgG4 antibodies. »

Pour la fonction, l'intérêt premier d'un anticorps est la liaison à son antigène. C'est évidemment cette fonction qui est caractérisée dans la plupart des revendications portant sur les fonctions d'un anticorps. On la retrouve la plupart du temps par une revendication en « *An antibody to...* » suivie de l'antigène. L'anticorps peut être décrit également, notamment quand l'antigène est déjà décrit, par son épitope, par une réaction croisée avec d'autres antigènes, par la capacité d'être agoniste ou antagoniste, ou encore par le fait de se lier spécifiquement à un antigène et pas à un autre. Toujours pour décrire l'interaction à sa cible, l'anticorps peut être défini par ses constantes d'association ou/et de dissociation à l'antigène⁴²⁵, ou encore par une deuxième utilité médicale. On trouve également des revendications décrivant des fonctions indépendantes de la cible, abordant par exemple des propriétés pharmacologiques modifiées, ce qui nous intéresse ici principalement.

Exemple de revendication indépendante du brevet WO2006029879 de Roche :

- « An antibody, characterized in that said antibody binds OX40L, contains a Fc part derived from human origin and does not bind complement factor C1q. »

Un anticorps peut également être défini par le dépôt du matériel biologique permettant de produire l'anticorps, par exemple l'ADN plasmidique ou la cellule permettant de produire l'anticorps.

Exemple de revendication indépendante du brevet WO2004081049 d'Auckland Uniservices :

- « A monoclonal antibody 17F5 or fragment or derivative thereof, wherein the antibody is produced by hybridoma cell line ATCC PTA-5010. »

③ L'expiration des brevets des anticorps commercialisés et les biosimilaires

Au classement des médicaments les plus vendus au monde en 2015⁴²⁸, on retrouve à la deuxième place l'adalimumab d'Abbvie, l'étanercept de Pfizer en 4^{ème} position, l'infliximab de Merck en 6^{ème} position, et le rituximab et le bévacizumab de Roche en 9^{ème} et 10^{ème} positions. Ces positions traduisent le statut de blockbuster de ces anticorps, qui rapportent des milliards de dollars en chiffre d'affaire à leurs propriétaires. Malheureusement pour ceux-ci, ces molécules sont en « fin de vie », puisque approuvées entre 1998 et 2002. Leurs brevets arrivent ou sont déjà arrivés pour certains à expiration (Tableau 9), ouvrant la porte aux biosimilaires.

Tableau 9 : Les anticorps thérapeutiques pour lesquels des biosimilaires sont en développement

Anticorps	Société propriétaire de l'anticorps	Ventes (2014, en milliards dollars)	Expiration des brevets US	Expiration des brevets EU	Nombre de biosimilaires en développement	Sociétés majeures en stade avancé
Etanercept	Amgen/Pfizer	8.5	2028 [§]	2015	27	Merck/ Samsung Bioepis, Coherus, Sandoz
Adalimumab	AbbVie	12.5	2016	2018	24	Amgen, Sandoz
Infliximab	Johnson & Johnson/Merck	9.2	2018	2015	13	Celltrion, Hospira
Bévacizumab	Genentech/Roche	7.0	2019	2022	22	Amgen, Oncobiologics
Trastuzumab	Genentech/Roche	6.8	2019	2014	37	Actavis/Amgen/ Synthon, Biocad, Biocon/Mylan
Rituximab	Biogen/ Genentech/Roche	8.7	2018	2013	44	Sandoz, Boehringer Ingelheim

Selon Udpa & Million⁴²⁹. Les dates données sont basées sur la date prévue d'expiration des brevets protégeant la molécule originale. § Le brevet de l'Enbrel devait expirer en 2012, mais Amgen a reçu 17 années de protection additionnelle en raison d'un conflit lié à ce brevet.

D'après le code de Santé Publique, un médicament biosimilaire est similaire à un médicament biologique (substance complexe qui est produite à partir d'une cellule ou d'un organisme vivant ou dérivée de ceux-ci) de référence qui a déjà été autorisé en Europe. Ce médicament doit avoir des propriétés physico-chimiques et biologiques similaires, la même substance pharmaceutique et la même forme pharmaceutique que le médicament de référence. Enfin, l'efficacité et la sécurité doivent être équivalentes au médicament de référence. La production des médicaments biologiques est complexe car elle s'appuie sur des cellules ou des organismes vivants. En raison de la variabilité biologique de ces sources de production, certaines différences de fabrication peuvent impacter les propriétés pharmacologiques des produits issus de ces processus. Le dossier de demande d'AMM repose donc principalement sur une notion de comparaison avec un médicament choisi comme référence et surtout nécessite de soumettre des données dans les trois domaines de la qualité, de la sécurité et de l'efficacité clinique, tandis que pour le médicament générique, le dossier de qualité et l'étude de bioéquivalence suffisent. Ainsi la démonstration de la biosimilarité nécessite de nouveaux essais précliniques et cliniques. En Europe, le marché des produits biosimilaires n'est pas comparable à celui des médicaments génériques car, contrairement à ces derniers, les produits biosimilaires ne sont pas aujourd'hui substituables. Ces spécialités sont en moyenne 20 à 30 % moins chères que les produits de référence, et ne représentent à l'heure actuelle qu'une minorité des prescriptions incluant l'ensemble des spécialités de référence⁴³⁰.

Aujourd'hui, 21 biosimilaires sont autorisés et/ou commercialisés en Europe. Quatre d'entre eux sont des biosimilaires d'anticorps ou assimilés. Remsima, Inflectra et Flixabi sont des biosimilaires de l'infliximab, dont le brevet-clé a expiré en février 2015, et Benepali est un biosimilaire de l'étanercept, dont le brevet européen a expiré en octobre 2015. Bien plus de biosimilaires sont cependant en développement, on en compte notamment 27 pour l'étanercept, 24 pour l'adalimumab, 44 pour le rituximab, 37 pour le trastuzumab... (**Tableau 9**).

Travail personnel

Matériels et Méthodes

I-Présentation de la méthode

Une cartographie brevet consiste en l'analyse d'un domaine technologique à un instant précis, pour un pays ou une région donnée, ou mondialement^{431,432}. Elle permet classiquement de :

- Visualiser l'ensemble des dépôts de brevets dans le domaine d'étude
- Identifier les acteurs industriels et académiques, concurrents ou partenaires potentiels
- Détecter les experts et leurs réseaux de collaboration
- Identifier les brevets clés du domaine et les niches de développement
- Identifier les tendances et les technologies émergentes
- Analyser le positionnement technologique des déposants
- Analyser la validité des brevets

Dans le cadre du LabEx MAbImprove, les requêtes faites par les chercheurs, et notre travail de thèse vont plus loin que cette étude stratégique du paysage brevet. Il est ici question de déceler des informations scientifiques qui ne seraient pas disponibles dans la littérature classique, et/ou de compiler les données présentes dans les brevets pour en faire une base de données. Pour la réalisation de l'étude donnant lieu à cette thèse, et pour chacune des questions posées par les chercheurs de ce programme de recherche, a été appliqué un protocole en différentes étapes (**Figure 31**), qui seront détaillées davantage dans les paragraphes suivants.

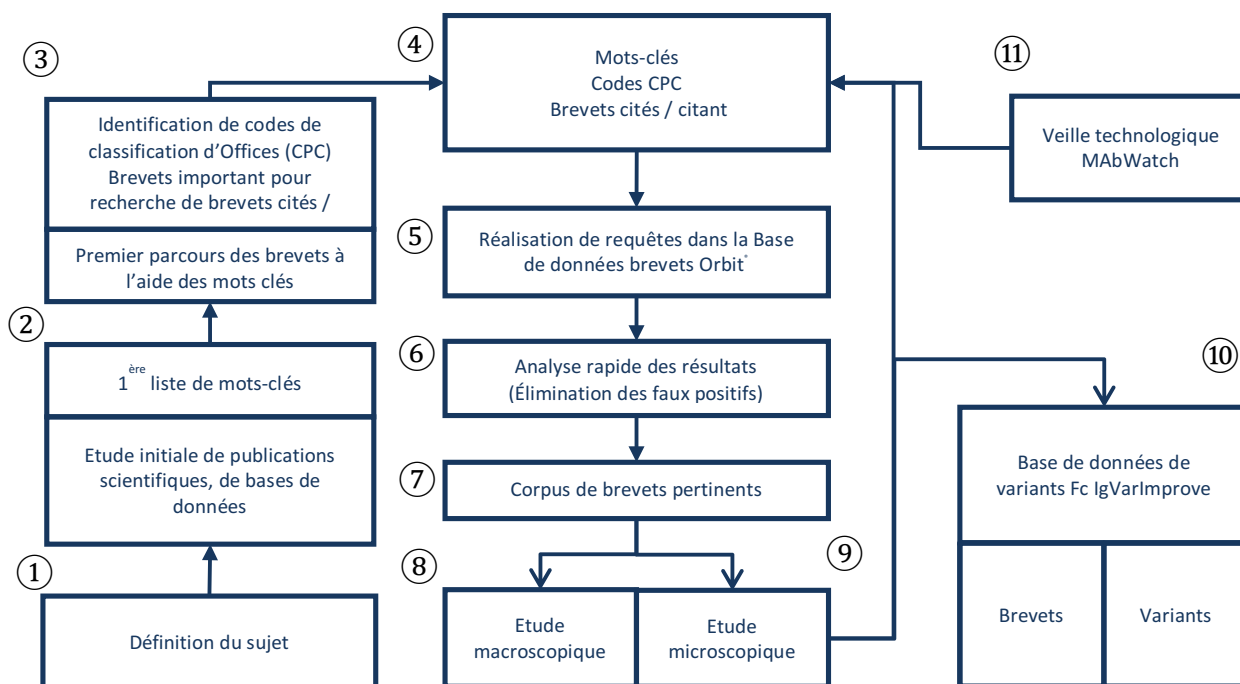


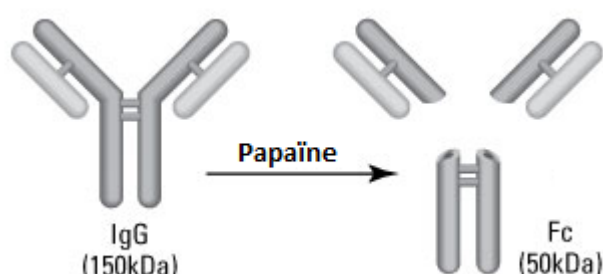
Figure 31 : Protocole de cartographie brevets mis en place

1 : Avant de débiter le protocole de recherche brevet, il est important de bien définir notre sujet et les bornes de celui-ci. 2 : Le protocole de recherche brevets débute par une étude bibliographique, des recherches sur internet et dans des bases de données permettant de constituer une première liste de mots-clés pertinents. 3 : Ces premiers mots-clés permettront de faire un premier recensement des brevets en rapport avec ces mots-clés, au sein de la base de données brevets que nous utilisons, Orbit[®], afin de mettre en évidence des codes de classifications d'offices de brevets permettant de renforcer les futures requêtes et également de caractériser des brevets importants et ceux qu'ils citent ou dans lesquels ils sont cités. 4 : Des mots-clés affinés, des codes de classification, et des numéros de brevets importants sont ainsi mis en évidence. 5 : A partir de ces trois types de critères, il est possible d'interroger la base de données de brevets Orbit[®] via des requêtes de façon itérative. 6 : L'analyse des résultats de celles-ci est effectuée, et les brevets pertinents pour notre sujet sont ainsi indexés dans un corpus de brevets. 7 : Ce corpus de brevet sera ensuite analysé de deux manières différentes. 8 : La première est une analyse que nous appelons « macroscopique » et qui correspond principalement à ce qui est entendu dans la définition classique d'une cartographie brevet. Son but est de faire ressortir des tendances présentes sur le corpus entier, telles que l'importance d'un déposant ou le nombre de dépôts de brevets par an. C'est ce qui est entendu majoritairement quand est abordé la réalisation d'une cartographie brevet. 9 : *A contrario* est également effectuée dans le cas présent une analyse dite « microscopique », qui correspond à l'analyse « en profondeur » du brevet, afin d'en faire ressortir des données scientifiques. 10 : Ces données scientifiques, ici des protéines contenant des portions Fc d'IgG ayant été modifiées, sont ensuite indexées dans une base de données de notre création, IgVarImprove, qui compile des informations sur les brevets et les variants qu'ils contiennent. 11 : Enfin, pour continuer de tendre à l'exhaustivité, nous réalisons une veille scientifique continue. Celle-ci s'organise premièrement par une surveillance de l'actualité autour des anticorps thérapeutiques, via la Newsletter MAbWatch qui est un des travaux complémentaires réalisés durant cette thèse. Une relance des requêtes brevets est également effectuée toutes les dix semaines pour incorporer les nouveaux brevets publiés pertinents dans notre corpus de brevets.

II-Définition du Fc et du champ d'inclusion des brevets

Avant de débiter ce protocole de recherche de brevets, commençant par l'identification de critères, notamment de mots-clés, il est important de bien définir l'un des déterminants de notre sujet, en l'occurrence le Fc, dont la définition peut varier.

Classiquement, celui-ci est défini et obtenu par la digestion à la papaïne, résultant en un fragment Fc et deux fragments Fab⁴⁰



(Figure 32).

Figure 32 : Digestion de l'IgG à la papaïne

Adapté de ThermoFisher Scientific⁴³³

La coupure est différente selon les sous-classes d'IgG et s'opère vers le milieu/fin de la charnière, donnant un Fc composé du CH2, du CH3 et de la partie C-terminale de la charnière (Figure 33).

Charnière															
Pos. (Eu)	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230
IgG1	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
IgG2	E	R	K	C	C	V			E		C	P	P	C	P
IgG4	E	S	K	Y	G				P	P	C	P	S	C	P

Figure 33 : Localisation des sites de clivage des IgG1, 2 et 4 à la papaïne

Les cystéines et leurs positions sont en gras. Le site de clivage est indiqué par un trait rouge. Les délétions d'acides aminés dans les séquences d'IgG2 et d'IgG4 sont indiquées en gris foncé. Le Fc tel qu'il est défini par la digestion à la papaïne est indiqué en jaune. Selon Berasain et al.⁴³⁴.

Après parcours des molécules commercialisées ou en développement intégrant des portions Fc d'IgG, aucune d'entre elles ne contenait finalement un Fc entrant dans cette définition, puisque toutes étaient créées par génie génétique, et non par fractionnement à la papaïne. De plus, n'utiliser qu'une partie de la charnière compliquait considérablement notre recherche brevets, notamment au niveau des mots-clés. C'est pourquoi nous avons décidé d'inclure la charnière entière dans notre recherche.

Ainsi, le Fc défini ici comprend la charnière entière, le CH2 et le CH3 de l'IgG. Nous caractérisons ces domaines grâce à la numérotation Eu⁴⁹, et délimitons la charnière de E216 à

P230, le CH2 de A231 à K340, et le CH3 de G341 à K447, selon la définition des domaines immunoglobuliniques retrouvée sur IMGT²⁶.

En partant de ces définitions, les familles de brevets doivent, pour être incluses dans notre corpus, contenir au moins une molécule contenant une portion Fc d'une immunoglobuline modifiée dans la charnière, le CH2 ou le CH3.

Cette modification peut être de trois types, selon ce que nous avons présenté précédemment :

- Modification d'acide(s) aminé(s) : retrait, ajout ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés
- Modification de type glycosidique : modification du patrimoine enzymatique de la cellule de production, traitement post-production dans le but de modifier le glycanne lié à l'asparagine 297 du CH2, ou utilisation d'une cellule de production particulière
- Modification de type domaine : retrait, ajout ou substitution de la région charnière, d'un domaine CH2 ou CH3

Sont ainsi exclus de cette définition les brevets qui traitent seulement de :

- Modification dans la partie Fab (VH-CH1 de la chaîne lourde et chaîne légère) d'une immunoglobuline
- Addition d'un composé chimique tel que le polyéthylène glycol (PEG) ou des agents cytotoxiques

III-Les critères permettant la formulation de la stratégie de recherche

Une cartographie brevet débute par l'identification de critères permettant de réaliser des requêtes dans une base de données brevets. Au contraire des publications scientifiques, où l'auteur et son éditeur cherchent la citation et décrivent ainsi efficacement le sujet de l'article, l'intérêt de l'inventeur/déposant est dans le cas du brevet d'essayer de ne pas être identifié par ses concurrents, ou du moins le plus tard possible. C'est pourquoi la recherche de brevets est plus difficile et nécessite de prendre en compte plusieurs types de critères pour maximiser les chances de tendre à l'exhaustivité, comme par exemple des codes de classification, permettant de remédier à cette difficulté.

Nous utilisons ainsi différents types de critères, suivant les informations disponibles ou recherchées :

- Mots clés (Termes génériques du domaine, noms d'inventeurs, de déposants, de technologies...)
- Codes de classification d'offices de brevets
- Numéros de brevets (Publication, demande, priorité, citation)

L'utilisation des mots-clés et des codes de classification va être décrite plus amplement dans les paragraphes suivants. L'utilisation des numéros de brevets sera abordée dans la section décrivant le test de la première liste de mots-clés dans la base de données de brevets, puisqu'ils en découlent.

① Les critères mots-clés

Les mots-clés sont les principaux critères permettant la réalisation de requêtes pertinentes pour rechercher des documents brevets, et servent également dans la recherche et l'identification des autres types de critères. Pour identifier des mots-clés dans le domaine scientifique, le moyen le plus efficace est de réaliser une étude bibliographique via l'interrogation de bases de données de publications comme MEDLINE, via son moteur de recherche PubMed, ou encore de Web of Science. Ces deux bases de données permettent l'accès à des publications scientifiques de très nombreux éditeurs via une recherche par mots-clés également, qu'il est possible de coupler grâce à des opérateurs booléens (AND / OR / NOT) ou de tronquer (*). Nous avons principalement interrogé PubMed et parcouru de nombreuses

publications provenant de différents journaux comme *Nature Biotechnology* ou *Mabs*, un journal spécialisé dans les anticorps thérapeutiques, afin d'identifier des mots clés permettant de caractériser des modifications dans la partie Fc des anticorps thérapeutiques. Des publications de différentes époques ont été parcourues, puisque notre sujet voit ses premiers développements dans le courant des années 1980. Durant les 30 ans qui nous séparent d'aujourd'hui, les connaissances et les termes associés ont évolué, et l'oubli de termes serait préjudiciable pour la pertinence de notre analyse. Par exemple, le FcRn était historiquement connu comme le récepteur de Brambell, du nom du biologiste à qui on doit sa découverte.

Au cours de cette étude bibliographique, il a été possible de percevoir la complexité de l'identification des mots-clés pertinents. En effet, s'il était simple de compiler des termes définissant des grands aspects de notre domaine, tel « *glycosylation* », « *amino-acid substitution* » ou encore « *increase effector function* », il était beaucoup plus complexe de décrire efficacement certains récepteurs comme les FcγR, puisque ceux-ci sont nommés différemment suivant la convention suivie. Pour un même récepteur, par exemple le FcγRIIIA, il existe toute une gamme de synonymes, suivant qu'on décrive la protéine ou le gène relié : FCGR3A, CD16, CD16A, FCG3, FCGR3, FCGR3, FCR-10, FCRIII, FCRIIIA, IGFR3, IMD20. Ceci complexifie la dénomination de ce récepteur et notre utilisation de ces noms dans nos requêtes brevets. On privilégiera de fait plutôt des mots génériques qui n'ont que peu d'alternative.

Les acronymes sont également un problème important, puisqu'ils sont très utilisés en biologie. Pour la plupart des activités ou récepteurs présents dans le domaine des anticorps thérapeutiques, sont retrouvés des termes assez longs laissant ainsi place à des acronymes, bien plus fréquemment utilisés que le terme original. Ainsi, « *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* » devient ADCC, « *complement-dependent cytotoxicity* » devient CDC, ou encore « *neonatal Fc receptor* » devient FcRn. Tous ces termes et acronymes sont bien évidemment à prendre en compte pour tendre à l'exhaustivité des brevets.

② Identification d'auteurs, de déposants et de technologies

L'identification des acteurs de ce domaine, auteurs et déposants, est directement corrélée à la recherche de mots-clés, puisqu'elle en découle. En effet, le parcours de publications permet de déceler les principaux auteurs du domaine et leur appartenance à des sociétés pharmaceutiques

ou à des équipes académiques. Ceci permet de compléter la recherche de mots-clés en allant parcourir les sites internet de ces sociétés et ainsi d'avoir des informations sur leur pipeline et leurs technologies, permettant d'utiliser des noms précis d'anticorps ou de technologies dans nos requêtes.

Ces noms d'auteurs, de déposants, ou de technologies ont ainsi permis de compléter nos requêtes.

③ Les bases de données anticorps

Des bases de données ont été également consultées en complément de la recherche de mots-clés via la littérature scientifique et les sites internet des sociétés pharmaceutiques.

La base TAD, pour « *Therapeutic Antibodies Database* », est une base de données initiée en 2001, devenue propre au LabEx MAbImprove en 2012, regroupant les anticorps thérapeutiques en développement, en essai clinique ou ayant été approuvés. C'est une base de données web hébergée sur un serveur de la Faculté de Médecine de l'Université François-Rabelais de Tours et contenant pour le moment 1290 entrées (avril 2016) provenant de différentes sources, plus ou moins confidentielles comme les bulletins d'INN de l'Organisation mondiale de la santé ou le pipeline des sociétés pharmaceutiques. Cette base indexe ainsi toutes les informations qu'il est possible de trouver sur un anticorps thérapeutique, de sa cible en passant par sa sous-classe, son allotype, ses différents noms, ou encore sa phase de développement. Bien sûr, toutes ces informations ne sont pas disponibles pour tous les anticorps, et des mises à jour régulières sont nécessaires. J'ai administré cette base pendant les deux dernières années de ma thèse, et le travail de saisie de nouveaux anticorps et de mise à jour des informations a été réalisé principalement par des étudiants de 5^{ème} année de Pharmacie. Cette base a donc permis à l'heure de la recherche de mots-clés de retrouver des noms d'anticorps modifiés dans le Fc en complément de ceux trouvés dans les pipelines des sociétés, où ne sont pas toujours mentionnées ces informations structurales.

IMGT, « The international ImMunoGeneTics information system[®] » référence mondiale en immunogénétique et immunoinformatique disponible en ligne, est une source intégrée de connaissances pointues spécialisées notamment dans les immunoglobulines. Cette ressource est fournie par une équipe de Montpellier membre du LabEx MAbImprove et est reconnue par l'OMS comme le système de référence international de description des anticorps

thérapeutiques, par lequel doivent passer tous les industriels pour obtenir une DCI des anticorps qu'ils développent. Dans le cadre de notre protocole de recherche de brevet, j'ai utilisé essentiellement la base mAb-DB. Cette base fournit des informations sur les anticorps monoclonaux thérapeutiques et protéines de fusion à portion d'immunoglobuline, dont leurs séquences quand elles sont disponibles. Cette base a été utilisée en complément de l'étude des publications et des autres bases de données pour identifier les anticorps modifiés dans leur Fc. Celle-ci a également été très utile tout au long de cette thèse pour trouver des séquences d'anticorps et avoir un accès rapide à un alignement de toutes les numérotations des acides aminés des domaines constants (CH1-charnière-CH2-CH3), grâce à une page appelée « Scientific Chart ». Cette page fournit pour les domaines constants d'IgG1 (CH1, CH2, CH3) et pour la charnière des quatre sous-classes une mise en correspondance de chacune des numérotations possibles, la numérotation unique IMGT pour les domaines constants, la numérotation IMGT des exons, la numérotation EU et la numérotation Kabat. Avec cet abaque, il est donc facile de faire correspondre des séquences quelle que soit la numérotation utilisée.

Enfin la base TABS est une base développée par Craic Computing, une société de consulting en bioinformatique, qui a fourni un accès gratuit au LabEx MAbImprove. Cette base compile des informations sur les anticorps thérapeutiques en développement, de la phase préclinique à la commercialisation, dont les articles scientifiques en lien avec l'anticorps, les brevets, la séquence si elle est disponible, et les avancées cliniques. Cette base a permis en complément des autres de retrouver des anticorps modifiés dans leur portion Fc, et de retrouver des séquences qui ne sont parfois accessibles que dans des brevets. Elle permet également de mettre en place une veille sur un ensemble précis d'anticorps, qui se caractérise par la réception quotidienne d'un mail récapitulatif indexant les nouveaux articles et essais cliniques en lien avec ce corpus.

④ Premier parcours de brevets et identification de brevets importants

Une première liste de mots-clés est utilisée pour réaliser un premier parcours de brevets du domaine. Ce premier parcours permet d'identifier de nouveaux mots-clés que l'on n'avait pu identifier dans la littérature, ou de préciser les différentes orthographes possibles de termes déjà identifiés. Cette précision est très importante puisque nous avons des brevets de différents

pays, notamment chinois, dont les traductions automatiques fournies par la base de données Orbit[®] sont parfois peu fiables. Nous pouvons de fait adapter les termes notamment au niveau des troncatures pour prendre en compte le plus grand nombre de versions du mot, sans risquer de perdre en résultats de requête.

Ce premier parcours de la littérature brevet permet également de mettre en évidence des brevets importants dans le domaine, régulièrement cités dans la partie « Background » ou état de l’art des brevets, et dont on va pouvoir se servir pour retrouver les brevets qu’ils citent ou les brevets les citant. On peut prendre par exemple le cas du brevet de Genentech « WO 200042072 » qui est l’un des brevets qui ressort en premier avec nos mots-clés. Son étude rapide nous a permis de compléter notre liste de mots clés et son numéro nous permettra de faire une recherche de brevets citants/cités afin de tendre un peu plus à l’exhaustivité.

Pour finir, il est important de rappeler que malgré la quantité de termes utilisés et l’exhaustivité recherchée, la recherche de brevets est un exercice compliqué qui nécessite plusieurs étapes d’optimisation. Plutôt que d’utiliser une seule requête qui serait très longue compte tenue de notre sujet, nous avons décidé de lancer plusieurs requêtes plus courtes, qui permettront de voir diminuer le nombre de brevets ajoutés dans le corpus au fur et à mesure, et ainsi de contrôler le niveau d’exhaustivité. Cette méthode permet de diminuer le risque de passer à côté d’un brevet, risque qui reste malgré tout présent. C’est pourquoi, pour aller plus loin dans l’exhaustivité, nous avons également utilisé en plus des mots-clés des codes de classification apposés par les Offices de Brevets.

⑤ Les mots-clés et les brevets importants identifiés

Au cours du travail réalisé et décrit dans les paragraphes précédents, nous avons identifié des critères mots-clés (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Mots clés identifiés dans la littérature et dans les brevets

IgG	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	FcγR
Glycosylation	Glycan	Galactose	Glyco-engineering	FcRn	Polypeptide
Variant	Aglycosylation	Fucose	GlcNAc	Antibody	Immunoglobulin
Phagocytosis	Effector function	Pharmacokinetics	Biodistribution	C1q	Pharmacodynamics
CDC	Half-life	Substitution	Mutation	Improve	Increase
ADCC*	Peptibody	Modification	Amino-acid	Decrease	Mimetibody
Fc	CH2	CH3	Hinge	Glycoform	ScFc
Fusion protein	Altered	Knob in hole	Protuberance into cavity	Potelligent	Glycomab

Glycoexpress	Emabling	Multispecific	Bispecific	Multivalent	FcγR
class_class chimaera	DI17E6	MEDI5117	MGA271	MGAH22	lirilumab
Engineering	Bisecting	clazakizumab	BMS-945429	Blisibimod	XmAb5592
Ublituximab	MS4A1	R593	RG7160	MTRX1011A	conbercept
KH902	atacept	clenoliximab	blosozumab	LY2541546	IDEC-151
crenezumab	MABT5102A	tabalumab	ecromeximab	KM871	otelixizumab
abatacept	BMS-188667	belatacept	galiximab	IDEC-114	romiplostim
AMG531	trebananib	KM3065	benralizumab	KHK4563	BIW-8405
MEDI-563	KM2760	vedolizumab	Teplizumab	bimagrumab	ocaratumzumab
AME-133v	CSL362	1B20	tanezumab	ponezumab	Roledumab

*On inscrit ici un terme générique incorporant toutes les formes d'un terme (par exemple pour ADCC est inclus également « *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* »).

En complément de ces mots-clés, deux brevets majeurs ont pu être identifiés par un premier lancement de requêtes (Tableau 11). Nous avons également identifié les brevets les plus anciens trouvés après notre première lancée des requêtes. On se servira des numéros de ces deux types de brevets pour compléter notre corpus.

Tableau 11 : Brevets utilisés pour vérifier et compléter l'exhaustivité du corpus de brevets

Numéro de brevet	Déposant	Intérêt
WO8807089	SCOTGEN BIOPHARMACEUTICALS	Premiers brevets pertinents du corpus de brevets
GB8824869	3I RESEARCH EXPLOITATION	
EP0327378	BECTON DICKINSON COLUMBIA UNIVERSITY	
GB8905669	UCB	
EP0359096	BECTON DICKINSON COLUMBIA UNIVERSITY	
WO9428027	MACROGENICS	
WO200042072	GENENTECH	Premier brevet de Genentech contenant beaucoup de variants
WO2004029207	XENCOR	Premier brevet de Xencor contenant beaucoup de variants

⑥ Les codes de classification de brevets

Le nombre de brevets déposés par an augmente chaque année, complexifiant peu à peu la recherche dans les bases de données de brevets. Dans l'optique de faciliter ce processus de recherche, différentes classifications de brevets ont été définies par les offices de brevet. Nous avons utilisé dans le cadre de ce protocole la classification dite « CPC » pour « *Cooperative*

Patent Classification » car elle proposait des codes pertinents pour notre sujet. Cette classification mise en place à la fin de l'année 2010 provient d'une coopération entre l'OEB et l'USPTO pour uniformiser leurs systèmes de classification des brevets (ECLA et USPC respectivement) et migrer vers un système commun. La migration vers ce système CPC se fonde principalement sur la classification ECLA, qui était une version plus spécifique et détaillée de la classification internationale des brevets, dite « CIB » en français et « IPC » en anglais, qui est la seule classification utilisée par tous les offices et administrée par l'OMPI. La classification internationale définit d'ailleurs l'intérêt de ces classification par quatre grands points⁴³⁵. Une classification de brevets est donc :

- Un instrument permettant de ranger méthodiquement les documents de brevet afin de rendre aisément accessible l'information technologique et juridique qu'ils contiennent
- Un moyen permettant la diffusion sélective de l'information à tous les utilisateurs de l'information en matière de brevets
- Un moyen permettant de rechercher l'état de la technique dans des domaines déterminés
- Un moyen permettant d'établir des statistiques de propriété industrielle qui permettent, à leur tour, d'analyser l'évolution des techniques dans divers secteurs

La classification CPC est ainsi une version unifiée des classifications ECLA et USPC, ayant une structure similaire à celle de la classification CIB mais en plus détaillé pour améliorer la recherche de brevets. Chaque brevet se verra apposer plusieurs codes de classification CPC en fonction de son sujet.

Cette classification est divisée en neuf sections, A-H et Y, à leurs tours subdivisées hiérarchiquement en classes, sous-classes, groupes et sous-groupes.

- A : Nécessités courantes de la vie
- B : Techniques industrielles diverses ; transports
- C : Chimie ; métallurgie
- D : Textiles ; papier
- E : Constructions fixes
- F : Mécanique ; éclairage ; chauffage ; armement ; sautage
- G : Physique
- H : Electricité
- Y : Regroupe les nouveaux développements technologiques interdisciplinaires.

Ces huit sections se divisent ensuite en plusieurs dizaines de milliers de sous-groupes. Les sections sont segmentées en classes (représentées par deux chiffres), à leur tour scindées en sous-classes (représentées par une lettre). Ces sous-classes sont ensuite partagées en groupes

(représentés par un à trois chiffres), eux-mêmes finalement divisés en sous-groupes, dernier niveau hiérarchique de la classification CPC (Figure 34).

C	07	K	2316/00
SECTION	CLASSE	SOUS-CLASSE	GROUPE PRINCIPAL
			2316/52
			SOUS-GROUPE

Figure 34 : Représentation schématique d'un code CPC complet : C07K 2316/52

Le code CPC est composé de Sections (Une lettre A-H ou Y, ici C), Classes (Deux chiffres, ici 07), Sous-classes (Une lettre, ici K), Groupes (De un à quatre chiffres suivi d'un slash oblique, ici 2316/), Sous-groupes (Au moins deux chiffres, ici 2316/52).

Identification de codes de classification CPC pertinents

Le principal avantage de la classification CPC est qu'elle nous fournit des codes spécifiques aux anticorps thérapeutiques et à leurs modifications. L'index des codes de classification CPC est disponible sur le site Espacenet, dépendant de l'OEB, permettant également la recherche de documents brevets. Deux stratégies sont envisageables pour identifier des codes de classification CPC en rapport avec notre sujet. La première est en lien avec le test des mots-clés réalisé dans la base de données de brevets Orbit[®]. Dès lors qu'est lancée une requête dans cette page, un outil appelé « Top 50 » est disponible et permet d'avoir accès à une liste des codes CPC principaux pour les résultats de la requête (Figure 35). En multipliant les requêtes tests avec

Analyse à partir de la sélection	
TOP 50 des codes CPC	
Veuillez choisir les codes CPC que vous désirez utiliser pour préciser votre recherche.	
☐	Percent
☐	CPC codes
☒	100.00% C07K-2316/95
☐	52.17% C07K-2317/565
☐	52.17% C07K-2317/73
☐	50.00% A61K-2039/505
☐	50.00% C07K-2317/24
☐	50.00% C07K-2317/75
☐	47.82% C07K-2317/56
☐	43.47% C07K-2316/96
☐	43.47% C07K-2317/92
☐	36.95% C07K-2317/76
☐	28.26% C07K-2317/55
☐	26.08% C07K-2317/74
☐	23.91% C07K-016/28/18
☐	23.91% C07K-2317/34
☐	23.91% C07K-2317/732
☐	21.73% C07K-016/28

nos mots-clés et en explorant les descriptions de ces codes, il est possible de constituer un groupe de code CPC pertinents pour nos requêtes futures.

Figure 35 : Exemple de codes de classification présents dans les résultats d'une requête, et pourcentage de leur présence sur le groupe de résultats

Ce Top 50 fournit les 50 codes les plus présents dans les résultats de la requête, avec le pourcentage de brevets concernés. Ici, 100% des brevets ont le code C07K 2316/95. Il est ensuite possible de cliquer sur le code en question pour avoir sa description sur Espacenet. Ce code décrit : « *Antibodies with agonistic, e.g. apoptotic, activity upon their specific binding to an antigen* ».

La deuxième stratégie de recherche est d'interroger directement le portail disponible sur Espacenet pour les codes CPC. En utilisant les mots-clés identifiés dans la littérature, il est possible de mettre en évidence des codes répondant aux termes énoncés dans la requête (**Figure 36**).

Ces deux stratégies nous ont ainsi permis d'identifier les codes CPC pertinents (**Tableau 12**). L'intérêt de cette classification réside principalement dans le fait d'avoir des codes très précis concernant les anticorps, avec notamment des codes comme « C07K2317/52 » qui portent sur « *Constant or Fc region; Isotype* » d'un anticorps, ou des codes comme « C07K2317/71 » ou « C07K2317/72 » portant respectivement sur « *Decreased effector function due to an Fc-modification* » et « *Increased effector function due to an Fc-modification* », des propriétés directement liées à notre sujet. Ces codes sont donc idéaux pour limiter le bruit de fond ou compléter nos requêtes.

Classification coopérative des brevets

Entrez	antibodies	Recherche	Afficher la section	Index	A	B	C	D	E	F	G	H	Y
« C07K2299/00 C07K2317/00 »													
Symbole	Classification et description												
▼ ★★☆☆	☐	C07K 16/00	Immunoglobulins [IGs], e.g. monoclonal or polyclonal antibodies { (antibodies with enzymatic activity, e.g. abzymes C12N 9/0002) }										
▼ ★★☆☆	☐	C07K 2317/00	Immunoglobulins specific features										
▼ ★★☆☆	☐	A61K 39/00	Medicinal preparations containing antigens or antibodies (materials for immunoassay G01N 33/53)										
▼ ★★☆☆	☐	G01N 33/00	Investigating or analysing materials by specific methods not covered by the preceding groups										
▼ ★★☆☆	☐	A61K 47/00	Medicinal preparations characterised by the non-active ingredients used, e.g. carriers, inert additives										
▼ ★★☆☆	☐	A61K 31/00	Medicinal preparations containing organic active ingredients										
▼ ★★☆☆	☐	A61K 45/00	Medicinal preparations containing active ingredients not provided for in groups A61K 31/00 to A61K 41/00										
▼ ★★☆☆	☐	G01N 2333/00	Assays involving biological materials from specific organisms or of a specific nature										
▼ ★★☆☆	☐	G01N 2800/00	Detection or diagnosis of diseases										

Figure 36 : Exemple de résultats après interrogation du portail d'Espacenet avec le mot « antibodies »

En cherchant avec le mot « *antibodies* », nous retrouvons des groupes principaux en rapport avec la question posée, « C07K16/00 », qui porte sur « *Immunoglobulins [IGs], e.g. monoclonal or polyclonal antibodies* », ou le deuxième « C07K 2317/00 », qui porte sur « *Immunoglobulins specific features* ».

Tableau 12 : Codes de classification CPC pertinents

Codes de classification CPC	Définitions des codes de classification CPC
C07K 2317/72	<i>Increased effector function due to an Fc-modification</i>
C07K 2317/71	<i>Decreased effector function due to an Fc modification</i>
C07K 2317/41	<i>Glycosylation, sialylation, fucosylation</i>
C07K 2317/732	<i>ADCC</i>
C07K 2317/732	<i>ADCC - souris</i>
C07K 2317/734	<i>CDC</i>
C07K 2316/52	<i>Fc</i>
C07K 2317/526	<i>CH3</i>
C07K 2317/524	<i>CH2</i>
C07K 2317/53	<i>Hinge</i>
C07K 2317/52	<i>Constant or Fc region; isotype</i>
C07K 2317/64	<i>Comprising a combination of variable region and constant region components</i>
C07K 2317/66	<i>Comprising a swap of domains, e.g. CH3-CH2, VH-CL or VL-CH1</i>
C07K2316/95	<i>Antibodies with agonistic, e.g. apoptotic, activity upon their specific binding to an antigen</i>
C07K 2317/40	<i>Characterized by post-translational modification</i>
C07K2317/94	<i>Stability, e.g. half-life, pH, temperature or enzyme-resistance</i>
C07K 16/46	<i>Hybrid immunoglobulins (hybrids of an immunoglobulin with a peptide not being an immunoglobulin)</i>

IV-Réalisation de requêtes dans la base de données brevets Orbit®

① Généralités sur la base de données Orbit®

Toutes les procédures de recherche de brevets réalisées dans le cadre de cette thèse sont effectuées sur Orbit®, un outil professionnel de recherche sur la littérature brevet fourni par la société française Questel. Orbit® rassemble les informations de 95 offices nationaux (dont les textes intégraux de plus de 20 offices), traduites en anglais, avec une structuration en famille de brevets (Collection mondiale FAMPAT), une normalisation des noms de déposants, des inventeurs et du statut. Dans FamPat, Questel a développé une définition de la famille qui combine la règle de famille stricte de l'OEB avec des règles complémentaires qui permettent de prendre en compte les différentes définitions des offices de brevets de ce qu'est une invention, en particulier pour les publications japonaises, les liens avec la demande parente EP et/ou PCT et les liens entre les demandes US provisoires et publiées. Cependant, l'intérêt majeur de cette base de données brevets n'est pas son contenu, disponible également dans des bases de données gratuites telle Espacenet, mais la façon dont celui-ci est accessible et consultable.

② Recherche de brevets dans la base de données Orbit®

Orbit® permet de rechercher des brevets grâce aux critères définis précédemment, en les couplant à l'aide d'opérateurs (« ET », « OU », « SAUF », ...), ou de troncatures (« + », « ? », « # ») de la même façon que dans PubMed et Web of Science (**Annexe 6**).

Pour les requêtes mots-clés, il est important de déterminer dans quelles parties des brevets cette requête sera effectuée, dans le but d'obtenir un maximum de résultats pertinents, tout en limitant le bruit de fond et ainsi la perte de temps. Orbit® permet ainsi d'effectuer une recherche mots-clés sur neuf options disponibles autour d'un brevet : Titres – Abrégés – Revendications – Descriptions – Objet de l'invention – Avantages de l'invention sur l'art antérieur – Revendications indépendantes – Concepts – Textes intégraux. Nous avons décidé d'adapter les champs interrogés du brevet en fonction de la requête, en testant le nombre de brevets proposés dans les résultats. La plupart des requêtes mots-clés sont effectuées sur la combinaison Titre – Abrégés – Revendications indépendantes, permettant de retrouver nos termes dans les parties essentielles du brevet, et ainsi éliminer immédiatement une grande partie du bruit de fond.

L'idéal dans notre cas est de réaliser plusieurs recherches par mots-clés, qui éviteront l'empilage de mots et seront plus précises. Pour éviter de retomber sur les mêmes brevets, il est possible grâce à l'historique de recherche d'Orbit® de réaliser une requête à l'aide de l'opérateur « SAUF » pour éliminer les familles de brevets identiques à celles de la requête précédente. Ceci permet de limiter le nombre de brevets et les erreurs et de tendre à l'exhaustivité.

③ Description des requêtes définitives

Les requêtes définitives mises en forme et qui seront utilisées dans Orbit® pour trouver des brevets pertinents sont décrites dans les tableaux suivants (Tableau 13).

Tableau 13 : Requêtes mots-clés et champ d'application des requêtes

Mots-clés	Requêtes Orbit®	Champ de recherche*
Variant Fc	Variant+ ET Fc	T+A+RI
Modification, substitution, mutation des acides aminés du Fc, ou modification de la glycosylation du Fc	(amino_acid+ ET (modif+ OU Variant+ OU Substi+ OU mutat+) ET Fc) OU (Glyco+ ET (Variant+ OU modif+ OU Improv+ OU Engin+) ET Fc)	T+A+RI
Anticorps aglycosylés	Aglyco+ ET antibo+	T+A+RI
Anticorps déglycosylés	Deglyco+ ET antibo+	T+A+RI
Modification ou variation ou mutation d'acides aminés dans le CH2 ou le CH3	((amino_acid+) ET (CH3 ou CH2) ET (modif+ OU Variant+ OU mutat+))	T+A+RI
ADCC	ADCC OU (Antibody_dependent_cell_mediated_cytotoxicity) OU (Antibody_dependent_cell+_cytotoxicity)	T+A+RI
Mimetibodies	Mimetibo+	TI
Peptibodies	Peptibo+	TI
Glycoformes d'anticorps	Antibo+ ET glycoform+	T+A+RI
FcRn	FcRn	T+A+RI
stradobodies	Stradobo+	TI
CDC ou C1q	((Complement_depend?nt_cytotoxicity) OU (Cytotoxicity_dependent_of_the_complement) OU (C1q_binding) OU (Clq_binding) OU (complement_system) OU (Complement ET cytotoxicity et depend?nt) OU (complement_mediat+_cytotoxicity) OU (complement_phr pathway) OU (complement_depend?nt_cell+_cytotoxicity) OU (complement_dependence_cytotoxicity) OU (C1q) OU (Clq) OU (CDC)) ET (Fc OU antibo+ OU CH2 OU IgG OU Immunoglobulin+)	T+A+RI
Protéines de Fusion contenant une portion Fc	(Fusion_phr protein) et Fc	T+A+RI
Anticorps modifiés	altered_phr antibo+	T+A+RI
ScFc	ScFc	TI
	(Igg2_IGG4) OU (class_class chimaera)	TI
« Chimérique » inter-classes	OU (dans l'outil de couplage de résultat) (igg1_igg2) OU (igg1_igg3) OU (igg3_igg4) OU (igg2_igg3)	T+A+R
	(antibo+) ET ((knob into hole) OU (knob in hole) OU (+Into_cavity)	TI
Techniques bispécifiques : Knob into hole	OU (dans l'outil de couplage de résultat) (antibo+ ET protuberance+)	T+A+R

Techniques brevetées de modification glycosidique de cellule hôte (POTELLIGENT, GLYCOMAB, GLYCOEXPRESS, EmABLING)	potelligent OU glycomab OU glycoexpress OU (emabling ET lfb)	TI
Anticorps multispécifiques, bispécifiques	((multispecific OU multivalent OU bispecific) ET antibo+)	T+A+RI
Anticorps connus comme étant modifiés dans leur partie Fc	((roledumab) OU (R593) OU (ublrituximab) OU (MS4A1) OU (visilizumab) OU (HuM291) OU (Imgatuzumab) OU (GA201) OU (RG7160) OU (MTRX1011A) OU (conbercept) OU (KH902) OU (atacept) OU (clenoliximab) OU (IDEC-151) OU (blosozumab) OU (LY2541546) OU (tabalumab) OU (crenezumab) OU (MABT5102A) OU (ecromeximab) OU (KM871) OU (otelixizumab) OU (abatacept) OU (BMS-188667) OU (belatacept) OU (galiximab) OU (IDEC-114) OU (romiplostim) OU (AMG531) OU (trebananib) OU (KM3065) OU (benralizumab) OU (KHK4563 OU BIW-8405 OU MEDI-563) OU (KM2760) OU (vedolizumab) OU (Teplizumab) OU (bimagrumab) OU (ocaratuzumab) OU (AME-133v) OU (CSL362) OU (1B20) OU (tanezumab) OU (ponezumab) OU (lirilumab) OU (DI17E6) OU (MEDI5117) OU (MGA271) OU (MGAH22) OU (Blisibimod) OU (XmAb5592) OU (clazakizumab) OU (BMS-945429)) ET ANTIBO+	TI

*T : Titre, A : Abrégé, R : Revendications, RI : Revendications indépendantes, TI : Texte Integral

En complément de ces requêtes sont utilisés, comme indiqué précédemment, des codes de classification CPC pour tendre à la pertinence. Ces codes sont utilisés pour la majorité d'entre eux seuls, car leur définition est assez spécifique de notre sujet, et recoupe les sujets abordés dans les mots-clés (Tableau 14).

Tableau 14 : Requêtes réalisées avec les codes de classification CPC

Définition du code CPC	Code CPC
Increased effector function due to an Fc-modification	C07K 2317/72
Decreased effector function due to an Fc modification	C07K 2317/71
Glycosylation, sialylation, fucosylation	C07K 2317/41
ADCC	C07K 2317/732
ADCC - souris	Requête mot-clé : Human SAUF (murin+ OU mouse) Couplée à C07K 2317/732
CDC	C07K 2317/734
Fc	C07K 2316/52
CH3	C07K 2317/526
CH2	C07K 2317/524
Hinge	C07K 2317/53
Constant or Fc region; isotype	C07K 2317/52
Comprising a combination of variable region and constant region components	C07K 2317/64
Comprising a swap of domains, e.g. CH3-CH2, VH-CL or VL-CH1	C07K 2317/66
Antibodies with agonistic, e.g. apoptotic, activity upon their specific binding to an antigen	C07K2316/95
Characterized by post-translational modification	C07K 2317/40
Stability, e.g. half-life, pH, temperature or enzyme-resistance	C07K2317/94
Hybrid immunoglobulines (Immunoglobulin + something else)	C07K 16/46

Enfin, les requêtes cherchant à étudier les citations des brevets les plus anciens et les plus importants du corpus sont également lancées, pour renforcer l'exhaustivité de notre corpus de brevets (Tableau 11).

④ Analyse des résultats à l'aide de l'outil de surbrillance

La base de données Orbit[®] a été interrogée à l'aide des requêtes décrites précédemment. Nous obtenons en résultat des familles de brevets qui répondent à notre requête. Parmi les résultats, seulement une part de ces familles est pertinente pour notre sujet.

L'autre partie contient des brevets dits « faux positifs », qui ne seront pas indexés dans notre corpus de brevets pertinents. Pour identifier facilement les brevets pertinents est utilisé un outil dît de « Surbrillance » dans Orbit[®], qui permet comme son nom l'indique de mettre en surbrillance des mots-clés préalablement renseignés (Figure 37).

Surbrillance

Vous pouvez ajouter les termes que vous souhaitez voir en surbrillance.

Mes profils : Fc variants (Ne pas effacer) ▼ 📁 ✖

☒	 	antibo+, immunoglo+, igg+
☒	 	fc, ch2, ch3, hinge, scfc, fc+
☒	 	adcc, cdc, complement, complement dependent cytotoxicity, antibody dependent cell-mediated cytotoxicity,
☒	 	glyco+, fuco+, galacto+, sialic+, mann+, bissec+, aglyco+
☒	 	variant+, enhanc+, modif+, enginee+, increa+, decrea+, mut+
☒	 	amino acid+, peptid+

Figure 37 : Outil de surbrillance d'Orbit et les mots clés associés

Les mots-clés sont indiqués et assignés à une couleur, dans laquelle ils apparaîtront ensuite dans Orbit[®].

A l'aide de cet outil nous pouvons facilement identifier la présence des mots caractérisant notre sujet, et conclure sur la pertinence ou non d'une famille de brevets (Figure 38).

Example 3. ADCC of Fc variants

[0265] In order to determine the effect on effector function, cell-based ADCC assays were performed on select Fc variants. ADCC was measured using the DELFIA (Registered trademark EuTDA-based cytotoxicity assay (Perkin Elmer, MA) with purified human peripheral blood monocytes (PBMCs) as effector cells. Target cells were loaded with BATDA at 1x10⁶ cells/ml, washed 4 times and seeded into 96-well plate at 10,000 cells/well. The target cells were then opsonized using Fc variant or WT antibodies at the indicated final concentration. Human PBMCs, isolated from buffy-coat were added at the indicated fold-excess of target cells and the plate was incubated at 37 deg.C for 4 hrs. The co-cultured cells were centrifuged at 500xg, supernatants were transferred to a separate plate and incubated with Eu solution, and relative fluorescence units were measured using a Packard Fusion (Registered Trademark alpha -FP HT reader (Packard Biosciences, IL). Samples were run in triplicate to provide error estimates (n=3, +/- S.D.). PBMCs were allotyped for the V158 or F158 Fcgamma RIIIIa allotype using PCR.

[0266] ADCC assays were run on Fc variant and WT alemtuzumab using DoHH-2 lymphoma target cells. Fig. Figure 23a is a bar graph showing the ADCC of these proteins at 10 ng/ml antibody. Results show that alemtuzumab Fc variants I332E, V264I, and I332E/V264I have substantially enhanced ADCC compared to WT alemtuzumab, with the relative ADCC enhancements proportional to their binding improvements to Fcgamma RIIIIa as indicated by AlphaScreen assay and SPR. The dose dependence of ADCC on antibody concentration is shown in Fig. Figure 23b. The binding data were normalized to the minimum and maximum fluorescence signal for each particular curve, provided by the baselines at low and high antibody concentrations respectively. The data were fit to a sigmoidal dose-response model using nonlinear regression, represented by the curve in the figure. The fits enable determination of the effective concentration 50% (EC50) (i.e. the concentration required for 50% effectiveness), which provides the relative enhancements to ADCC for each Fc variant. The EC50s for these binding data are analogous to the IC50s obtained from the AlphaScreen competition data, and derivation of these values is thus analogous to that described in Example 2 and Fig. Figure 11. In Fig. Figure 23b, the log(EC50)s, obtained from the fits to the data, for WT, V264I/I332E, and S239D/I332E alemtuzumab are 0.99, 0.60, and 0.49 respectively, and therefore their respective EC50s are 9.9, 4.0, and 3.0. Thus V264I/I332E and S239D/I332E provide a 2.5-fold and 3.3-fold enhancement respectively in ADCC over WT alemtuzumab using PBMCs expressing heterozygous V158/F158 Fcgamma RIIIIa. These data are summarized in Table 5 below.

(see table) [Unformatted table follows]

-- Table 5

-- log(EC50) EC50 (ng/ml) Fold WT

-- WT 0.99 9.9

-- V264I/I332E 0.60 4.0 2.5

-- S239D/I332E 0.49 3.0 3.3

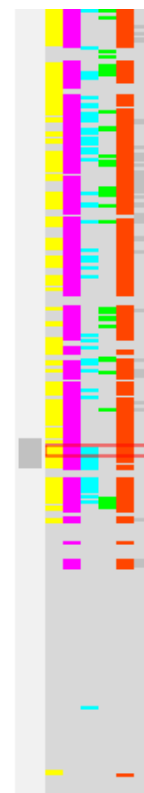


Figure 38 : Exemple d'utilisation de l'outil de surbrillance dans l'analyse des résultats de requêtes

Ici le brevet montre dans son exemple 3 une évaluation de l'activité ADCC de variants Fc, indiquant la pertinence de celui-ci.

⑤ Indexation des familles de brevets et création du corpus de brevets

A l'aide des requêtes et de l'outil de surbrillance, nous avons pu identifier un nombre important de brevets pertinents à indexer dans notre corpus (Tableau 15).

Tableau 15 : Nombre de familles de brevets indexées dans le corpus de brevet durant la première salve de requêtes

Requêtes Orbit®	Nombre de familles de brevets indexées*
Variant+ ET Fc	221
(amino_acid+ ET (modif+ OU Variant+ OU Substi+ OU mutat+) ET Fc) OU (Glyco+ ET (Variant+ OU modif+ OU Improv+ OU Engin+) ET Fc)	197
Aglyco+ ET antibo+	17
Deglyco+ ET antibo+	1
((amino_acid+) ET (CH3 ou CH2) ET (modif+ OU Variant+ OU mutat+))	28
ADCC OU (Antibody_dependent_cell_ mediated_cytotoxicity) OU (Antibody dependent cell+ cytotoxicity)	47
Mimetibo+	18
Peptibo+	15
Antibo+ ET glycoform+	3
FcRn	45
Stradobo+	1
((Complement_depend?nt_cytotoxicity) OU (Cytotoxicity_dependent_of_the_complement) OU (C1q_binding) OU (C1q_binding) OU (complement_system) OU (Complement ET cytotoxicity et depend?nt) OU (complement_mediat+ cytotoxicity) OU (complement phr pathway) OU (complement_depend?nt_cell+ cytotoxicity) OU	56

(complement_dependence_cytotoxicity) OU (C1q) OU (Clq) OU (CDC)) ET (Fc OU antibo+ OU CH2 OU IgG OU Immunoglobulin+)	
(Fusion phr protein) et Fc	143
altered phr antibo+	43
ScFc	23
(Igg2_IGG4) OU (class_class chimaera)	
OU (dans l'outil de couplage de résultat)	113
(igg1_igg2) OU (igg1_igg3) OU (igg3_igg4) OU (igg2_igg3)	
(antibo+) ET ((knob into hole) OU (knob in hole) OU (+Into_ cavity)	
OU (dans l'outil de couplage de résultat)	118
(antibo+ ET protuberance+)	
potelligent OU glycomab OU glycoexpress OU (emabling ET lfb)	60
((multispecific OU multivalent OU bispecific) ET antibo+)	107
(roledumab) OU (R593) OU (ublitzumab) OU (MS4A1) OU (visilizumab) OU (HuM291) OU (imgatuzumab) OU (GA201) OU (RG7160) OU (MTRX1011A) OU (conbercept) OU (KH902) OU (atacept) OU (clenoliximab) OU (IDEC-151) OU (blosozumab) OU (LY2541546) OU (tabalumab) OU (crenezumab) OU (MABT5102A) OU (ecromeximab) OU (KM871) OU (otelixizumab) OU (abatacept) OU (BMS-188667) OU (belatacept) OU (galiximab) OU (IDEC-114) OU (romiplostim) OU (AMG531) OU (trebananib) OU (KM3065) OU (benralizumab) OU (KHK4563) OU BIW-8405 OU MEDI-563) OU (KM2760) OU (vedolizumab) OU (Teplizumab) OU (bimagrumab) OU (ocaratuzumab) OU (AME-133v) OU (CSL362) OU (1B20) OU (tanezumab) OU (ponezumab) OU (lirilumab) OU (DI17E6) OU (MEDI5117) OU (MGA271) OU (MGAH22) OU (Blisibimod) OU (XmAb5592) OU (clazakizumab) OU (BMS-945429)) ET ANTIBO+	217

Définition du code CPC	Nombre de nouvelles familles de brevets
Increased effector function due to an Fc-modification	71
Decreased effector function due to an Fc modification	54
Glycosylation, sialylation, fucosylation	146
ADCC	Code non pertinent portant sur des brevets d'humanisation et de chimérisation
ADCC - souris	94
CDC	89
Fc	144
CH3	23
CH2	2
Hinge	33
Constant or Fc region; isotype	22
Comprising a combination of variable region and constant region components	36
Comprising a swap of domains, e.g. CH3-CH2, VH-CL or VL-CH1	4
Antibodies with agonistic, e.g. apoptotic, activity upon their specific binding to an antigen	113
Characterized by post-translational modification	3
Stability, e.g. half-life, pH, temperature or enzyme-resistance	24
Hybrid immunoglobulines (Immunoglobulin + something else)	48

Numéro de brevet	Nombre de nouvelles familles de brevets
WO8807089	186
GB8824869	4
EP0327378	5
GB8905669	2
EP0359096	1
WO9428027	6
WO200042072	61
WO2004029207	4

*Pour la première salve de requêtes. Depuis, celles-ci ont été relancées toutes les 10 semaines afin de mettre à jour le corpus.

Toutes ces familles de brevets sont indexées dans un dossier de la base de données Orbit[®], que l'on nommera par la suite « Corpus de brevet ». Après addition de tous les brevets pertinents, nous obtenons 2648 brevets pour la première lancée de requêtes. Ce nombre est assez important

car en réalité des familles de brevets qui n'incorporaient pas vraiment des variants Fc, mais en discutaient seulement dans la description du brevet en citant des références d'articles par exemple, avaient été ajoutées. Ce corpus de 2648 familles de brevets a donc été séparé en deux :

- Un premier indexant les brevets traitant réellement d'une partie Fc d'IgG modifiée dans la charnière, le CH2 ou le CH3, et décrivant précisément ces variants moléculaires dans la description détaillée, dans les exemples et/ou les figures
- Un second indexant les brevets restants, qui citent juste des technologies de modification du Fc sans l'utiliser pour leur molécule, et donc pour lesquels nous n'avons pas d'information à indexer dans la base de données

Pour réaliser cette séparation, nous avons effectué l'analyse rapide du corpus de 2648 brevets à l'aide de l'outil de surbrillance pour localiser la partie dans laquelle sont abordées les modifications Fc, et ainsi percevoir la pertinence du brevet de ce point de vue et les possibles données à saisir dans une base de données de variants Fc.

Le corpus analysé dans la suite de cette thèse est le premier décrit ci-dessus, traitant réellement d'une partie Fc d'immunoglobuline modifiée dans la charnière, le CH2 ou le CH3, et décrivant précisément ces variants de molécules dans la description détaillée, dans les exemples et les figures. Ainsi, à ce stade, en Octobre 2013, nous avions 640 brevets. Aujourd'hui, après relance des requêtes toutes les 10 semaines, en Mars 2016, nous avons 998 familles de brevets pertinentes sur le sujet.

⑥ Focus sur IgG4

Durant la dernière année de cette thèse, un focus a été fait sur les variants dans la portion Fc des IgG4. Pour identifier les brevets pertinents, nous avons effectué une recherche dans notre corpus une nouvelle fois à l'aide de l'outil de surbrillance.

A l'aide de mots-clés identifiés dans la littérature et dans les premiers brevets et une fois les avoir rapportés dans l'outil de surbrillance (**Figure 39**), nous avons pu, après parcours de notre corpus entier, créer un « sous-corpus » de brevets traitant de variants Fc d'IgG4. Ces brevets contiennent pour la plupart également des variants d'autres sous-classes, principalement IgG1. Grâce à cette seconde recherche, nous avons pu identifier 103 brevets portant sur IgG4.

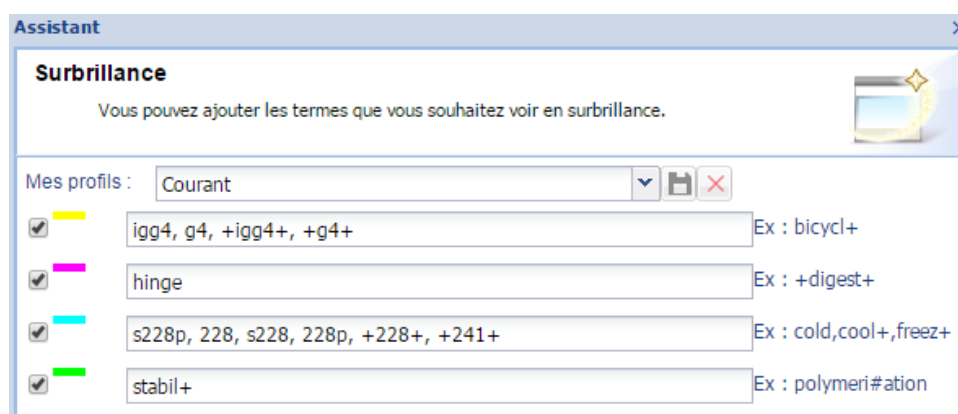


Figure 39 : Mots clés utilisés dans l'outil de surbrillance pour identifier les brevets portant sur des modifications dans la partie Fc d'IgG4

V-Analyse macroscopique du corpus de brevets

Avec ce corpus de brevet devenu pertinent, il peut ensuite être réalisé deux types d'analyses, définies précédemment comme macroscopique et microscopique.

L'étude macroscopique définit l'étude des tendances du corpus dans son ensemble. C'est-à-dire identifier les principaux déposants du corpus, les auteurs, le nombre de brevets par années de dépôts, etc...

Tout ceci peut être réalisé via un outil d'analyse d'Orbit[©] nommé « *IP Business Intelligence* » (Annexe 7), qui permet de réaliser des graphiques ou d'extraire en format Excel[©] les données liées à notre corpus de brevets.

VI-Analyse microscopique du corpus de brevets

Au contraire de l'analyse macroscopique qui étudie les tendances du corpus de brevets dans son ensemble, l'analyse microscopique analyse chacune des familles de brevets du corpus pour identifier des molécules ayant une partie Fc d'IgG modifiée.

L'analyse microscopique est réalisée en parcourant chacune des familles de brevets du corpus. Ces familles de brevets contiennent par définition plusieurs brevets, déposés dans différents offices. Ces brevets peuvent différer par leurs revendications, qui sont le contenu juridique du document brevet, mais ont le même contenu scientifique descriptif de l'invention. Les informations qui nous intéressent particulièrement s'avèrent être principalement dans la partie descriptive de l'invention, et en réalité plus précisément dans la partie « *Exemples* » (Figure 40) et dans les figures (Figure 41).

TABLE 62

Variant	SEQ ID NO	Substitution(s)	FcγRIIIa Fold	FcγRIIb Fold	FcγRIIIa-fold:FcγRIIb-fold
1	SEQ ID NO: 9	V264A	0.53		
2	SEQ ID NO: 10	V264L	0.56		
3	SEQ ID NO: 11	V264I	1.43		
4	SEQ ID NO: 12	F241W	0.29		
5	SEQ ID NO: 13	F241L	0.26		
6	SEQ ID NO: 14	F243W	0.51		
7	SEQ ID NO: 15	F243L	0.51		
8	SEQ ID NO: 16	F241L/F243L/V262I/V264I	0.09		
9	SEQ ID NO: 17	F241W/F243W	0.07		
10	SEQ ID NO: 18	F241W/F243W/V262A/V264A	0.04		
11	SEQ ID NO: 19	F241L/V262I	0.06		
12	SEQ ID NO: 20	F243L/V264I	1.23		
13	SEQ ID NO: 21	F243L/V262I/V264W	0.02		
14	SEQ ID NO: 22	F241Y/F243Y/V262T/V264T	0.05		
15	SEQ ID NO: 23	F241E/F243R/V262E/V264R	0.05		
16	SEQ ID NO: 24	F241E/F243Q/V262T/V264E	0.07		
17	SEQ ID NO: 25	F241R/F243Q/V262T/V264R	0.02		
18	SEQ ID NO: 26	F241E/F243Y/V262T/V264R	0.05		
19	SEQ ID NO: 27	I328M	0.21		
20	SEQ ID NO: 28	I328E	0.12		
21	SEQ ID NO: 29	I328F	0.24		
22	SEQ ID NO: 30	I332E	6.72	3.93	1.71
23	SEQ ID NO: 31	I328M/I332E	2.60		
24	SEQ ID NO: 32	P244H	0.83		

Figure 41 : Exemple de graphique provenant des « *Figures* » d'un brevet

Ce graphique décrit la différence de liaison de molécules de type sauvage et de variants Fc à l'allotype valine du récepteur FcγRIIIA.

Figure 40 : Exemple de tableau retrouvé dans la partie « *Exemples* » d'un brevet

Ce tableau décrit des variants ayant des substitutions d'acides aminés dans le Fc, et la liaison de ces variants au récepteur FcγRIIIA.

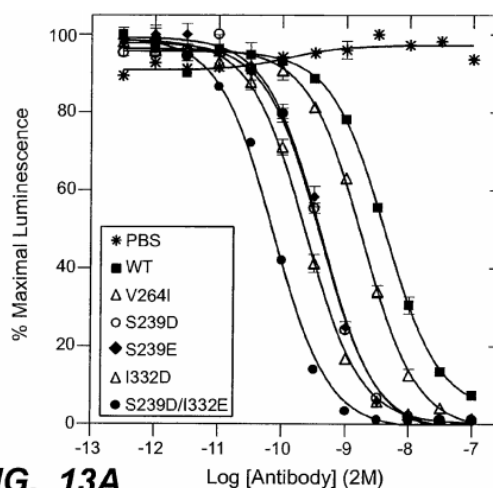


FIG. 13A

Dès le parcours du premier brevet du corpus, il fallut décider de la meilleure façon de compiler ces données que nous ressortions :

- Sur les brevets : Déposants, Auteurs, Dates (Dépôt, publication, ...)
- Sur les molécules modifiées, dits « variants » : Sous-classes, Modifications, Propriété pharmacologiques associées

Une base de données était la meilleure option, et nous avons premièrement décidé d'entreprendre la conception sur Microsoft Excel[®] de plusieurs bases de données en fonction de la sous-classe du Fc et du type de modification de la molécule entrepris (**Annexe 8**).

VII-La base de données IgVarImprove

Les bases de données développées dans Microsoft Excel (**Annexe 8**) se sont cependant rapidement montrées limitées en termes de flexibilité. En effet, dès le 44^{ème} brevet étudié, le brevet de Genentech WO200042072, nous nous sommes heurtés à plus de 200 variants pour ce seul brevet, caractérisant des problèmes de clarté et de facilité d'indexation de la base de données. De plus, le parcours des brevets nécessite la possibilité de modifier la structure de la base facilement, puisqu'au fur et à mesure nous découvrons de nouveaux moyens de modifier le Fc ou des nouvelles propriétés. Ceci était difficilement réalisable avec les bases que nous avions conçues jusque-là, rendant désormais nécessaire de passer à une base de données plus malléable et plus « professionnelle ». Pour ce faire, la première possibilité imaginée pour optimiser la saisie des variants fut de faire concevoir une base de données pertinente par un spécialiste du domaine, ayant des compétences en bioinformatique. Après identification d'une personne pertinente et de longs échanges sur nos besoins, le positionnement comme partenaire prestataire et non comme collaborateur, avec les conséquences financières que cela supposait, ont finalement mis un terme au projet. Nous avons alors décidé de procéder nous-même au développement de la base de données. Pour ce faire, le parcours de « cours » en ligne a été complété par l'intervention du Professeur Denis Maurel, de l'Université François-Rabelais de Tours, Responsable de l'équipe BdTln (Bases de données et Traitement des langues naturelles). Il nous a permis, grâce à un accès aux cours donnés à ses étudiants et à un suivi régulier de développer une base de données relationnelle utilisant le langage SQL, nommée IgVarImprove et dont la conception est décrite en détail en **Annexe 9**, ayant l'avantage d'être malléable à notre guise au fur et à mesure du parcours des brevets.

① Développement de la base de données

Pour indexer les variants Fc découverts dans les brevets, nous avons développé une base de données relationnelle utilisant le langage SQL. Ce type de base de données suit le modèle introduit par Edgar F. Codd en 1970, et est défini comme une base de données où l'information est organisée dans des tableaux à deux dimensions appelés relations ou tables⁴³⁶. Le langage SQL, pour « *Structured Query Language* », est un langage informatique normalisé servant à exploiter des bases de données relationnelles. Ce langage permet de rechercher, d'ajouter, de

modifier ou de supprimer des données dans les bases de données relationnelles et est reconnu par la plupart des systèmes de gestion de bases de données relationnelles (SGBDR).

La conception débute par une première étape de modélisation de la base de données, déterminant le contenu de la base de données et la définition des relations entre les différents concepts (**Annexe 9**). Les tables définies et les relations théoriques entre elles sont ainsi décrites, et résumées dans un schéma conceptuel.

La deuxième étape est la conception du schéma relationnel de la base de données, où sont indiquées les tables définies auparavant, les tables intermédiaires indispensables à la bonne mise en relation des tables définies, et le type de données (chiffre, date, chaîne de caractère...) utilisé pour chaque attribut dans les tables définies. Pour réaliser ce schéma relationnel nous avons utilisé MySQL Workbench[®], un logiciel de gestion et d'administration de bases de données, qui a la particularité de permettre l'exportation en SQL à partir de schéma relationnel (**Annexe 9**).

Une fois notre schéma relationnel réalisé, le code SQL généré est ensuite importé dans PhpMyAdmin (**Annexe 9**), une application web de gestion pour les systèmes de gestion de base de données SQL réalisée en PHP (Hypertext Preprocessor). Cette application est incluse dans EasyPHP, une plateforme de développement Web, permettant de faire fonctionner localement (sans se connecter à un serveur externe) des scripts PHP. EasyPHP n'est pas en soi un logiciel, mais un environnement comprenant deux serveurs (un serveur web Apache et un serveur de bases de données MySQL), un interpréteur de script (PHP), ainsi qu'une administration SQL PhpMyAdmin.

Notre base de données est ainsi créée (**Annexe 9**), et la saisie des informations contenues dans les brevets peut commencer.

② Contenu de la base de données

La base de données IgVarImprove compile les informations identifiées durant l'analyse microscopique des brevets. On retrouve ainsi des informations sur :

- Les brevets :
 - ✓ Numéro
 - ✓ Titre
 - ✓ Dates (Priorité, publication, délivrance)
 - ✓ Auteurs
 - ✓ Sociétés
 - ✓ Variants qu'ils contiennent
- Les variants :
 - ✓ Brevet dans lesquels ils apparaissent
 - ✓ Sous-classe
 - ✓ Format
 - ✓ Allotype
 - ✓ Cible
 - ✓ DCI si utilisation d'un anticorps connu
 - ✓ Modifications qu'ils contiennent
 - ✓ Glycosylé (Oui/non)
 - ✓ Type de modification (Peptidique, glycosydique, domaine)
 - ✓ Propriétés pharmacologiques du variant relatif au type sauvage
- Les modifications :
 - ✓ Peptidiques
 - Type (Ajout, retrait, substitution)
 - Acide aminé de type sauvage
 - Position de l'acide aminé
 - Nouvel acide aminé
 - Chaîne lourde (Les deux ou une seule A/B)
 - Variants contenant ces modifications
 - ✓ Glycosidiques
 - Cellule de production
 - Pourcentage de glycoforme
 - Description du glycanne
 - Traitement enzymatique (Ajout/retrait d'enzyme dans la cellule de production, traitement post-expression)
 - Enzyme en question
 - Variants contenant ces modifications
 - ✓ Domaines
 - Sous-classe du Fc original
 - Remplacement sous-classe (Charnière, CH2, CH3)
 - Remplacement par domaine d'autres espèces
 - Ajout/retrait de domaine(s)
 - Sous-classe des nouveaux domaines
 - Positions d'acides aminés de début/fin d'ajout/retrait
 - Variants contenant ces modifications

③ Développement de l'interface web de la base de de données

Cette base de données a permis une rentrée facilitée des informations décrites dans le paragraphe précédent et contenues dans les brevets, mais a également soulevé quelques problèmes en termes de recherche de ces informations, notamment quand nous voulions procéder à des analyses. Ainsi, à partir de cette base de données développée en langage SQL (Annexe 9), et qui était seulement accessible sur un poste fixe après lancement du logiciel EasyPHP, nous avons développé une interface permettant la consultation facilitée des informations présentes, et hébergé celle-ci sur un serveur extérieur, rendant sa consultation possible par des tiers. Celle-ci a été réalisée par un intervenant extérieur de la société LCProd, qui nous avait été conseillé par le Pr. Maurel.

IgVarImprove comprend donc un module de recherche plus puissant via cette interface, permettant de faire des recherches croisées entre les tables de données (Figure 42)

Variant

List Patents / List Modifications Aa / List Modifications Dom / List Modifications Gly / List Propriétés Pharmacologiques

Variant name	Form of molecule	Fc subclass before modification	Fc allotype	Target	DCI Variant	Type variant	Presence of a glycan	Actions
								Q ▼ 🔍
▼	297	Q						+ +
	IgG entière	IgG1		TAG-72		Peptidique	Oui	View
	IgG entière	IgG1		NR-LU-10		Peptidique, Glycosidique	Oui	View
	IgG entière	IgG1		EGP40	NRX451	Peptidique, Glycosidique	Oui	View
	IgG entière	IgG1		CD16		Peptidique	Oui	View
	IgG entière	IgG4			KMK917	Peptidique	Oui	View
	Protéine de fusion	IgG2		Fc gamma RIIA / Fc gamma RIIB		Peptidique	Non	View

Figure 42 : Illustration du module de recherche de données

En cherchant par exemple les variants qui ont en position 297 une glutamine (Q), ceux-ci sont obtenus dans la liste en dessous, et plus de détail sur ceux-ci est accessible en cliquant sur « View » à droite. Cette interface permet la saisie des variants, et la consultation facilitée des données par une recherche multicritères entre les tables.

VIII-Veille stratégique – Newsletter MAbWatch

① La veille stratégique (scientifique, technologique et concurrentielle)

En parallèle de ce protocole de recherche de brevets et de compilation d'informations en lien avec les modifications Fc des anticorps thérapeutiques a été réalisée une veille stratégique autour des développements et des commercialisations des anticorps thérapeutiques. La veille stratégique regroupe les techniques de recherche, de traitement, et de visualisation de l'information, afin de la redistribuer aux acteurs intéressés. Elle permet de surveiller son environnement et de se tenir ainsi au courant des faits et gestes de chacun, et d'adapter le travail des chercheurs en conséquence.

Cette veille consiste essentiellement en une veille scientifique classique sur PubMed, renforcée par une surveillance de l'actualité de l'industrie pharmaceutique en lien avec les anticorps thérapeutiques. Cette surveillance a donné lieu à la rédaction d'une newsletter hebdomadaire envoyée aux chercheurs du LabEx MAbImprove et dénommée MAbWatch, permettant d'appréhender ces informations et de les utiliser dans leurs travaux de recherche quotidiens.

② MAbWatch

MAbWatch est une newsletter envoyée à un rythme hebdomadaire aux chercheurs du LabEx MAbImprove. Cent numéros ont été édités entre juillet 2014 et septembre 2016, compilant des informations en rapport avec l'actualité des anticorps thérapeutiques.

Elle est composée de huit rubriques :

- Essais cliniques
- Vie des produits
- Accords et collaborations entre acteurs du domaine
- Informations sur les biosimilaires
- Revues ou articles intéressants
- Autres types d'informations
- Appels d'offres d'intérêts, bourses
- Congrès à venir

Ces informations sont identifiées à partir de différents types de sources :

- Communiqués de presse des sociétés pharmaceutiques (Abbvie, Amgen, AstraZeneca, BMS, Lilly, Genentech, GSK, Merck, Pfizer, Roche, Sanofi...)

- Sites d'informations anglophones ou francophones (FierceBiotech, FiercePharma, MyPharma Editions, Reuters, Business Wire, BioPortfolio...)

Pour surveiller efficacement ces sources d'information pertinentes nous avons utilisé les flux RSS quand la fonction était disponible. Dans le cas contraire, nous en avons créé grâce au site internet *Feedity*. Un flux RSS, pour *Really Simple Syndication*, est un moyen efficace pour être tenu informé du nouveau contenu d'un site web sans avoir à le consulter. La disponibilité de ce genre de flux sur un site internet est indiquée par un sigle orange (**Figure 43**) ou par la mention RSS. Classiquement, en cliquant sur ce sigle, un lien internet nous est proposé pour « suivre » les actualités du site.

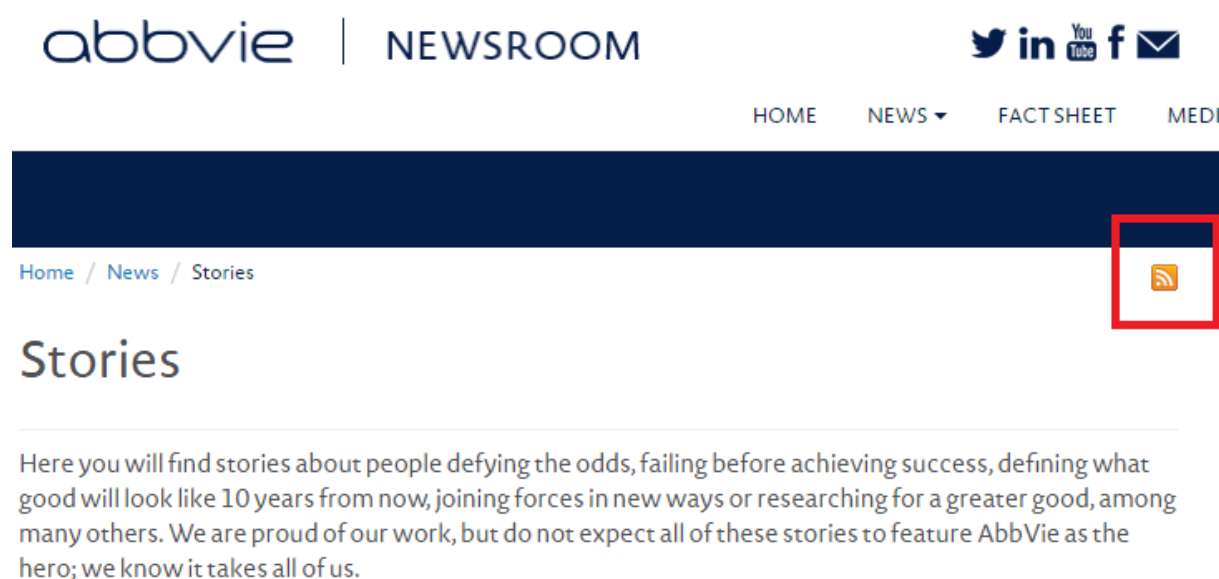


Figure 43 : Exemple de page proposant un flux RSS, ici provenant du site de la société Abbvie

Ce lien pourra être utilisé dans un « Agrégateur de flux RSS », permettant de regrouper tous les flux intéressants. Pour compiler nos flux, nous avons utilisé RSSOwl, un agrégateur gratuit téléchargeable qui permet d'indexer tous les flux que nous avons pu identifier, de les regrouper en sous-groupes, et même d'identifier les nouvelles où certains mots-clés préalablement définis apparaissent (**Figure 44**). Nous avons ainsi identifié 143 sources d'informations, et défini des mots-clés ou des particules à mettre en surbrillance (antibodies, -mab, anticorps, biomédicament, biosimilar, -cept...) pour faciliter la collecte des nouvelles.

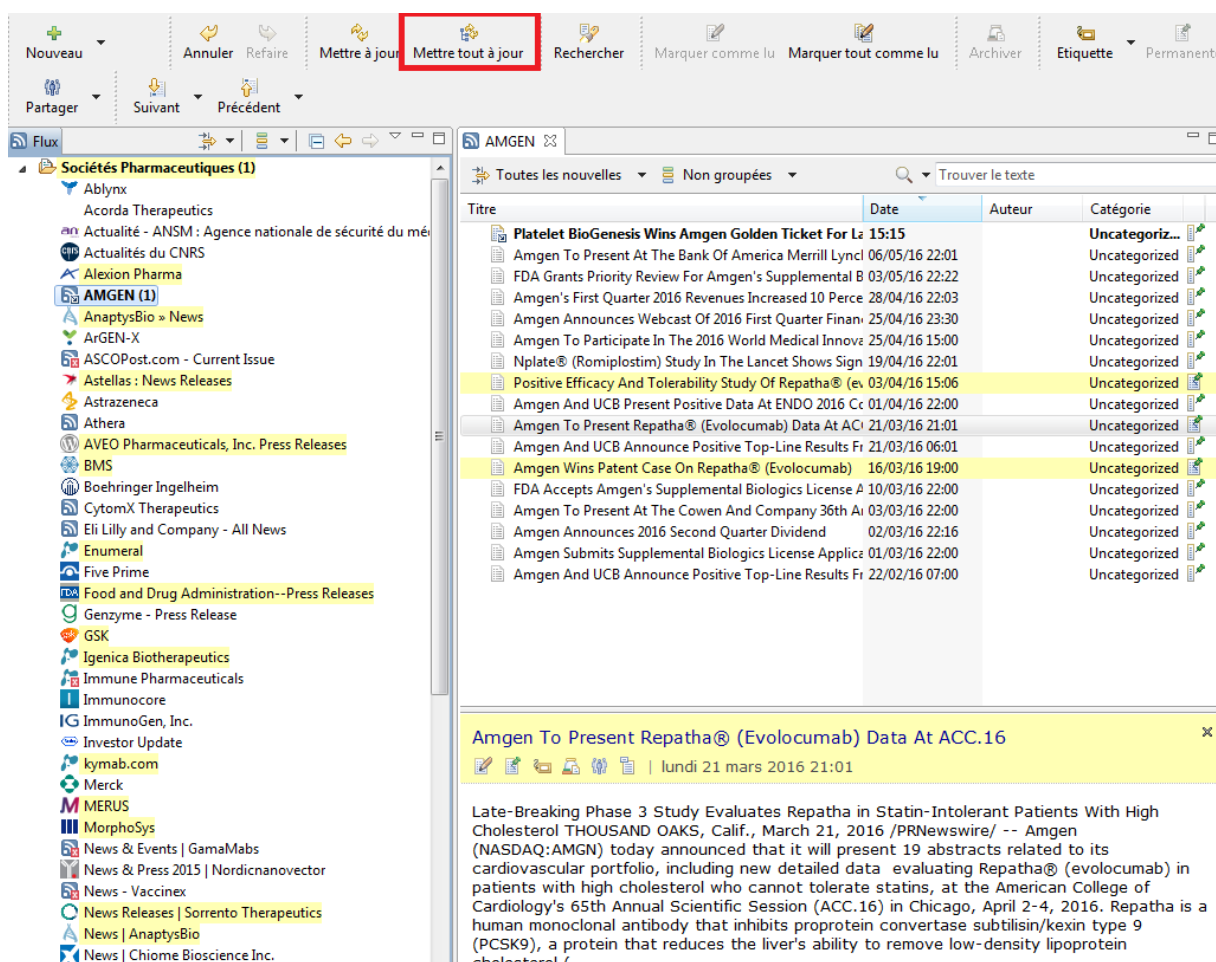


Figure 44 : Présentation de RSS Owl

Les flux RSS liés aux sources sont situés sur la gauche. Il suffit de cliquer sur ceux-ci pour obtenir dans le panel de droite les nouvelles du jour, qui sont en gras. En cliquant sur une nouvelle, un aperçu est obtenu dans le cadre en bas à droite. Les nouvelles en jaunes sont celles contenant des mots clés. Les nouvelles du jour sont obtenues en cliquant sur « Mettre à jour », ici encadré en rouge.

RSS Owl permet en effet d'optimiser le parcours des nouvelles et l'identification de celles concernant les anticorps thérapeutiques. Ces nouvelles, une fois identifiées, sont indexées dans un outil disponible dans le portail collaboratif mis à disposition pour le LabEx MABImprove par l'INRA, Silverpeas, qui permet de mettre en forme la Newsletter (Figure 45).

Chaque vendredi, une fois rédigée et corrigée, MABWatch est envoyée via une liste de diffusion à tous les membres des équipes du LabEx MABImprove, leur permettant d'obtenir les informations importantes auxquelles ils n'auraient pas accès en réalisant juste une bibliographie classique. Ces informations se sont également avérées très utiles dans l'analyse et l'interprétation des données obtenues dans le cadre de cette thèse, et ont permis d'avoir une culture et une vision globale de ce milieu.

Plusieurs numéros sont disponibles en Annexe 10.

Figure 45 : Présentation de l'outil de rédaction de newsletter de Silverpeas



Cet outil de conception de Newsletter permet de mettre en forme les phrases d'accroche des nouvelles qui seront disponibles dans les liens en rouge juste en dessous.

Résultats

I-Analyse globale du corpus de brevets

① Résultats

Durant les deux premières années de cette thèse, le travail a été orienté sur l'analyse des modifications dans la portion Fc de toutes les sous-classes d'IgG. En mars 2016, après une relance toutes les dix semaines des requêtes et quelques retraits de brevets qui n'étaient pas pertinents, ce corpus entier était composé de 998 brevets. Ceux-ci montrent une répartition croissante de leur nombre au fil du temps depuis 1988 (Figure 46), avec une forte augmentation à partir de 2002, suivie d'une très forte augmentation en 2014 et 2015, durant ma thèse.

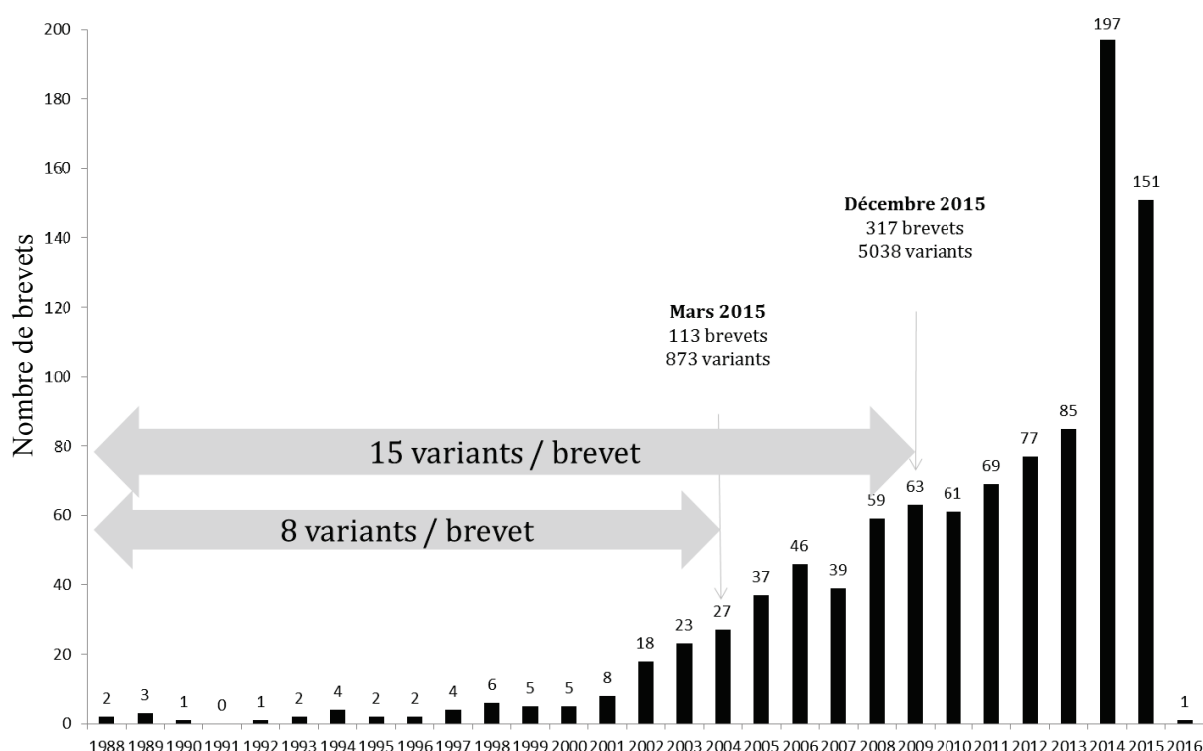


Figure 46: Nombre de brevets traitant de variants Fc d'IgG publiés par an, quelle que soit la sous-classe d'IgG, et moyenne du nombre de variants par période

Les flèches grises indiquent le nombre moyen de variants par brevets pour la période indiquée. Ce graphique montrant les brevets publiés, il est normal d'avoir peu de brevets en 2016.

L'analyse microscopique de ce corpus de brevets a été réalisée jusqu'en décembre 2015, où nous avons analysé les 317 premiers brevets. Durant l'analyse de ces brevets, nous avons également été confrontés à une forte augmentation du nombre de variants par brevet au cours du temps. En effet, si la moyenne de variants était de 8 environ pour les brevets allant jusqu'en 2004, après analyse des 204 brevets suivants (jusqu'en 2009), cette moyenne est passée à 15, soit 5038 variants pour 317 brevets (Figure 46). Il est de ce fait impossible aujourd'hui de prédire

le nombre total de variants qui seront recensés à l’issue de l’analyse complète du corpus de brevets.

De nombreuses sociétés pharmaceutiques sont propriétaires des 998 brevets de notre corpus (**Figure 47**). Dans le top 10 de celles-ci, Roche se détache largement, avec 192 brevets, parmi lesquels on compte également les brevets de ses filiales Genentech, Chugai et Glycart. Le second acteur majeur est Xencor, qui compte 104 brevets. Ces deux acteurs sont suivis de façon plus lointaine par d’autres sociétés comme Medimmune, Biogen ou encore Macrogenics, ayant entre 19 et 33 brevets (**Figure 47**).

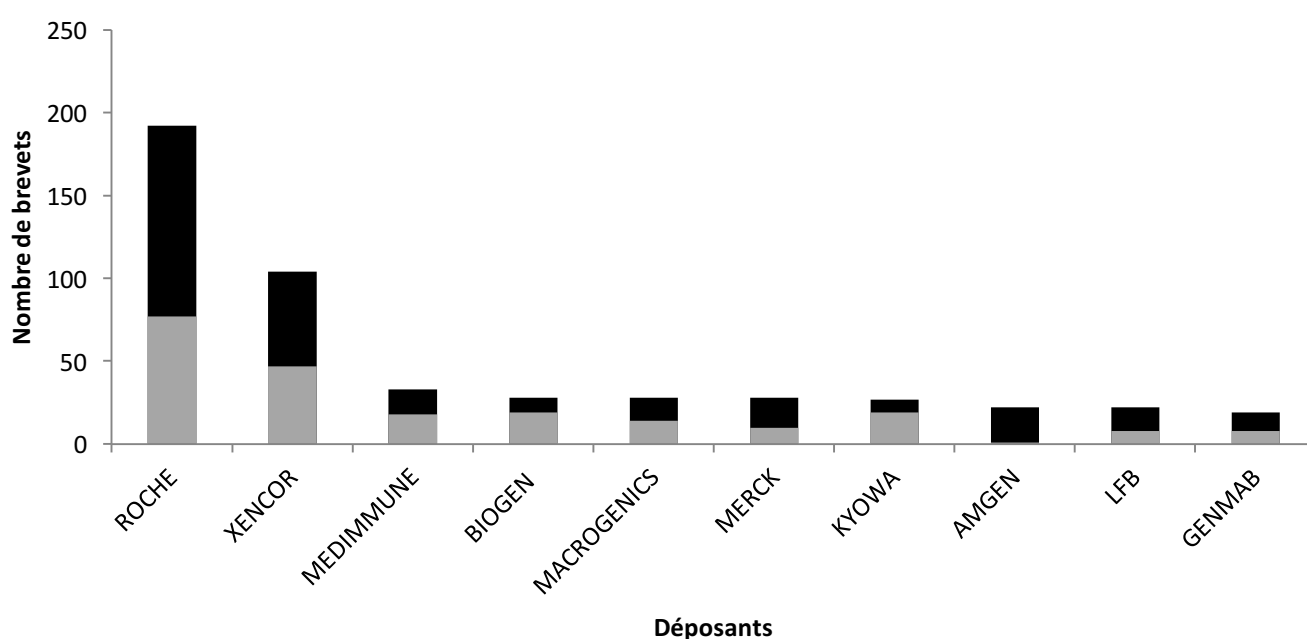


Figure 47 : Top 10 des plus gros déposants dans le corpus, avec la part de brevets analysés aujourd’hui
Le nombre de brevets total est représenté en noir, et la part analysée est en gris.

Les 317 brevets que nous avons analysés montrent sensiblement la même répartition que le corpus entier. En effet, Roche et Xencor dominent avec respectivement 77 et 47 brevets, et sont suivis par les autres acteurs de ce top 10 d’assez loin, qui ont entre 8 et 19 brevets (**Figure 47**) et par Amgen qui a seulement 3 brevets. Ce classement change quelque peu quand on regarde cette fois la répartition des 5038 variants contenus dans ces 317 premiers brevets analysés (**Figure 48**). Xencor est très largement devant tous les autres acteurs avec 2340 variants. Roche suit d’assez loin avec 454 variants, et Medimmune, Biogen et Kyowa oscillent entre 100 et 200, suivit finalement par Merck, Amgen, Genmab et le LFB, qui ont entre 3 et 37 variants.

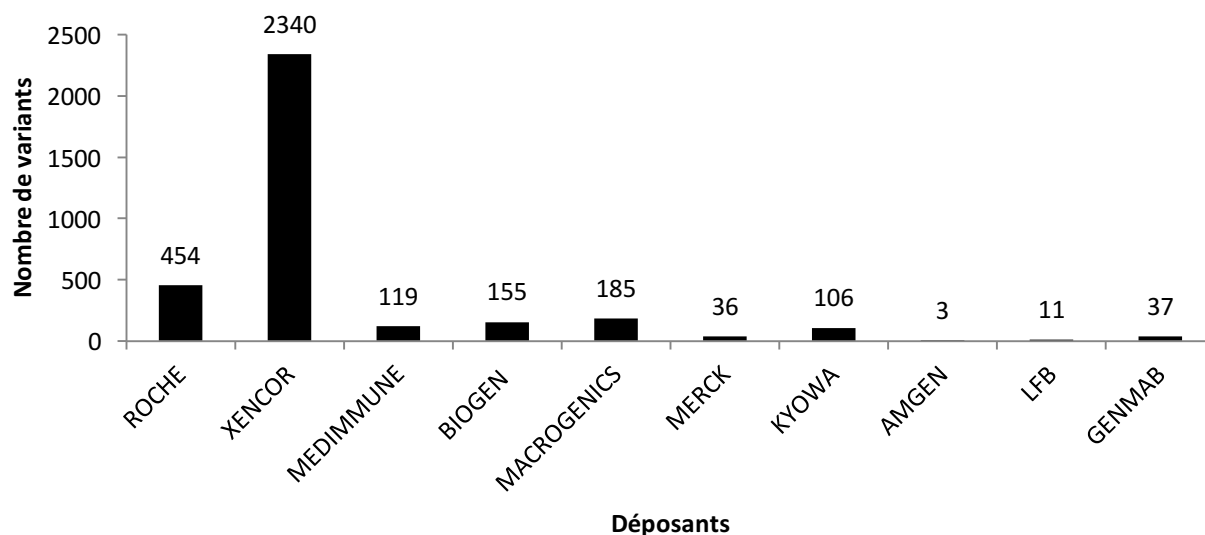


Figure 48 : Nombre de variants recensés dans les brevets analysés provenant du Top 10 des déposants

Ces variants ont ainsi été indexés dans la base de données IgVarImprove. La majeure partie d'entre eux sont des variants peptidiques (4674, soit 92 %). Parmi ceux-ci, 4434 (soit 94 %) sont des variants peptidiques d'IgG1, montrant l'importance de ce type de modification. En effet, sur tous les variants saisis à cette période, 88 % étaient des variants peptidiques d'IgG1 (Figure 49).

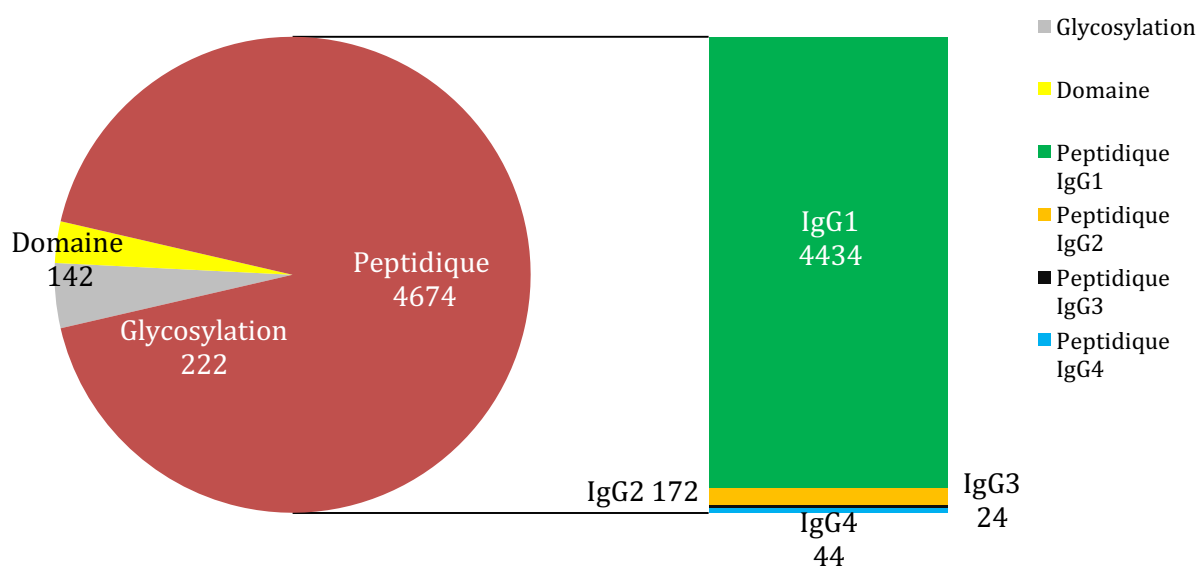


Figure 49 : Nombre de variants par type de modification

Ces 5038 variants, majoritairement d'IgG1, sont essentiellement décrits pour moduler les propriétés effectrices (Figure 50). On trouve également une part non négligeable de variants testant les propriétés de demi-vie, mais très peu concernant sa stabilité (Figure 50).

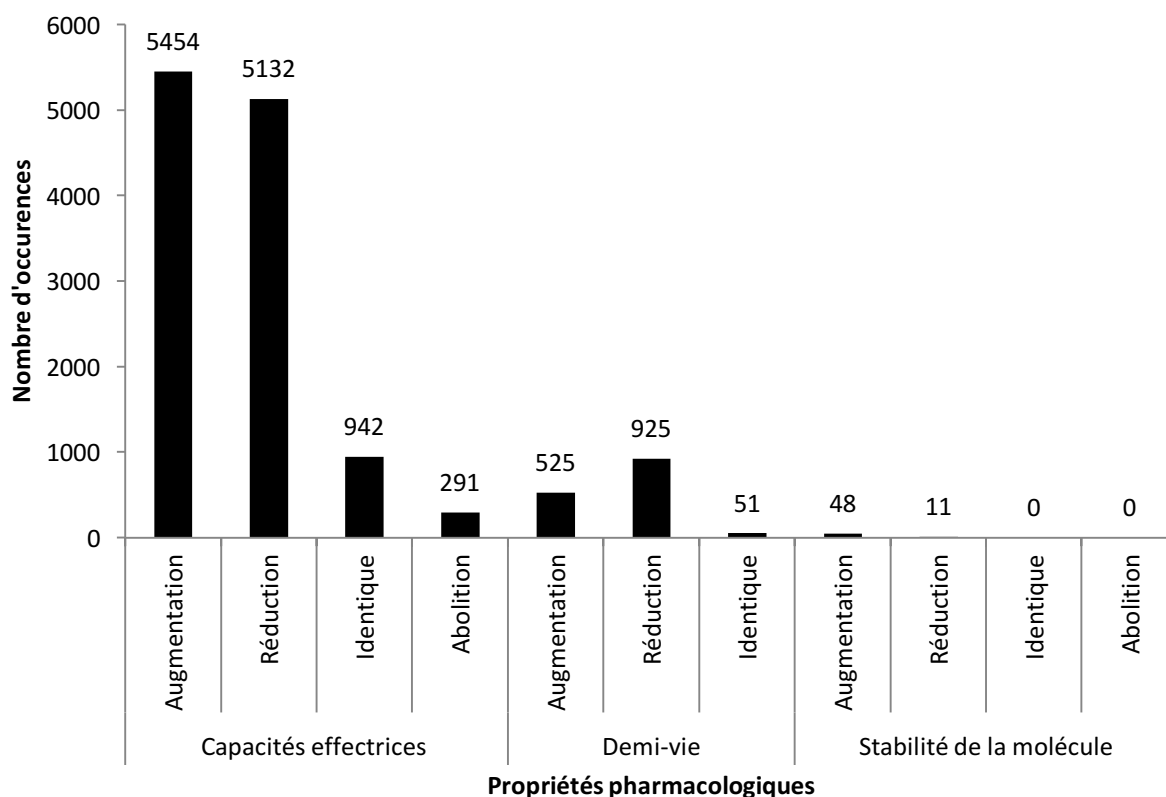


Figure 50 : Occurrence d'étude de propriétés pharmacologiques

Une unité est comptée à chaque fois qu'une propriété est étudiée pour un variant, qui peut lui-même être étudié pour plusieurs propriétés pharmacologiques. Les données portant sur les capacités effectrices recensent la liaison aux récepteurs Fcγ, au C1q, et les activités ADCC, de CDC et de phagocytose. Celles portant sur la demi-vie recensent les données de liaison au FcRn et la demi-vie. Pour la stabilité, sont prises en compte les données de résistance à la dégradation enzymatique, de dégradation thermique, et de stabilité générale de la molécule.

La majorité étant des variants peptidiques d'IgG1, la répartition de ceux-ci a été étudiée sur la région charnière (

Figure 51) et les domaines CH2 (Figure 52) et CH3 (Figure 53).

Au niveau de la charnière, le nombre de variants oscille entre 5, pour la position 219 et 34 pour les positions 220 et 229, avec un total de 294 modifications. De manière plus globale, on remarque un plus faible nombre de variants pour les quatre premiers acides aminés de cette région. Puis, le nombre de variants est supérieur, principalement au niveau des trois ponts disulfures (220, 226, 229) et à la position 224 (

Figure 51).

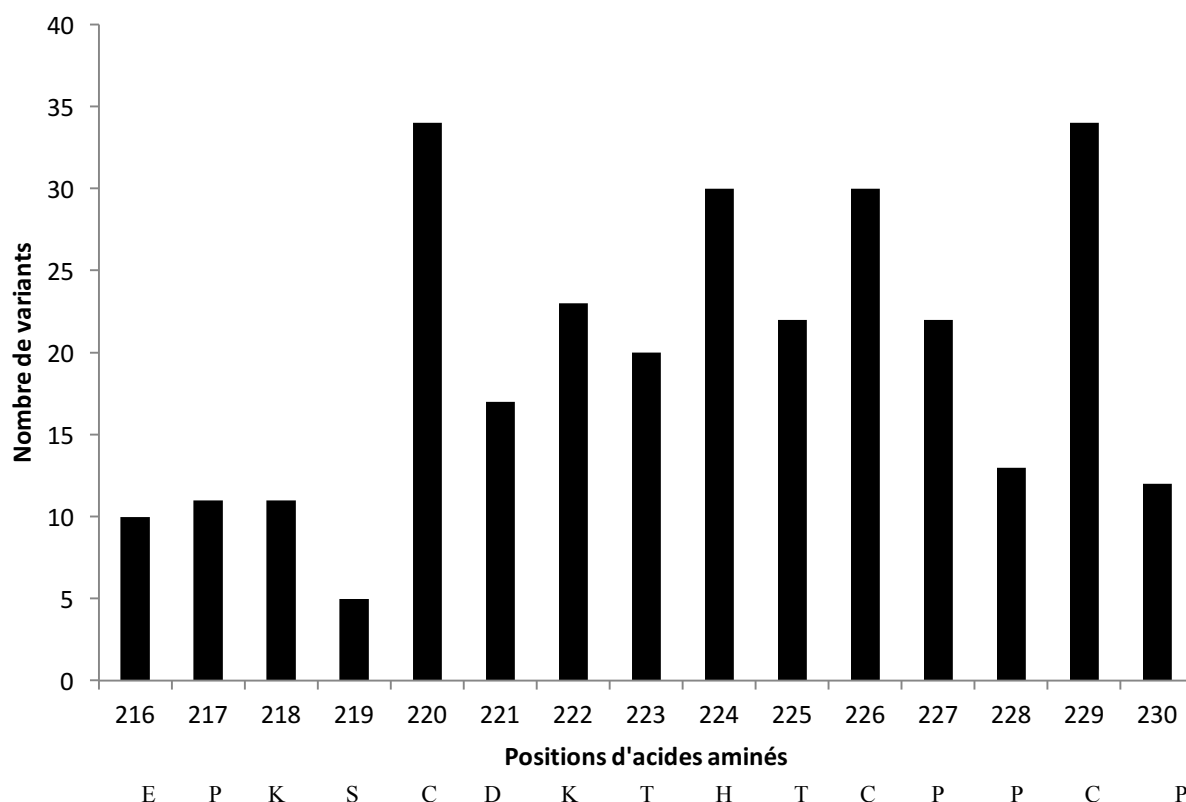


Figure 51 : Nombre de variants par position d'acides aminés dans la charnière d'IgG1

Le domaine CH2 a été modifié en quasi intégralité puisqu'il n'y a qu'à la position 321 qu'on ne trouve aucune modification. La position la plus modifiée est la 332, qui compte 521 occurrences, et le nombre total de modification pour ce domaine est de 5677 (**Figure 52A**). Les hotspots de modifications, bien que dispersés sur la séquence (**Figure 52A**), sont en réalité localisés aux deux pôles géographiques de ce domaine (**Figure 52B**). Au pôle supérieur, proche de la charnière, sont retrouvées les positions 234, 235, 236, 237, 239, 267, 268, 297, 328, 330, 332, et 334. Au pôle inférieur, proche du CH3, sont retrouvées les positions 247 et 254 (**Figure 52B**).

Seulement quatre positions ne sont pas modifiées dans le domaine CH3. On compte dans ce domaine beaucoup moins de modifications que dans le CH2, avec un total de 1989 occurrences, la position 396 étant la plus modifiée (**Figure 53A**). Les hotspots de modifications, bien qu'encore une fois dispersés sur la séquence primaire, se retrouvent comme pour le CH2 principalement au pôle géographique supérieur du CH3, avec les positions 376, 382, 385, 396,

404, 426, 428, 428, et 434. Seul l'acide aminé 354 est au cœur des CH3 et l'acide aminé 446 est au pôle géographique inférieur (Figure 53B).

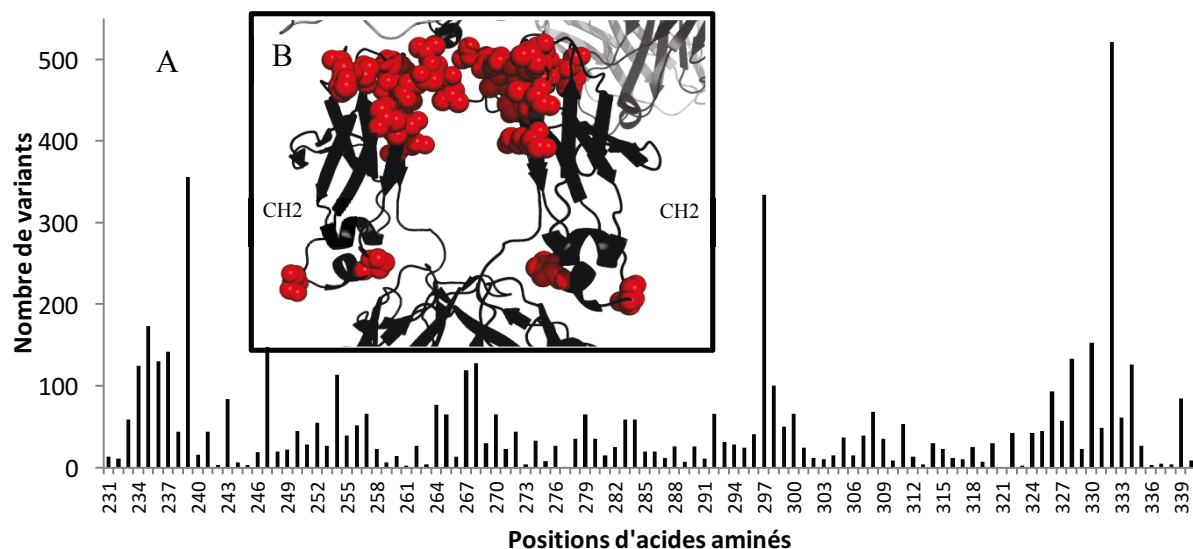


Figure 52 : Hotspots de variants par position d'acides aminés dans le CH2 d'IgG1

A : Nombre de variants par position d'acides aminés dans le CH2 d'IgG1. B : Représentation tridimensionnelle d'un CH2 d'IgG1 et des positions les plus modifiées dans notre corpus. Le Fc est représenté en noir, et les acides aminés les plus modifiés (supérieurs à 100 occurrences de variants) en rouge (234, 235, 236, 237, 239, 247, 254, 267, 268, 297, 328, 330, 332, 334). Cette figure a été réalisée en utilisant PyMOL Molecular Graphics System, version 1.7.4 (Schrödinger) à partir du fichier PDB : 1HZH⁵⁶.

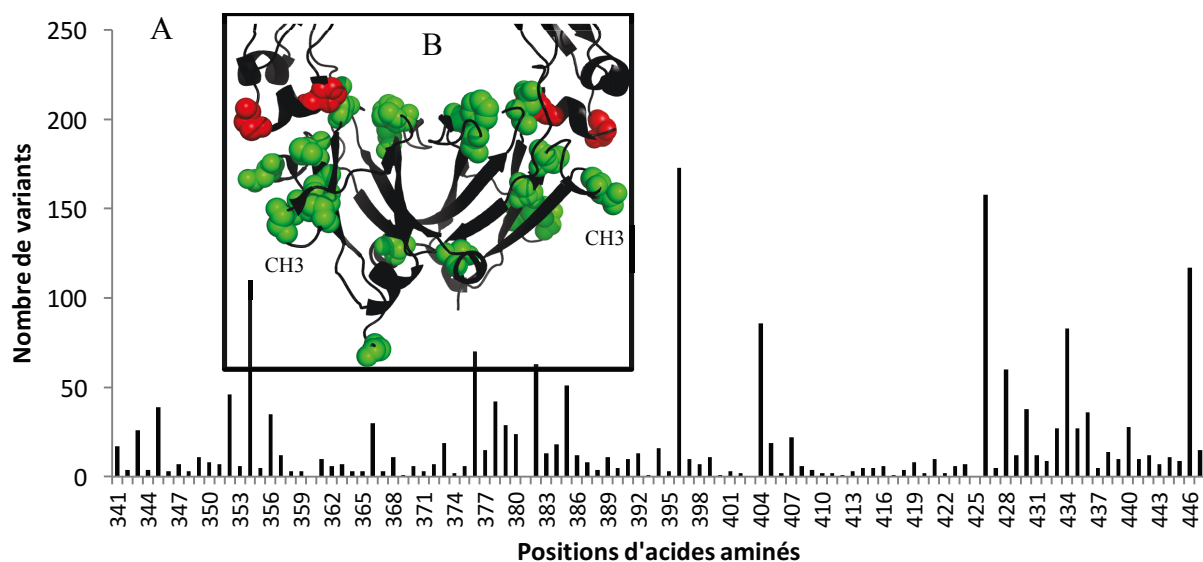


Figure 53 : Nombre de variants par position d'acides aminés dans la CH3 d'IgG1

A : Nombre de variants par position d'acides aminés dans le CH3 d'IgG1. B : Représentation tridimensionnelle d'un CH2 d'IgG1 et des positions les plus modifiées dans notre corpus. Le Fc est représenté en noir. Les positions 247 et 254, qui étaient dans les hotspots du CH2, sont indiquées en rouge, et les positions les plus modifiées dans le CH3 (supérieures à 50 occurrences de variants) sont indiquées en vert (354, 376, 382, 385, 396, 404, 426, 428, 434, et 446). Cette figure a été réalisée en utilisant PyMOL Molecular Graphics System, version 1.7.4 (Schrödinger) à partir du fichier PDB : 1HZH⁵⁶.

② Discussion de l'analyse partielle du pool

Le corpus de brevet total de 998 brevets comprend les brevets portant sur des modifications dans la portion Fc quelle que soit la sous-classe. Le nombre de brevets publié par an (**Figure 46**) montre une croissance très importante au fil des années, justifiant un intérêt majeur pour les grands groupes pharmaceutiques. En effet, l'acteur majeur de ce domaine est Roche (**Figure 47**), qui grâce à ses filiales Genentech, Chugai et Glycart s'est constitué un portefeuille de brevet portant aussi bien sur les variants peptidiques que glycosidiques. L'autre acteur majeur est Xencor, une société de biotechnologie spécialisée dans les modifications de la portion Fc. Parmi les autres acteurs majeurs, on compte d'autres sociétés de biotechnologies comme Biogen, MacroGenics ou Amgen, mais également des grands groupes pharmaceutiques comme Merck ou AstraZeneca, via sa filiale de biotechnologie Medimmune (**Figure 47**). L'analyse microscopique de ce corpus de brevets a été réalisée jusqu'en décembre 2015. Les 317 brevets les plus anciens ont ainsi été analysés, allant jusqu'en 2009. La répartition de ces brevets est similaire à celle du corpus total, puisqu'on retrouve les mêmes acteurs au top, Roche et Xencor. Les autres acteurs du top 10 montrent également une présence précoce dans le domaine des modifications dans la partie Fc des IgG, confirmant que la majorité des pionniers sont toujours les dominants du secteur. Seul Amgen n'a qu'un seul de ses vingt-deux brevets publié en 2009 (**Figure 47**), suggérant une arrivée plutôt tardive sur la thématique.

L'analyse de ces 317 premiers brevets a également montré une tendance à l'augmentation du nombre de variants par brevet (**Figure 46**). En effet, en mars 2015, notre analyse montrait une moyenne de 8 variants pour les 113 premiers brevets, alors que 204 brevets plus tard, celle-ci passait à 15. Ceci s'explique par le contenu des brevets. Dans les 113 premiers brevets, allant jusqu'en 2004, peu de brevets décrivent un grand nombre de variants peptidiques. On en trouve en réalité deux, le brevet WO200042072 de Genentech décrivant 237 variants, et le brevet WO2004029207 de Xencor, qui en décrit 217. Après ces deux brevets, le nombre de brevets contenant plus de 100 variants s'est fortement accru, passant à 10, dont 7 sont des brevets de Xencor, allant jusqu'à 635 variants. Ce nombre important de variants présents dans les brevets de Xencor en fait la société ayant le plus de variants recensés dans IgVarImprove (**Figure 48**), avec 2340 variants sur les 5038 indexés, très loin devant les 454 variants de Roche. Ceci est dû à la méthode employée par Xencor, qui est de cribler le Fc en réalisant un très grand nombre de substitutions d'acides aminés, pour tester la liaison aux différents récepteurs Fc et au C1q. Les nombreux variants peptidiques décrits par cette société participent à faire de ce type de modification la plus présente dans notre base de données, constituant 92 % des variants (**Figure**

49). Parmi ces variants peptidiques, 94 % sont des IgG1 (**Figure 49**), qui est la sous-classe la plus utilisée en raison de ses fonctions effectrices et de sa demi-vie. Ces deux propriétés sont d'ailleurs les plus étudiées (**Figure 50**) pour caractériser l'effet des modifications, traduisant l'intérêt premier des sociétés pharmaceutiques de moduler ces propriétés pour les augmenter, quand un effet cytotoxique accru ou une plus longue demi-vie sont nécessaires, ou de les diminuer, quand l'effet thérapeutique ne nécessite pas l'engagement des effecteurs de l'immunité ou quand l'anticorps doit être éliminé rapidement par l'organisme (**Figure 50**). Ceci se traduit par des mutations principalement au niveau des sites d'interaction du Fc avec les récepteurs Fc γ et le C1q (**Figure 52**), au niveau supérieur du CH2, proche de la charnière, et au niveau du site d'interaction avec le FcRn, à l'interface entre le CH2 (**Figure 52**) et le CH3 (**Figure 53**).

Il est important de considérer cette analyse avec prudence, car les données portent sur une étude très partielle du corpus. Ces données nous permettront cependant une comparaison avec les variants d'IgG4, qui ont pu être analysés de façon complète. Cette comparaison sera effectuée dans la partie Discussion de la thèse.

II-Article 1: Modifications in the IgG4 Fc portion of therapeutics in patents: opportunities for a twisting IgG subclass

Notre intérêt pour la sous-classe IgG4 date de la fin de l'année 2015. C'est à cette période que nous avons identifié l'importance prise par les modifications de la partie Fc dans cette sous-classe. En effet, à l'époque, 5 des 6 molécules commercialisées (aujourd'hui 6 des 8) à Fc d'IgG4 portaient des modifications peptidiques. Cet intérêt fut renforcé par la parution peu après d'un article rendant accessible la première structure cristallisée d'une IgG4 entière⁸⁰, le pembrolizumab, l'un des trois variants Fc d'IgG4 très récemment approuvés. Ces raisons nous poussèrent à étudier les variants Fc de cette sous-classe contenus dans les brevets de notre corpus. Nous avons donc parcouru les brevets à l'aide de l'outil de surbrillance et de mots-clés que nous avons identifiés comme caractéristiques de la sous-classe IgG4. Ceci nous a permis d'identifier 103 brevets décrivant des variants d'IgG4. Une trentaine de ces brevets avaient été analysés au préalable durant l'analyse des 317 premiers brevets, et avaient déjà permis d'indexer 44 variants peptidiques d'IgG4 et plusieurs dizaines de variants de domaines provenant d'IgG4 ou incorporant des portions d'IgG4 dans d'autres sous-classes. En effet, dans notre analyse et dans l'article qui suit, les variants (quel qu'en soit le type, peptidique, de domaine ou glycosydique) de la sous-classe IgG4 ainsi que les variants de domaines incorporant des domaines (CH2-CH3) ou région (charnière) d'IgG4 sont pris en compte. Nous avons donc complété le travail en analysant les brevets restants (les plus récents) nous permettant d'indexer 493 variants supplémentaire d'IgG4, portant au final le nombre de variants IgG4 étudiés à 537. Une faible proportion des 103 brevets identifiés portaient en fait spécifiquement sur des variants de la portion Fc des IgG4. Les « brevets IgG4 » contenaient également plus de 700 variants d'autres sous-classes, qui ont été également indexés mais qui ne sont pas discutés dans l'article qui suit. La répartition de ces 537 variants en fonction des déposants ne correspond pas à la répartition en fonction du nombre de brevets. En effet, si Genmab et UCB restent les sociétés ayant décrit le plus grand nombre de variants IgG4, ce n'est pas le cas pour Roche qui a seulement 11 variants. Au contraire, Biogen et Medimmune qui n'ont que 3 brevets décrivent respectivement 74 et 90 variants (**Figure 54**).

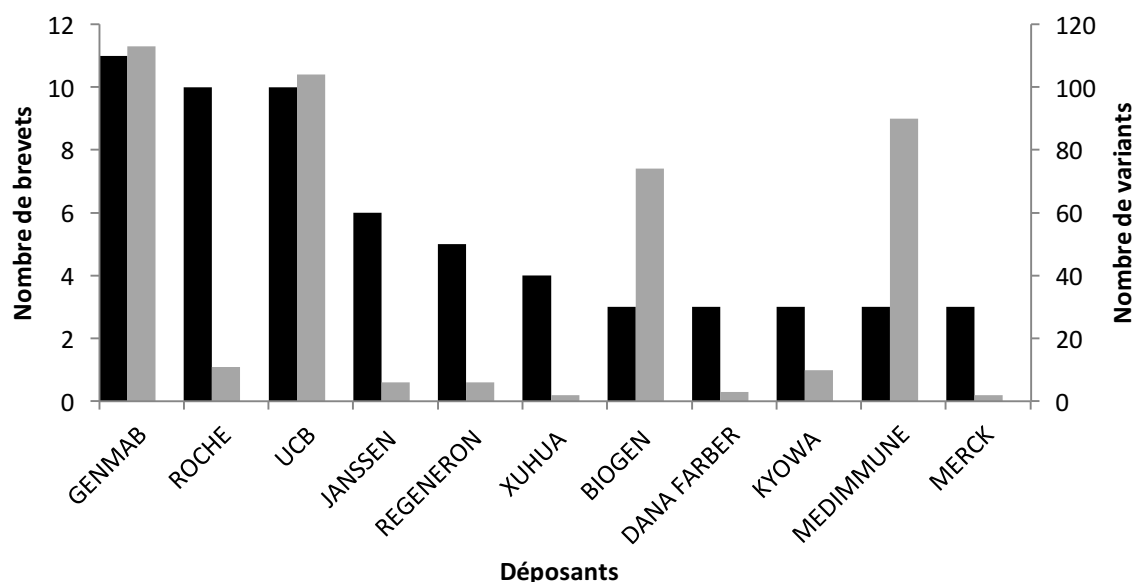


Figure 54 : Répartition du nombre de brevets et de variants par société
Le nombre de brevets est indiqué en noir, et le nombre de variants en gris.

L'analyse détaillée de ces variants est réalisée dans l'article qui suit, montrant l'importante place prise par le Fc dans la conception des anticorps que l'on peut rattacher à la sous-classe IgG4. Ces modifications s'orientent majoritairement sur le retrait des faibles fonctions effectrices des IgG4 en jouant sur les sites de liaisons aux récepteurs Fcγ dans le CH2, et sur la stabilisation de cette immunoglobuline via des mutations dans la charnière et le CH3. Les principaux brevets protégeant des technologies sont maintenant expirés, et laissent ainsi une liberté d'utilisation aux autres sociétés. Ainsi, les brevets les plus récents ne portent plus sur ces deux aspects de l'IgG4, mais davantage sur l'exploitation des propriétés de cette sous-classe pour le développement d'anticorps bispécifiques ou de fragments d'anticorps.

Modifications in the IgG4 Fc portion of therapeutics in patents: opportunities for a twisting IgG subclass

Jérémy Pottier^{1,2}, Valérie Gouilleux-Gruart^{1,2,3}, Hervé Watier^{1,2,3,*}

¹Université François-Rabelais, Tours, France ²CNRS, UMR 7292, team "Antibodies, Fc receptors and clinical responses" ³CHRU de Tours, France.

*Corresponding author : watier@med.univ-tours.fr

ABSTRACT

Despite being the least abundant immunoglobulin G in human plasma, IgG4 are therapeutically used for their weak effector functions. The increase of engineered IgG4-based antibodies on the market and the solving of the pembrolizumab structure led us to study the patent landscape of IgG4 Fc engineering, *i.e.* patents describing modifications in the hinge, CH2 and/or CH3 domains of the γ 4 heavy chain. One hundred and three relevant patent families were identified, comprising 537 IgG4 Fc variants. Different technologies were first developed to remove residual effector functions, since IgG4 bind to Fc γ RI and weakly to other Fc γ R. However, most patents actually address IgG4 stabilization or destabilization, in relation to the hemi-IgG4 interchange phenomenon characterizing this subclass. Key initial patents concerning stability or abrogation of effector function expired a few years ago, giving a freedom-to-operate, which explain the increase of approvals of IgG4 Fc-based engineered biopharmaceuticals. New developments are now envisioned to further exploit IgG4 properties, notably through bispecific or monomeric antibodies inspired from its instability. IgG4 finally appears as a twirling subclass, swapping its dance partners and rotating its CH2 like in twist. This unexpected property revealed in the pembrolizumab structure is indeed a plot twist, needing to revisit what has been described until now.

INTRODUCTION

Despite its numbering attributed to the fact that this IgG subclass is the least abundant in human plasma¹, IgG4-based therapeutics constitute the second most often used subclass, behind IgG1. There is indeed a current craze for this subclass, with the approval of five products in the last two years (in grey in Table 1), comprising very recently ixekizumab/Taltz®, an anti-IL-17 IgG4 for treating psoriasis, and reslizumab/Cinqair®, an anti-IL-5 IgG4 for treating asthma. Among the 57 approved biopharmaceuticals containing an IgG Fc portion (50 entire monoclonal antibodies and 7 fusion proteins), most (46; 81%) are based on IgG1, and 8 (14%) are based on IgG4, historically relying on a desire to avoid target cell killing and immune activation², while maintaining a plasmatic half-life as long as that of IgG1.

Indeed, for a long time, IgG4 were known to be unable to bind to cellular Fc receptors in tissues and to induce antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), and it was the worst subclass at promoting complement-induced target cell lysis³⁻⁸. A direct comparison of IgG4 and IgG1 in humans has been made in the clinic with Campath, whose human IgG4 and IgG1 versions were tested⁹. Surprisingly, Campath-G4 was found to deplete target cells in most patients, but to a lesser extent than Campath-G1^{9,10}. Pharmacological differences between subclasses actually result from structural differences between the γ 1 and γ 4 heavy chains. Since the first partial description of the IgG4 primary structure¹¹, 45 years have been necessary to elucidate its three dimensional structure¹², which has been used herein to highlight the 27 amino-acid differences between γ 4 and γ 1 heavy chains (Figure 1A). It is more than clear that the major part of the differences affects the hinge and residues in the CH1 and CH2 domains that surround the hinge. This region is also the theater of a particular property revealed by the crystal structure of pembrolizumab: one of the CH2 shows a 120° rotation, exposing the N-glycan to the external side (Figure 1A). The authors convincingly argue that it is not a crystallization artifact, but relates to the spatial constraints imposed by the shorter IgG4 hinge region (Figure 1B), which is already known to limit the flexibility of the molecule^{13,14}. Therefore, even if most amino-acids and sugar residues are conserved in IgG4 compared to IgG1, the CH2 rotation modifies their spatial position, which should considerably affect on Fc γ receptor (Fc γ R)¹⁵ and C1q¹⁶ binding. IgG4 were initially thought to bind to Fc γ RI only¹⁷, but they also bind to Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIC, and Fc γ RIIIA, especially the V158 allotype^{18,19}, although less than IgG1¹⁹. Indeed, the use of IgG4 does not guarantee absence of immune activation, since cross-linking by Fc γ RIIB was critical for the “cytokine storm”²⁰ observed in volunteers during the tragic TGN1412 (anti-CD28 IgG4) phase I trial.

No amino-acid difference between γ 1 and γ 4 is present in the FcRn binding site²¹, in accordance with the similar binding of both subclasses to FcRn²¹. However, the FcRn binding site includes CH2 residues that are rotated in the pembrolizumab structure, T250, M252 and S254 (Eu numbering²², which will be used in the article), appearing as more solvent exposed than in the “normal” conformation, in contrary to T307 and H310 (Figure 2).

Other $\gamma 1/\gamma 4$ differences are located at the opposite side of the Fc, in the heart of the CH3 and at its C-terminal side (Figure 1A). This domain is now known to be important for a particular and surprising property of IgG4, which is to split itself into two half-molecules (Figure 3)²³. This phenomenon was precisely described in 1993²⁴⁻²⁶, explaining the previously observed inability of IgG4 antibodies to bridge two antigens and to form immune complexes^{27,28}. It was initially attributed to the $\gamma 4$ hinge region only, and particularly to the two inter-heavy chain disulfide bridges, which show a dissociation tendency²⁴⁻²⁶ and can re-associate in intra-chain disulfide bridges²⁹. During the same period, it was shown that not only the hinge region but also the CH3 domain contribute to the phenomenon²³, and particularly the residues that are different between $\gamma 4$ and $\gamma 1$. Because the hemi-IgG4 interchange phenomenon can occur *in vivo*, both in mice²³ and humans³⁰, IgG4 are not only possibly monovalent, but also naturally bispecific³¹. For this reason, this phenomenon was erroneously referred to as “Fab-arm exchange”³². The physiological significance of the hemi-IgG4 interchange phenomenon still remains elusive³³ and does not seem to cause any problem when administered, since natalizumab is a wild-type approved IgG4 monoclonal antibody, known to form hemi-IgG4 interchange with endogenous IgG4³⁰.

Very interestingly, six of the approved IgG4-based therapeutics (75%) are modified in their Fc portion, while only six IgG1-based therapeutics harbor Fc modifications (13%; mogamulizumab, obinutuzumab, abatacept, belatacept, vedolizumab, and aflibercept). Moreover, most of the IgG4 currently in phase III bear Fc modifications, conferring to IgG4 the champion status of therapeutic IgG and Fc fusion proteins engineered in their constant regions. The increase of engineered IgG4 Fc-based products arriving on the market, and the fact that the structure of pembrolizumab, has been recently solved by crystallography (Figure 1)¹², led us to study the patent landscape in this field, in order to identify the main technologies and actors, and to understand the recent increase of approvals of mutated-IgG4 Fc-based biopharmaceuticals. The scientific content of patents, especially the described variants, has been more precisely studied and compared to bibliographic data and to a survey of antibodies in development, in order to determine the current trends in the use of IgG4 Fc variants.

PATENT AND VARIANT ANALYSIS

Description of patent pool and of the variant database

A pool of patent families integrating the structural and functional description of IgG4 Fc modifications was established by using relevant keywords, CPC codes or citing patents in the Orbit[®] patent database, (Questel, France)³⁴. The example sections of the patents were carefully examined to inventory the Fc variants and to compile them in a database, called

IgVarImprove³⁴. The variants were divided into “amino-acid modification” (replacement, addition or deletion of one or several amino-acids), “glycosylation modification” (modification of the asparagine 297-linked *N*-glycan by changing the glycosylation machinery of the producing cells or by acting post-translationally) and “domain modification” (replacement, addition or deletion of an entire domain/region). IgG and Fc fusion proteins integrating at least one portion of IgG4-Fc (hinge, and/or CH2 and/or CH3) were included in the analysis, given that variants can harbor several types of modifications. Chemical modifications such as conjugation of polyethylene glycol or cytotoxic drugs were excluded from the analysis.

In May 2016, the pool comprised 103 patent families dealing with IgG4 Fc modifications. Most of these patents also include IgG1 and/or IgG2 variants that are beyond the scope of this article. This patent pool includes a total of 537 IgG4 Fc-variants, most of them being amino-acid variants (391), or a combination of amino-acid and domain modifications (107). A bias toward domain modifications is due to the fact that Genmab has described many amino-acid variants in hingeless IgG4. Other types of variants include domain modifications (5), domain and glycosylation (2), glycosylation only (1), amino-acid and glycosylation (5), and subclasses variants including IgG4 domains (26).

Patent repartition over years and legal status

These patent families are spread out from 1989 to 2015, with a global increase in patent filing (Figure 4). Between 1989 and 2007, only 25 patents were filed (25% of patents for 70% of the total time period investigated), at a rate of 1.3% per year. From 2008 to 2014, 58 patent families were filed, *i.e.* 10 patents per year, representing a nearly tenfold increase in comparison with the previous period. Finally, 2015 has to be taken alone, with 20 patent families filed this year, a doubling compared to the second phase.

These patents are distributed among many pharmaceutical companies, 3 of them having more than 6 patent families: Genmab, Roche (comprising its subsidiaries, Genentech, Glycart and Chugai) and UCB (comprising also Celltech, acquired in 2004) (Figure 4). Then Janssen has 6 patent families, Regeneron 5, Xuhua Shanghai Biology 4, and the other 3 or less. Involvement of companies greatly differs over time (Figure 4), but the phases differ from the global analysis. Between 1992 and 1995, 3 companies (Biogen, Janssen and Celltech, now UCB) and the Dana-Farber Cancer Institute filed their initial patents, followed by a lag period of several years before again filing IgG4 patents far later (Figure 4). A transition period comes between 1999 and 2004, with a few patents filed (Figure 4). During this second phase, Merck came into play in 1999, and a Chinese company, Xuhua with 4 patents during years 2001-2003; Kyowa Hakko Kirin and Biogen finally arrived in 2004. In the last phase starting in 2005, most actors are newcomers (Figure 4). Roche filed its first patent, followed by others between 2008 and 2014. Genmab arrived in 2006, and then filed other patents between 2008 and 2013. Regeneron also filed its first patents recently, two in 2013,

and the three others in 2015. Finally MedImmune filed its first patent in 2009, followed by two others in 2011 and 2015.

The legal status of the 103 patent families reflects their rather young age. Only a third are granted, lapsed, expired or revoked, while the two other thirds are pending. Moreover, two oppositions occurred, one filed by Celltech against the first patent of the field, which led to this patent being revoked in Europe, and one is pending between Seattle Genetics and EIP Limited (Table 2).

Patent and variant repartition depending on activity

The main pharmacological properties characterizing the 537 identified variants (from the 103 patent families) refer to effector functions, half-life, and IgG stability, given that a single variant may have been studied for more than one pharmacological property. The properties can also vary in any direction (increase, decrease or constancy) (Figure 5). As expected, decrease or even abolition of effector function dominates, but an even greater number of variants have been described for stability modulation. Finally, a small number of patents also address the modulation of IgG4 half-life.

These properties will be examined in greater detail in the following paragraphs, with reference to the key patents listed in Table 2 (capital letters indicated in superscript in the text refer to patents in Table 2).

Patents dealing with effector functions and half-life

Although IgG4 have weak effector functions, their bindings on FcγR show that they are not totally devoid of immune activities (see above); this was a focus of concern for many patent applicants, especially in the first 20 years. Indeed, 45 patent families describe variants in the CH2 with modified effector functions. The most frequently mutated residues cluster into three hotspots, between positions 233 and 237, 297 and 299, and 307 and 309, the two first being related to effector functions¹⁵ (Figure 6). L235R or L235A^{B,C,D,E,F,J} are the most popular IgG4 variants to abolish effector functions, followed by F234A^{E,F} or G237A^E. Positions 297 and 299 correspond to the canonical *N*-glycosylation site that is also frequently mutated to abolish effector functions^{35,36,H,O}. Another technology to abolish effector function has been filed by Alexion^E, by joining an IgG2 (up to T260) with the end of an IgG4 Fc (Figure 7), giving a molecule with weak binding to C1q (because of the IgG4 portion) and to Fcγ receptors (because of the IgG2 portion). This is the format of the well-known marketed antibody eculizumab.

On the contrary, technologies to increase IgG4 lytic activities (F234L and T307P increase binding to FcγRI; E345R increases C1q binding; afucosylated IgG4) are rarely described and even more rarely claimed^{B,O}.

The third CH2 hotspot is located close to CH3 and comprises T307 and residue 309, which could be a leucine or more rarely a valine, depending on a genetic polymorphism (isoallotype). As can be anticipated by its localization¹⁵, variants at positions 307^Y increase FcRn binding. Other ways to increase IgG4 half-life are based on substitutions at position 250 and/or 428 like for other subclasses^G, and at three well-known³⁷ positions in the CH2 (M252Y, S254T and T256E also referred as “YTE”)^T. On the other hand, position 309 does not refer to FcRn binding, but to the creation of many IgM-like multimeric proteins through a single substitution (L309C)^Y. Finally, different substitutions at positions 307 and 309 were described to modulate IgG4 stability^{O,Y}, a subject that is of major importance for IgG4 (see below).

Patents dealing with stabilization

The first IgG4 stabilizing technology was filed in 1994^D, in combination with the L235E substitution that decreases effector functions. Celltech researchers published two years earlier³⁸ that a simple S228P substitution (proline being present at this position in all IgG subclasses but IgG4) in the hinge region sharply reduces hemi-IgG4 interchange. Due to this publication, they had to combine S228P with L235E, already described alone in a former Celltech patent^C. This discovery has had a major impact on IgG4-derived patents: 68 patents were found describing variants dealing with γ4 stability, possibly coupled with mutations decreasing effector functions. Considering each position in the hinge, S228 is by far the most frequently substituted residue, S228P itself accounting for 187 of 241 variants (Figure 8). Moreover, considering the total number of IgG4 variants (537), nearly 35% of them integrate the S228P mutation (Figure 8). Among the other positions in the hinge, C226 and C229 are also frequently altered in the case of fusion proteins when the interchain disulfide bridges are not needed, or above all, to further destabilize the entire molecule and create bispecific antibodies. Overall, the hinge is in fact the most modified portion of IgG4 Fc, with a total of 403 occurrences concerning 15 residues (Figure 8), contrasting with 258 for the 110 CH2 residues and 329 for the 107 CH3 residues. Since the expiration of the Celltech patent in 2014, 55 new patents do integrate the S228P substitution. Replacement of the IgG4 hinge by that of another IgG subclass, *e.g.* IgG3, is an alternative to stabilize the molecule²⁴. However, the corresponding patent^A, filed before that of Celltech^J, was eventually revoked after an opposition from Celltech, which then filed a patent using a γ1 hinge to stabilize IgG4^Q. The strategy used by Alexion to reduce IgG4 effector functions, by using the γ2 hinge and beginning of CH2 (see above and figure 2)^I, was in fact another way to stabilize IgG4, as eculizumab has a proline in position 228 (Figure 7). The hinge region was also modified to

make stable bispecific antibodies, notably by using the S228R substitution in the first $\gamma 4$ chain and S228E in the other^R. Stabilized IgG4 antibody-drug conjugates (ADC) have also been developed^{K,X}.

The IgG4 stabilization story moved from the hinge to the CH3 in 2008, thanks to Genmab^{33,L}, which was followed by many actors. Two major hotspots of variation arise from the analysis of the CH3 variants, between residues 351 and 370, and between 394 and 409 (Figure 9A). More specifically, 8 amino-acids within these hotspots do really emerge, each of them with more than 15 occurrences of modification (Figure 9A). When reported over an IgG4 CH3 structure (Figure 9B), they are all located “inside” the CH3 domain, at the CH3-CH3 interface, which is important for IgG4 stabilization³³. The most determinant position is in fact 409: one of its isoallotypic determinants, arginine, favours hemi-IgG4 interchange while lysine, the other isoallotype determinant shared by other IgG subclasses, favours stabilization^{33;39}. Other patents combine S228P and an IgG1 CH3 to further stabilize IgG4^O, indirectly including an R409K substitution. Playing with the same CH3 residues also allows IgG destabilization, that can be used to create monovalent hemi-IgG^{M,N,S} or bispecific antibodies^{U,V,W}. Finally, a technology to increase protease resistance has been developed by creating new glycosylation motifs in the CH3^P.

DEVELOPMENTS AND PERSPECTIVES

In parallel to the patent landscape analysis, the technological and scientific survey put in place as part of the MAbImprove LabEx⁴⁰ was exploited to find IgG4-based biopharmaceuticals in clinical development. The 14 molecules at least in phase III are listed in Table 1, together with those already marketed. Among them, 4 are wild-type IgG4 and, by definition, do not refer to our pool of patents, indicating that biopharma companies have not abandoned developing unmutated IgG4, despite their potential drawbacks (residual effector functions and hemi-IgG4 interchange). The fact that Roche group is developing a wild-type IgG4 (ibalizumab), whereas in the same time 3 mutated IgG4 (phase III) in line with their patents^J, is probably explained by the fact that this antibody was initially developed by Tanox. Biogen has filed several patents to optimize IgG4^{H,G} since the approval of the wild-type natalizumab in 2006 and has started the development of at least one engineered IgG4 molecule (BIIB-022) based on their technologies. In the case of Medimmune, their IgG4 candidate in phase III (tralokinumab, Table 1) and in phase II (fresolimumab, anti-TGF- $\beta 2$ and mavrimumab, anti-GM-CSF-R α) are of wild type, but their candidate in phase I (MEDI-7814, anti-C5a) is a S228P-stabilized IgG4, possibly indicating a strategic switch towards developing engineered IgG4. Medimmune may have also exploited their knowledge in this subclass to file patents dealing with IgG4 destabilization to make monomeric antibodies^S. The case of reslizumab, recently marketed by Teva, is more surprising, since it was initially developed by Celltech, a pioneer of IgG4 mutations who developed gemtuzumab ozogamicin. UCB is still

(co)developing inotuzumab, ozogamicin, and olokizumab, all three being S228P stabilized antibodies (Table 1) that do not bear the L235E substitution described in their patent^{C,D}. However, the anti-TNF- α CDP-571 was another wild-type IgG4 from Celltech, like reslizumab. No explanation has been found to explain this switching.

Despite its limited number of IgG4-related patents^F, Lilly recently brought dulaglutide and ixekizumab into the market and has galcanezumab in phase III (Table 1). All these antibodies are stabilized (S228P), but galcanezumab and dulaglutide have additional mutations to abrogate effector functions (F234A and L235A). The dulaglutide approval coincides with the freedom-to-operate conferred by expiration of Celltech's^{C,D} and Macrogenics' patents^B, as well as for pembrolizumab and nivolumab, the two anti-PD1 immune checkpoint inhibitors developed by Merck and BMS, respectively. Similarly, dupilumab and fasinumab are two S228P-bearing IgG4 antibodies developed by Regeneron and Sanofi, without any link with the Regeneron patents^{U,V,W}, which are dealing with bispecific antibodies. Besides eculizumab, a stabilized effectorless IgG2/4, Alexion has two other anti-C5 in phase II, ALXN1210 and ALXN-1007, which use the same technology. No other company has developed such a format yet. Roche and its subsidiaries Chugai and Genentech have lebrikizumab, crenezumab, and emicizumab in phase III (Table 1), all three bearing only the S228P mutation. None of these antibodies bears mutation to abrogate effector functions as described in Roche's patents^J. Emicizumab is a bispecific antibody developed by Chugai⁴¹, which has been optimized for stability (S228P and R409K), for half-life and for well-assembly into a bispecific molecule through knob-in-hole mutations⁴². Chugai here appears as a pioneer, as this is the only antibody using the R409K substitution identified by Genmab for stabilization, which is actually a natural allotype switching. Some questions remain on the validity of the claims covering this substitution^Q, as it is naturally occurring in human. Very surprisingly, no IgG4-based antibody has been developed by Genmab yet, despite their prominent role in this field. Similarly, Janssen is absent from the market despite its 6 patents, and has only ichorcumab (anti-thrombin) in phase I, initially developed by XO1 Limited, acquired by Janssen in 2015.

Most of the past and current developments of IgG4-based antibodies show little diversity, most of them bearing the S228P mutation, alone or associated with mutations to abrogate effector functions, such as F234A and L235A. This probably reflects the expiration of Celltech's^{C,D} and Macrogenics' patents^B in 2014, giving a freedom-to-operate to other companies. Genmab has developed the DuoBody© approach based on their technologies^{L,M,N} to control the efficient generation of IgG1 bispecific antibodies by introducing destabilizing amino-acids, R409 like in $\gamma 4$ for one chain, and L405 for the other, which is the hemi-IgG4 interchange determinant in rhesus monkeys^{33,43}. By mixing a K409R IgG1 antibody with a F405L IgG1, they become half-molecules under reducing conditions, and easily reassemble as heterodimers to form bispecific antibodies⁴³⁻⁴⁵. Pfizer has also developed a bispecific technology based on IgG4 characteristics, by acting on S228 stability^R, with a S228R in one heavy chain and a S228E in the other. On the contrary, Medimmune

introduced mutations in Fc domains of IgG4 and IgG1 to disrupt the CH3-CH3 interface, abolishing Fc dimerization and creating half-antibodies. These mutations give birth to a stable monovalent antibody that retains a monomeric Fc domain, with an increased serum half-life compared to antibody fragments like Fab^{46,5}. The half-life can be improved to be equivalent to an entire IgG by introducing the YTE substitutions⁴⁷.

Overall, the near exponential increase of IgG4 Fc-related patents reflects the growing interest of companies for this unusual IgG subclass, prone to multiple arrangements, under the inspiration of molecular engineers acting as choreographers. IgG4 appears as a twirling subclass; the capacity of the $\gamma 4$ heavy chain to swap dance can be turned into multiple combinations and dance figures, possibly until twist, considering its ability to rotating its CH2¹². This recently discovered $\gamma 4$ property¹² is also a plot twist, needing us to revisit what has been described until now.

Acknowledgments and Disclosures

This work was supported by the French Higher Education and Research Ministry under the program “Investissements d’Avenir” grant agreement: LabEx MAbImprove ANR-10-LABX-53-01. It was also part of the MAbMapping technological intelligence platform of the University François-Rabelais of Tours, MAbMapping being co-financed by the European Regional Development Fund. We thank Christophe Dumet, Thierry Moreau and Nicola Sunter for their helpful comments and Romane Chastang for her work on IgG4 patent oppositions.

The authors declare no competing financial interests that are directly relevant to the content of this article.

Bibliography

1. Morell, A., Skvaril, F., Steinberg, A. G., Van Loghem, E. & Terry, W. D. Correlations between the Concentrations of the Four Sub-Classes of IgG and Gm Allotypes in Normal Human Sera. *J. Immunol.* **108**, - (1972).
2. Salfeld, J. G. Isotype selection in antibody engineering. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1369–1372 (2007).
3. Ishizaka, T., Ishizaka, K., Salmon, S. & Fudenberg, H. Biologic activities of aggregated gamma-globulin. 8. Aggregated immunoglobulins of different classes. *J. Immunol.* **99**, 82–91 (1967).
4. Brüggemann, M. *et al.* Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J. Exp. Med.* **166**, 1351–61 (1987).
5. Bindon, C. I., Hale, G., Brüggemann, M. & Waldmann, H. Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *J. Exp. Med.* **168**, 127–42 (1988).
6. Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. & Winter, G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* **332**, 323–7 (1988).
7. Tao, M. H., Smith, R. I. & Morrison, S. L. Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation. *J. Exp. Med.* **178**, 661–7 (1993).
8. Schumaker, V. N., Calcott, M. A., Spiegelberg, H. L. & Mueller-Eberhard, H. J. Ultracentrifuge studies of the binding of IgG of different subclasses to the C1q subunit of the first component of complement. *Biochemistry* **15**, 5175–5181 (1976).
9. Isaacs, J. D. *et al.* A therapeutic human IgG4 monoclonal antibody that depletes target cells in humans. *Clin. Exp. Immunol.* **106**, 427–33 (1996).
10. Greenwood, J. & Clark, M. Structural motifs involved in human IgG antibody effect or functions *. 1098–1104 (1993).
11. Pink, J. R., Buttery, S. H., De Vries, G. M. & Milstein, C. Human immunoglobulin subclasses. Partial amino acid sequence of the constant region of a gamma 4 chain. *Biochem. J.* **117**, 33–47 (1970).
12. Scapin, G. *et al.* Structure of full-length human anti-PD1 therapeutic IgG4 antibody pembrolizumab. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2015). doi:10.1038/nsmb.3129
13. Phillips, M. L., Mi-Hua, T., Morrison, S. L. & Schumaker, V. N. Human/mouse chimeric monoclonal antibodies with human IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 constant domains: Electron microscopic and hydrodynamic characterization. *Mol. Immunol.* **31**, 1201–1210 (1994).
14. Roux, K. H., Strelets, L. & Michaelsen, T. E. Flexibility of human IgG subclasses. *J Immunol* **159**, 3372–3382 (1997).
15. Shields, R. L. *et al.* High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J. Biol. Chem.* **276**, 6591–604 (2001).
16. Idusogie, E. E. *et al.* Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J. Immunol.* **164**, 4178–84 (2000).
17. Ravetch, J. V & Kinet, J. P. Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 457–92 (1991).
18. Koene, H. R. *et al.* 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* **90**, 1109–14 (1997).
19. Bruhns, P. *et al.* Specificity and affinity of human Fc gamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* **113**, 3716–25 (2009).
20. Hussain, K. *et al.* Upregulation of Fc gammaRIIb on monocytes is necessary to promote the superagonist activity of TGN1412. *Blood* **125**, 102–110 (2015).
21. Roopenian, D. C. & Akilesh, S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 715–25 (2007).
22. Edelman, G. M. The Covalent Structure of a Human yG-Immunoglobulin. XI. Functional Implications'. **9**, 3197–3205 (1969).
23. van der Neut Kolfshoten, M. *et al.* Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science* **317**, 1554–1557 (2007).
24. Tan, L. K., Shopes, R. J., Oi, V. T. & Morrison, S. L. Influence of the hinge region on complement activation, C1q binding, and segmental flexibility in chimeric human immunoglobulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 162–6 (1990).
25. King, D. J. *et al.* Expression, purification and characterization of a mouse-human chimeric antibody and chimeric Fab' fragment. *Biochem. J.* **281** (Pt 2, 317–323 (1992).

376 26. Colcher, D. *et al.* Characterization and Biodistribution of Recombinant and Recombinant / Chimeric Constructs of Monoclonal
377 Antibody Characterization and Biodistribution of Recombinant and Recombinant / Chimeric Constructs of Monoclonal Antibody
378 B72 . 3. *Analysis* **3**, 1738–1745 (1989).

379 27. van der Zee, J. S., van Swieten, P. & Aalberse, R. C. Serologic aspects of IgG4 antibodies. II. IgG4 antibodies form small,
380 nonprecipitating immune complexes due to functional monovalency. *J. Immunol.* **137**, 3566–71 (1986).

381 28. Aalberse, R. C., van der Gaag, R. & van Leeuwen, J. Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an
382 IgG4-restricted response. *J. Immunol.* **130**, 722–6 (1983).

383 29. Schuurman, J., Perdok, G. J., Gorter, A. D. & Aalberse, R. C. The inter-heavy chain disulfide bonds of IgG4 are in equilibrium with
384 intra-chain disulfide bonds. *Mol. Immunol.* **38**, 1–8 (2001).

385 30. Labrijn, A. F. *et al.* Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo. *Nat.*
386 *Biotechnol.* **27**, 767–771 (2009).

387 31. Schuurman, J. *et al.* Normal human immunoglobulin G4 is bispecific : it has two di ff erent antigen-combining sites. **178**, (1999).

388 32. Pandey, J. P. Fab-arm exchange is a misnomer. *MAbs* **4**, 635 (2012).

389 33. Labrijn, A. F. *et al.* Species-Specific Determinants in the IgG CH3 Domain Enable Fab-Arm Exchange by Affecting the Noncovalent
390 CH3-CH3 Interaction Strength. *J. Immunol.* **187**, 3238–3246 (2011).

391 34. Pottier, J. Modifications dans la partie Fc des IgG4 présents dans les brevets. (2016).

392 35. Tao, M. H. & Morrison, S. L. Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and
393 effector functions mediated by the human IgG constant region. *J. Immunol.* **143**, 2595–601 (1989).

394 36. Walker, M. R., Lund, J., Thompson, K. M. & Jefferis, R. Aglycosylation of human IgG1 and IgG3 monoclonal antibodies can
395 eliminate recognition by human cells expressing Fc gamma RI and/or Fc gamma RII receptors. *Biochem. J.* **259**, 347–53 (1989).

396 37. Dall'Acqua, W. F., Kiener, P. a & Wu, H. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor
397 (FcRn). *J. Biol. Chem.* **281**, 23514–24 (2006).

398 38. Angal, S. *et al.* A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody. *Mol.*
399 *Immunol.* **30**, 105–8 (1993).

400 39. Davies, A. M. *et al.* Crystal structure of the human IgG4 CH3 dimer reveals the role of Arg409 in the mechanism of Fab-arm
401 exchange. *Mol. Immunol.* **54**, 1–7 (2013).

402 40. Pèlegri n, A., Daguet, A. & Watier, H. MAbImprove: a French 'Laboratoire d'excellence' (LabEx) dedicated to therapeutic
403 antibodies. *MAbs* **6**, 803–4 (2014).

404 41. Sampei, Z. *et al.* Identification and Multidimensional Optimization of an Asymmetric Bispecific IgG Antibody Mimicking the
405 Function of Factor VIII Cofactor Activity. *PLoS One* **8**, (2013).

406 42. Ridgway, J. B., Presta, L. G. & Carter, P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain
407 heterodimerization. *Protein Eng.* **9**, 617–621 (1996).

408 43. Labrijn, A. F. *et al.* Efficient generation of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**,
409 5145–50 (2013).

410 44. Labrijn, A. F. *et al.* Controlled Fab-arm exchange for the generation of stable bispecific IgG1. *Nat. Protoc.* **9**, 2450–63 (2014).

411 45. Gramer, M. J. *et al.* Production of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange: Scalability from bench to large-scale
412 manufacturing by application of standard approaches. *MAbs* **5**, 962–973 (2013).

413 46. Wilkinson, I. C. *et al.* Monovalent IgG4 molecules: Immunoglobulin Fc mutations that result in a monomeric structure. *MAbs* **5**,
414 406–417 (2013).

415 47. Shan, L. *et al.* Generation and Characterization of an IgG4 Monomeric Fc Platform. *PLoS One* **11**, e0160345 (2016).

416 48. Brusco, A. *et al.* Molecular characterization of immunoglobulin G4 gene isoallotypes. *Eur. J. Immunogenet.* **25**, 349–355 (1998).

417 49. FRANGIONE, B., MILSTEIN, C. & PINK, J. R. L. Immunoglobulins: Structural Studies of Immunoglobulin G. *Nature* **221**, 145–148
418 (1969).

419 50. Liu, H. & May, K. Structural variations , chemical modifications and possible impacts to stability and biological function Disulfide
420 bond structures of IgG molecules © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . Do not distribute . *MAbs* **4**, 17–23 (2012).

421

Figures

Table 1: IgG4-Fc bearing biopharmaceuticals already approved or in clinical phase III

Antibody	Target	Society	Format	Fc modifications (Eu)	Approval year or phase
gemtuzumab ozogamicin	CD33	Wyeth/Pfizer Celltech/UCB	IgG4	S228P	2000, withdrawn in 2010
natalizumab	VLA-4	Biogen	IgG4	No mutation	2006
eculizumab	C5	Alexion	IgG2/IgG4	IgG2 before T260, then IgG4 (Figure 7)	2007
dulaglutide	GLP-1 R	Lilly	IgG4 fusion protein	S228P, F234A, L235A ^a	2014
nivolumab	PD1	BMS	IgG4	S228P	2015
pembrolizumab	PD1	Merck	IgG4	S228P	2015
ixekizumab	IL-17	Lilly	IgG4	S228P ^a	2016
reslizumab	IL-5	Teva Celltech/UCB	IgG4	No mutation	2016
emicizumab	Factor IX x Factor X	Chugai Roche	IgG4	Multiple mutations ^b	III
ibalizumab	CD4	TaiMed Tanox Genentech (Roche)	IgG4	No mutation	III
inotuzumab ozogamicin	CD22	Pfizer Celltech/UCB	IgG4	S228P	III
tabalumab	BAFF	Lilly	IgG4	S228P	III
andecaliximab	MMP-9	Gilead ^c	IgG4	S228P	III
tralokinumab	IL-13	MedImmune	IgG4	No mutation	III
galcanezumab	CGRP	Lilly	IgG4	S228P, F234A, L235A ^a	III
dupilumab	IL-4R α	Regeneron Sanofi	IgG4	S228P	III
lebrikizumab	IL-13	Roche Genentech	IgG4	S228P	III
fasinumab	NGF	Regeneron Sanofi	IgG4	S228P	III
olokizumab	IL-6	UCB R-Pharm	IgG4	S228P	III
crenezumab	A β 42 and A β 40	Roche Genentech	IgG4	S228P	III
PRO 140	CCR5	CytoDyn ^c	IgG4	No data	II/III

In grey are marketed antibodies; ^aThese variants also include a deletion of the lysine in position 447 (and emicizumab also a deletion in position 446), abrogating the heterogeneity of the C-terminal end of antibodies; ^bIn the anti-factor IX chain: K196Q, S228P, F296Y, E356K, R409K, H435R, L445P and removal of G446 and K447^a, in the anti-factor X chain: A196Q, S228P, F296Y, R409K, K439E, L445P and removal of G446 and K447^a; ^c No patent were found for these companies

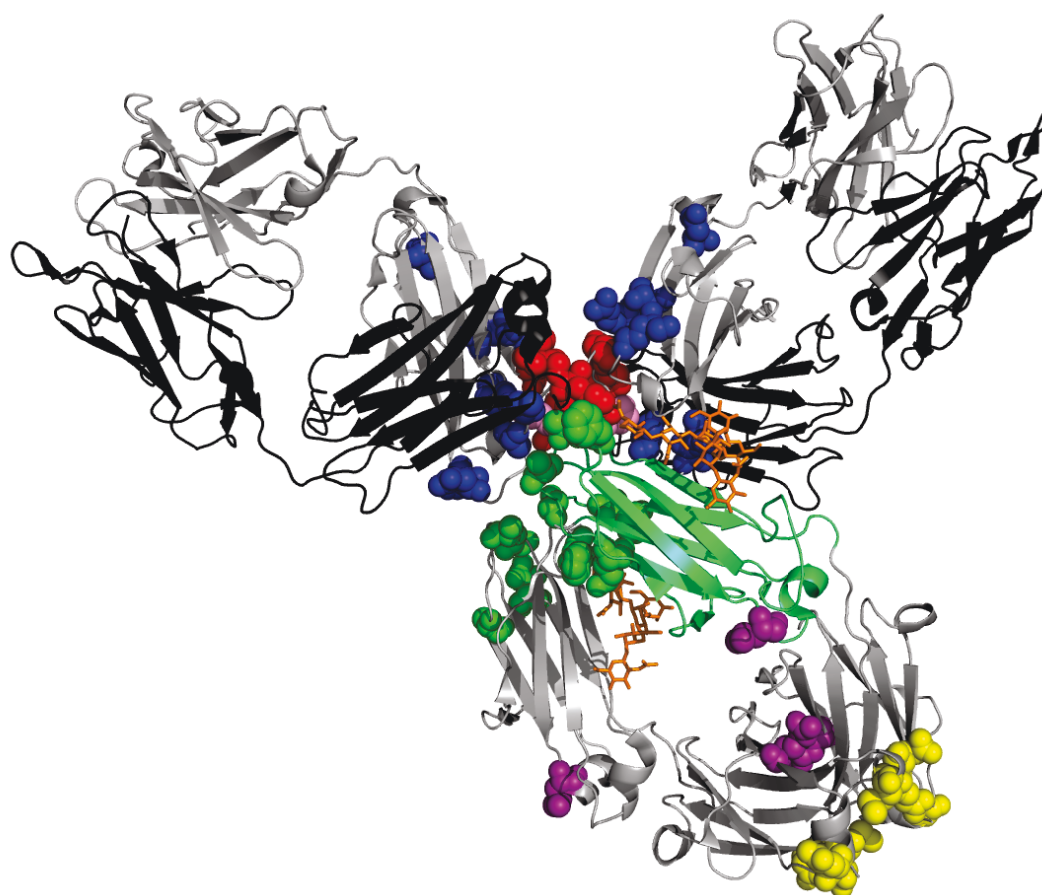
Table 2: Patent related to IgG4 Fc modification addressed in the text

Patent Number	Description	Assignee	Filing year	Eff. Func. *	Stab. #	Bisp. e. #	FcRn #	Legal situation	Ci t.*
EP0327378	Replacement of hinge, CH2, or CH3 with the ones from other subclasses	UNIV COLUMBIA BECTON DICKINSON	1989	●				LAPSED / REVOKED IN EUROPE	A
WO9428027	Replacement of L235 and F234 to abrogate effector functions	MACROGENIC S JANSSEN	1993	●				EXPIRED	B
WO9429351	Antibodies with reduced effector functions, including an IgG4 with L235E	CELLTECH UCB	1993	●				EXPIRED	C
WO9526403	Stabilized (S228P) antibody against E-selectin with weak effector functions (L235E)	CELLTECH UCB	1994	●	●			EXPIRED	D
WO9728267	CTLA-4-Fc Fusion protein with mutations to abrogate effector functions (L235E, G237A)	REPLIGEN	1996		●			GRANTED	E
WO03016468	Stabilized IgG4 (S228P) with abrogated effector functions (F234A and L235A)	LILLY	2002	●	●			GRANTED	F
WO2004035752	IgG4 modified in positions 250 and 428 for altered FcRn binding	ABBOTT PDL	2003				●	GRANTED	G
WO2005018572	Aglycosylated antibody (N297Q or T299A) for abrogation of effector functions and stabilization by S228P	BIOGEN	2004	●	●			GRANTED	H
WO2005007809	An antibody composed of a portion of IgG2 (until T260) fused to IgG4 to abrogate effector functions	ALEXION	2004	●	●			PENDING	I
WO2006029879 US2009311779 US2010209423	IgG4 with S228P and L235A/E for stabilization and abrogation of effector functions	ROCHE GENENTECH	2005	●	●			GRANTED	J
WO2008070593	Development of ADC with S228P, G237A, L235A and E318A, for stabilization and abrogation of effector functions	SEATTLE GENETICS	2007	●	●			GRANTED / OPPOSITION PENDING	K
WO2008145142	IgG4 stabilized by mutating R409, F405 or K370, and not S228	GENMAB	2008	●	●			GRANTED	L

WO2008145140 WO2008145137	Monovalent IgG4, incapable of forming disulfide inter-heavy chain bonds, and with some mutations such as F405A/L or R409K/A in CH3	GENMAB	2008		●		GRANTED	M
WO2010063785	Modifications preventing intermolecular CH3-CH3 interactions and making monovalent antibodies, or with stabilizing modifications (R409K)	GENMAB	2009		●		PENDING	N
WO2010085682	Stabilized IgG4 (S228P) with a CH3 from IgG1 or comprising mutation such as N297Q or T299A to abrogate effector functions, and others in CH2 or CH3 for further stabilization	BIOGEN	2010	●	●		PENDING	O
WO2011059684	IgG4 with an increased resistance to proteases, comprising N-glycosylation sites in CH3	JANSSEN	2010		●		PENDING	P
GB201014033 GB201203071	Stabilized IgG4 by replacement with a IgG1 hinge region	UCB	2010 2012		●		PENDING	Q
WO2011143545	Stabilized IgG4 heterodimers with different S228 mutations in the two heavy chains (notably S228R/S228E)	PFIZER	2011		●		PENDING	R
WO2012020096	Monomeric hingeless IgG4 with modifications in the CH3 domain for further destabilization	MEDIMMUNE	2011		●		PENDING	S
WO2012083370	Stabilized IgG4 (S228) with modifications to increase half-life (M252Y, S254T and T256E)	CEPHALON	2011		●	●	PENDING	T
US2014134719	IgG4 comprising H435R alone or in combination with Y436F in CH3 (Including IgG4's) to abrogate protein A binding and making bispecific antibodies	REGENERON	2013			●	PENDING	U
US2015266966	Aglycosylated bispecific IgG4 antibodies with mutations to mimic IgG2 stability and weak effector functions (S228P, E233P, F234V, and L235A) Aglycosylated bispecific IgG1 antibodies with an IgG4 CH2 modified to mimic IgG2 stability and weak effector functions (S228P, E233P, F234V, and L235A)	REGENERON	2015	●	●	●	PENDING	V
WO2015148708	Bispecific antibodies by incorporating H435R and Y436F substitutions	REGENERON	2015			●	PENDING	W
WO2015196089	Development of an IgG4 ADC, with the S228P stabilizing mutation and an additional cysteine (S442C)	ABGENOMICS BIOALLIANCE	2015		●		PENDING	X
WO2015158867 WO2015132364	Multimeric IgG4 through L309C mutation or addition of an IgM or IgA tailpiece, with the S228P stabilizing substitution and/or mutation increasing FcRn binding.	UCB	2015		●	●	PENDING	Y

*The capital letters refer to the corresponding patent in the article; # In black point is indicated what type of modification is included in the patent

A



B

		HINGE													
Pos. (Eu)	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230
$\gamma 1$	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
	GAG	CCC	AAA	TCT	TGT	GAC	AAA	ACT	CAC	ACA	TGC	CCA	CCG	TGC	CCA
$\gamma 4$	E	S	K	Y	G				P	P	C	P	S	C	P
	GAG	TCC	AAA	TAT	GGT				CCC	CCA	TGC	CCA	TCA	TGC	CCA

Figure 1: Primary structural differences between $\gamma 4$ and $\gamma 1$ heavy chains. A: Three dimensional structure of pembrolizumab highlighting the amino-acid differences between $\gamma 4$ and $\gamma 1$ heavy chains: pembrolizumab differs from wild-type IgG4 by one amino-acid at position 228 in the hinge region, a proline replacing a serine residue (S228P, shown in pink but masked in part by other residues). The rotated CH2 of pembrolizumab is shown in green cartoon. The two glycans are indicated in orange, showing the external exposition of the glycan from the rotated domain. IgG4 presents two isoallotypes (single nucleotide polymorphisms in the *IGHG4* gene)⁴⁸, at position 309 in CH2 with either a leucine or a valine, and at position 409 in the CH3 with either an arginine or a lysine, shown by purple spheres. The positions which have different amino-acid between $\gamma 4$ and $\gamma 1$ heavy chains are shown as blue sphere for CH1 (131; 133; 137; 138; 196; 199; 203; 214), red spheres for hinge region (217; 219; 220; 224; 225; 228), green spheres for CH2 (234; 268; 274; 296; 327; 330; 331), and as yellow spheres for CH3 (355; 356; 358; 409; 419; 445). All of these residues were superimposed on the pembrolizumab structure (PDB: 5DK3¹²) using PyMOL Molecular Graphics System, version 1.7.4

(Schrödinger). B: Amino-acid sequence comparison between $\gamma 1$ and $\gamma 4$ hinge regions. Nucleotide and amino-acid differences in $\gamma 4$ compared to $\gamma 1$ are shown in red. Cysteines indicating disulfide bridges are shown in bold. The nucleotide alignment has enabled us to number amino acids at positions Y219 and G220, which were not numbered in the original Eu numbering. $\gamma 4$ hinge region differs by 6 amino-acids from $\gamma 1$ hinge region. The $\gamma 4$ hinge has a three amino-acid deletions (shown in grey), with only two disulfide bridges, while $\gamma 1$ has three. The missing one, C220 bridges the light chain to the $\gamma 1$ heavy chain; in IgG4, this inter-chain bridge involves C131 in the CH1^{49;50}.

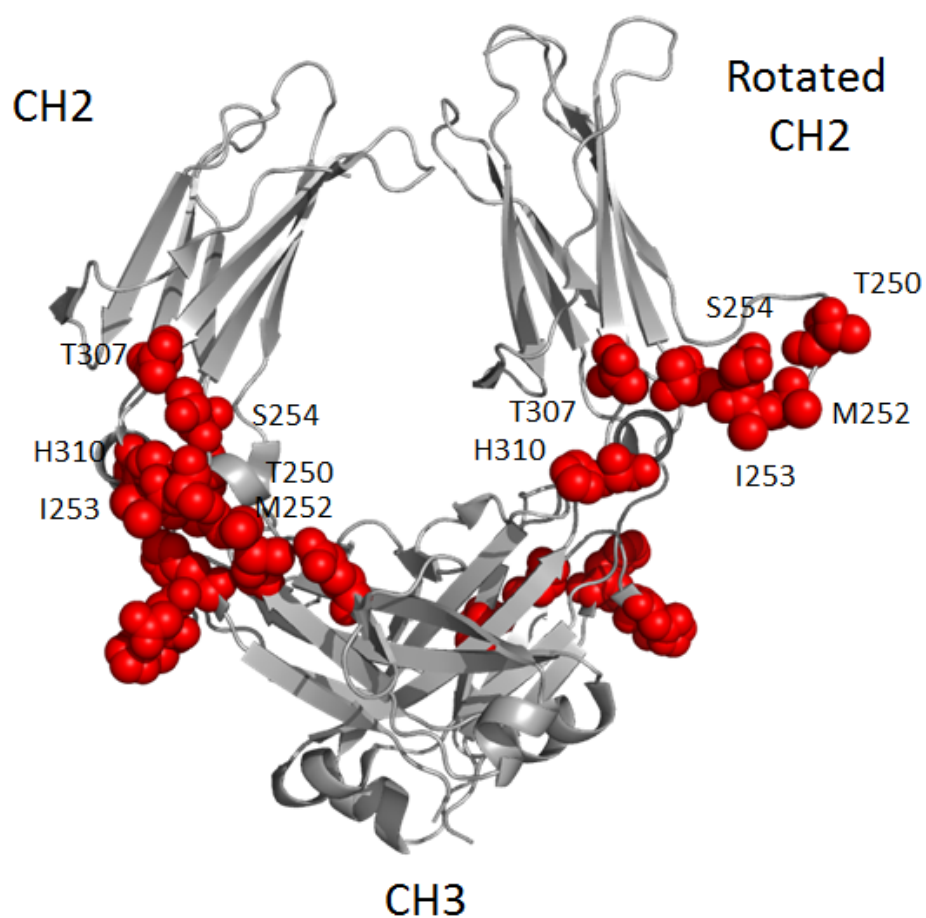


Figure 2: Three dimensional structure of pembrolizumab Fc highlighting residues known to influence FcRn binding. “Normal” CH2 appears on the left side and the rotated one on the right one. Amino-acids that influence FcRn binding (T250, M252, I253, S254, T307 and H310 in the CH2; E380, H433, N434 and H435 in the CH3)²¹ are shown as red spheres. All of these residues were superimposed on the pembrolizumab structure (PDB: 5DK3¹²) using PyMOL Molecular Graphics System, version 1.7.4 (Schrödinger).

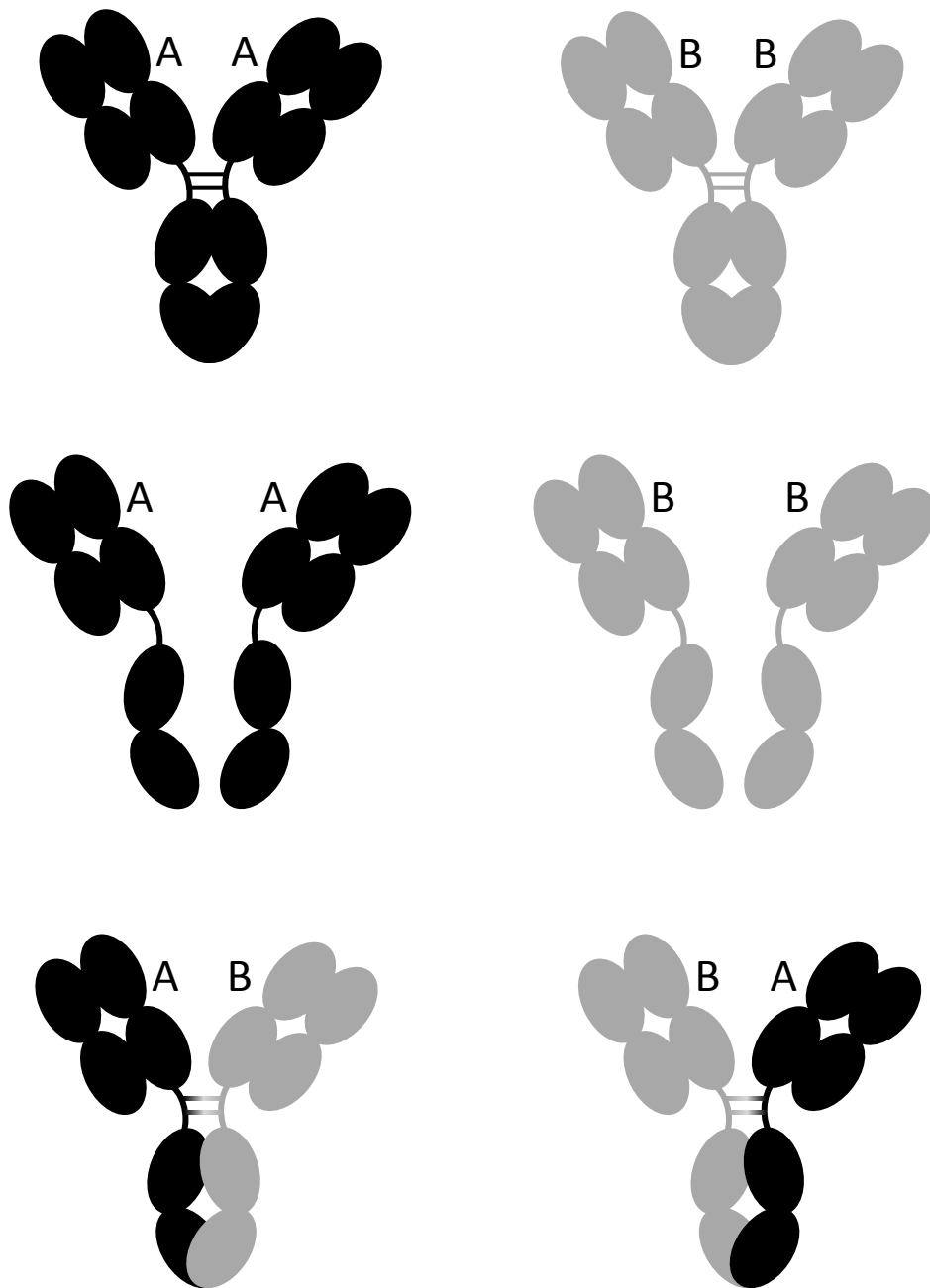


Figure 3: Schematic representation of the hemi-IgG4 interchange phenomenon. Under denaturing, non-reducing conditions, wild type IgG4 show a dissociation process to form a half-molecule. This half-molecule can reassemble with a heavy chain from another antibody, to form a bispecific antibody.

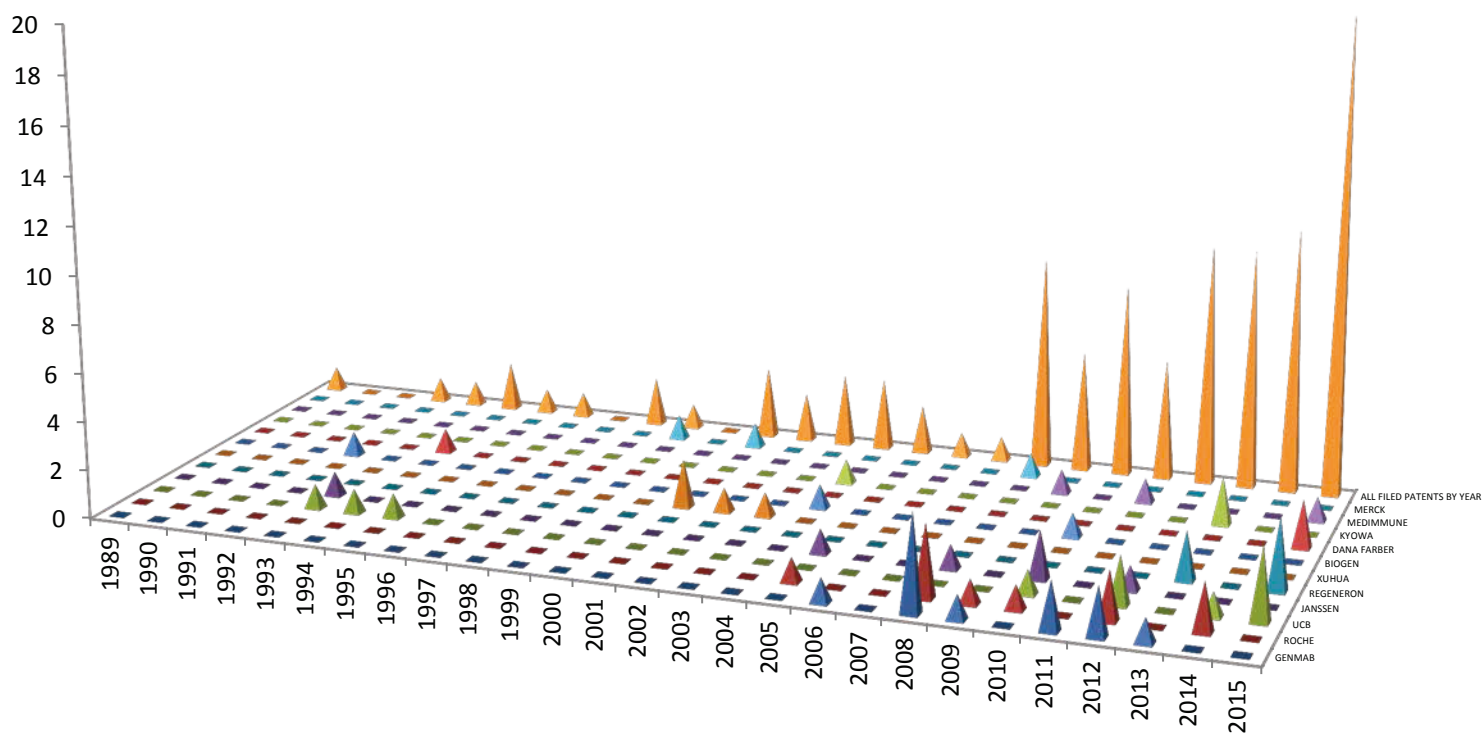


Figure 4: Number of IgG4 Fc-related patent families filed per year, in total and for applicants having more than 2 patent families. Applicants are ordered from the front to the rear depending on the total number of filed patents. The last line in orange represents the total number of patents filed per year for all applicants. “UCB” includes UCB and Celltech patents. “Roche” includes Roche, Chugai, Genentech and Glycart.

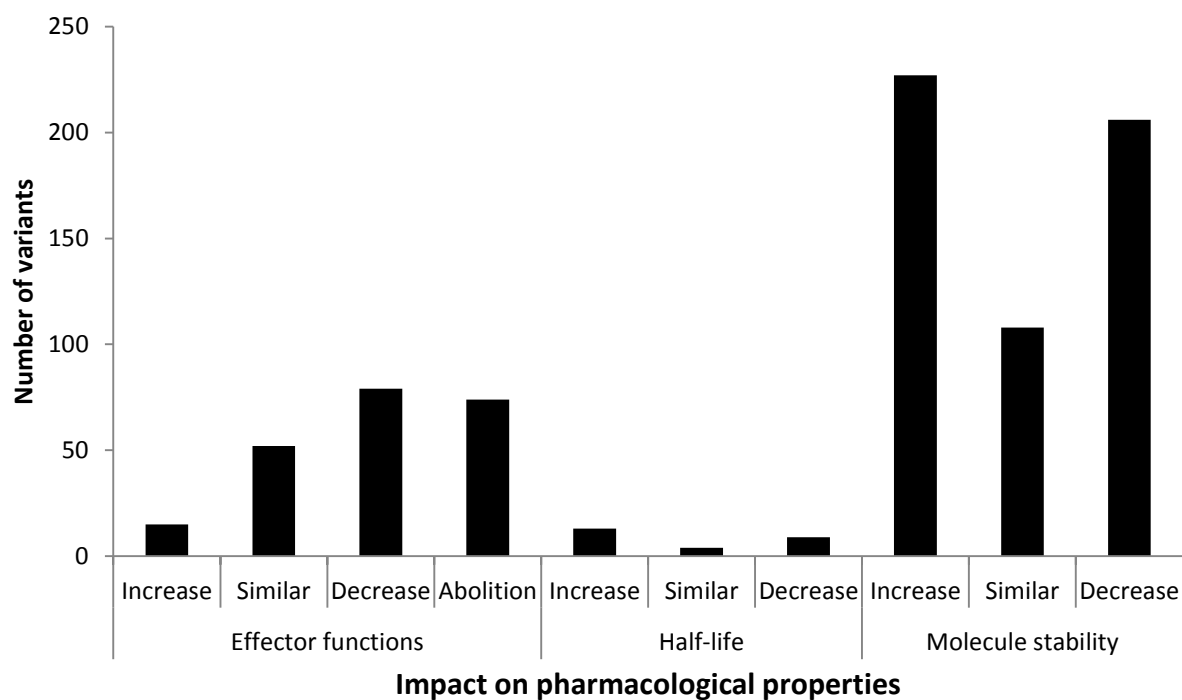


Figure 5: Pharmacological properties of the IgG4 Fc variants identified in patents. For effector functions, binding to FcγRs and C1q, ADCC, complement and phagocytosis activities have been combined. Molecule stability combines data for general molecule stability, thermal stability and ability to form hemi-IgG4 interchange. Different properties can be evaluated for each variant, explaining why the cumulative number of variants appearing in the figure exceeds the number of 537 variants.

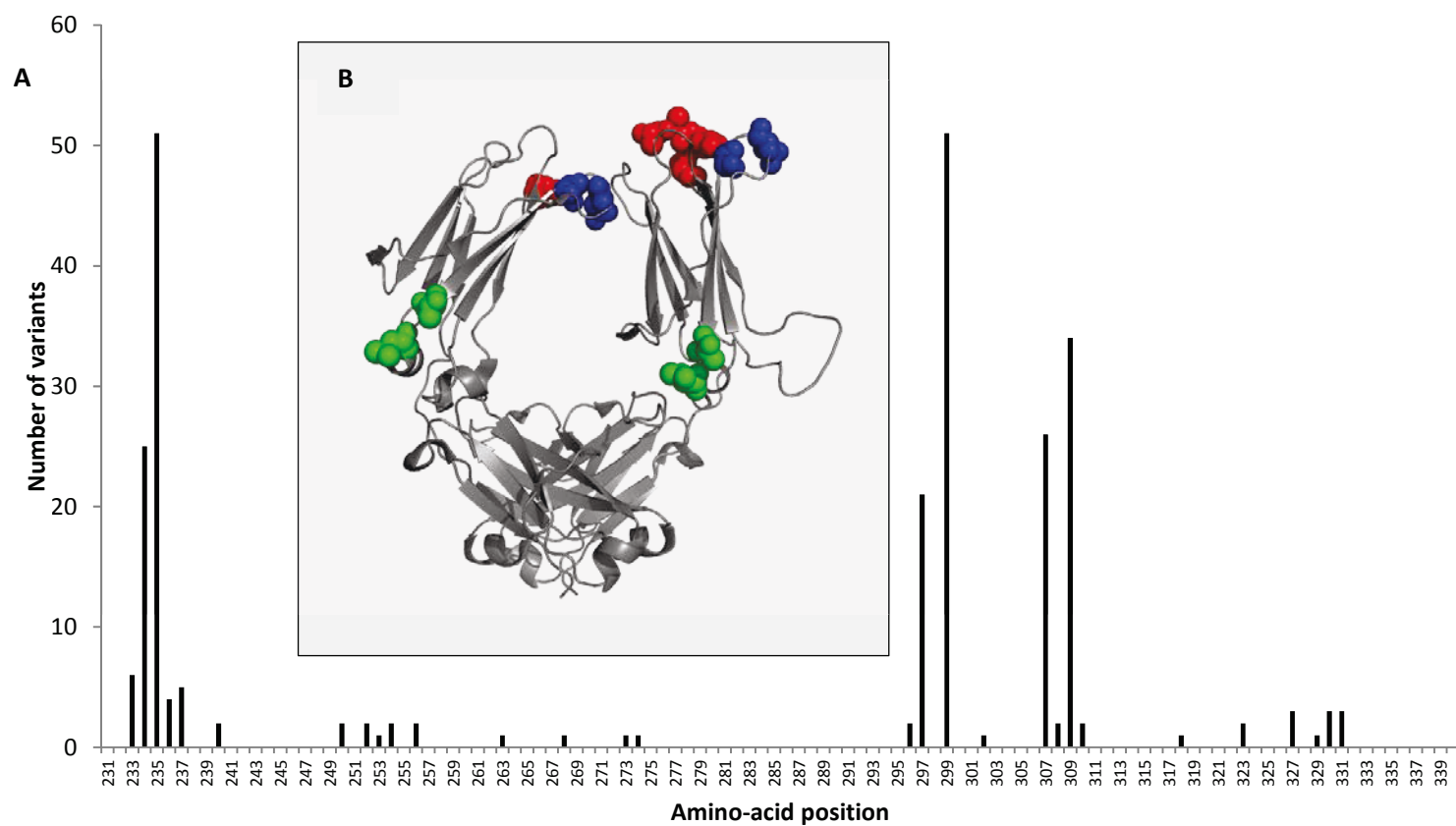


Figure 6: Hotspots of modification in γ4 CH2 domain. A: Occurrences of variants at each position in the γ4 CH2 domain. One occurrence is counted each time a position is modified in the CH2 of a variant; B: Hotspots of modification reported on pembrolizumab structure (PDB: 5DK3¹²) using PyMOL Molecular Graphics System, version 1.7.4 (Schrödinger). The first amino-acid hotspot of modifications in the CH2 domain (E233, F234, L235, G236 and G237) is shown in red, the second one (N297 and T299) in blue, and the third one (T307 and L309) in green.

Pos (Eu)	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	280
$\gamma 2$	C	P	P	C	P	A	P	P	V	A	.	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D
Ecz	C	P	P	C	P	A	P	P	V	A	.	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	Q	E	D
$\gamma 4$	C	P	S	C	P	A	P	E	F	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	Q	E	D

Figure 7 : Partial sequence of eculizumab (Ecz), compared with sequences of $\gamma 2$ (light green) and $\gamma 4$ (light pink) heavy chains^E. Even if the fusion occurs after T260 in the patent (vertical double line), the overlapping area between $\gamma 2$ and $\gamma 4$ sequence is shown in brown. Amino-acids in green and red in $\gamma 2$ and $\gamma 4$ sequences are those differing between these subclasses.

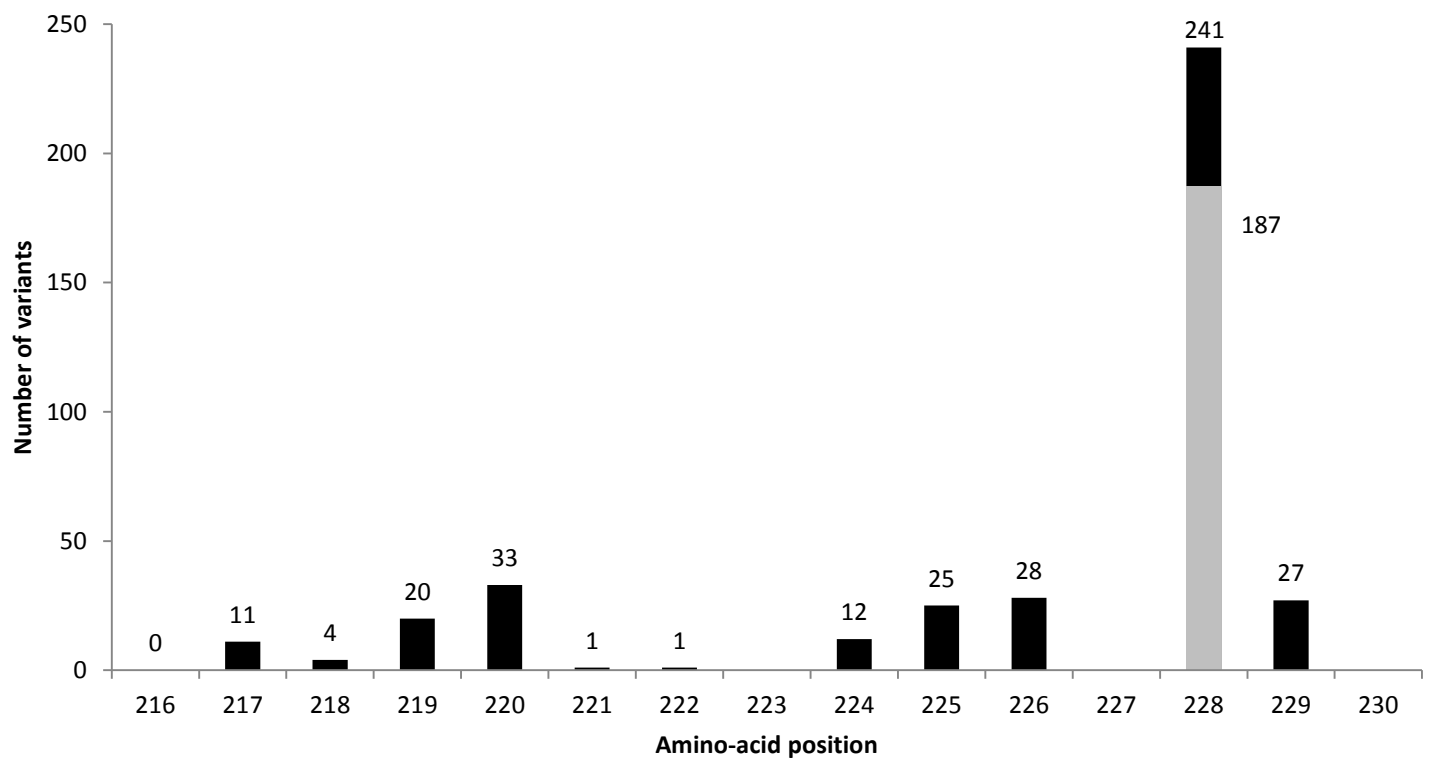


Figure 8: Occurrence of variants at each position in the $\gamma 4$ hinge region. One occurrence is counted each time a position is modified in the hinge region of a variant. The S228P substitution is indicated in grey.

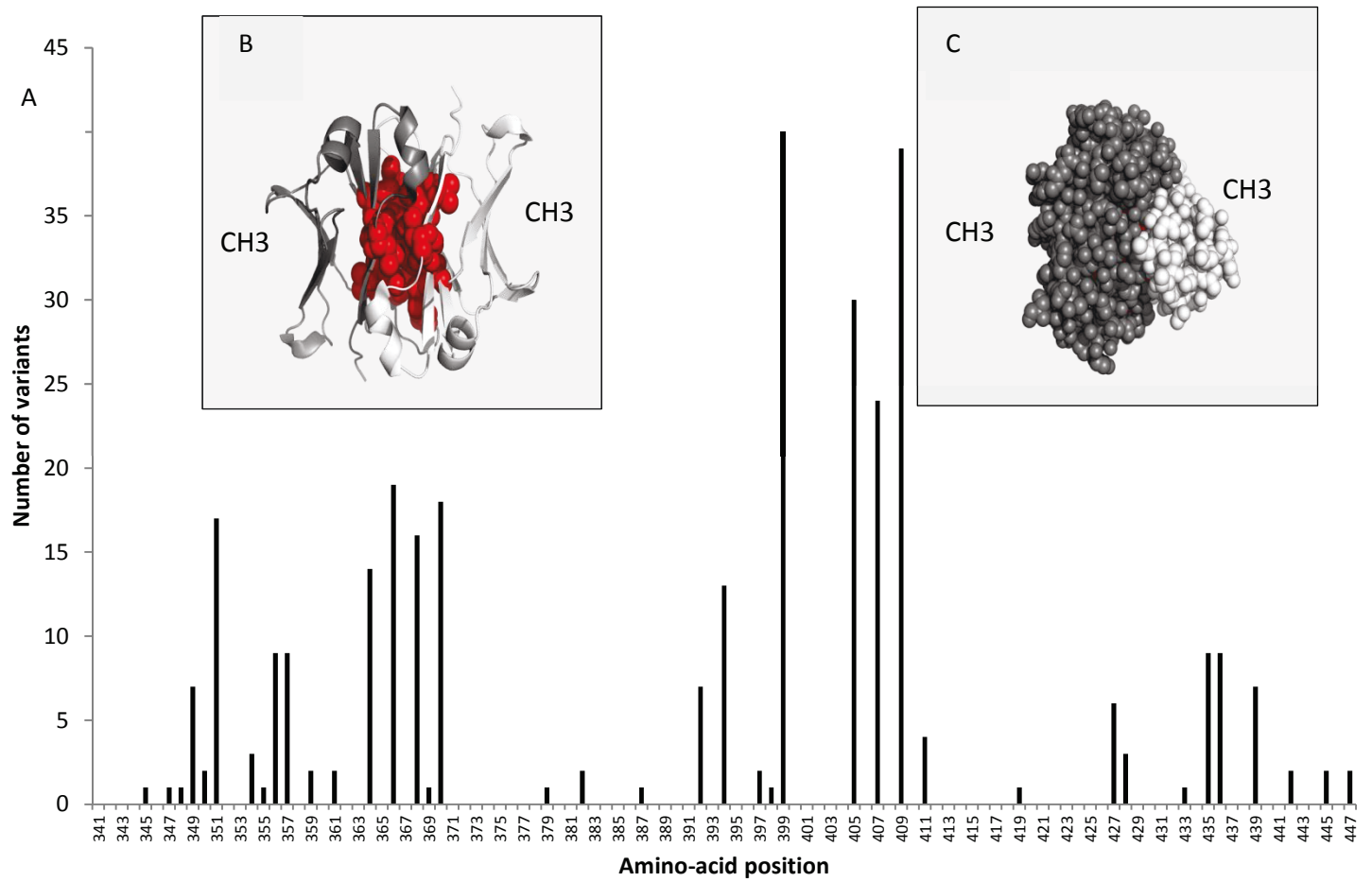


Figure 9: Hotspots of modification in the $\gamma 4$ CH3 domain. A: Occurrence of variants at each position in the $\gamma 4$ CH3 domain. One occurrence is count each time a position is modified in the CH3 of a variant. Hotspots of modification reported in cartoon (B) or spheres (C) in the IgG4 CH3 structure (PDB: 4B53³⁹) using PyMOL Molecular Graphics System, version 1.7.4 (Schrödinger). The most frequently modified amino-acids (L351, T366, L368, K370, D399, F405, Y407, and R409) are shown by red spheres.

III-Article 2 : *Unexplained abuses of Human IgG subclass denomination in antibody patents*

Durant l'analyse des résultats des requêtes et l'analyse microscopique des brevets nous avons parcouru un nombre très important de brevets, et identifié des difficultés inhérentes à ce type de document. Celui-ci n'étant pas pensé pour être utilisé dans un cadre scientifique, il est fréquent que les données ne soient pas clairement organisées, ce qui complique la compréhension et la collecte des informations. Ainsi par exemple, dans notre cas, la numérotation des acides aminés peut ne correspondre à aucune numérotation connue, et les variants peuvent être disséminés tout au long du texte, quand un tableau rendrait leur lecture plus facile.

Le brevet, au contraire des journaux à comité de lecture, ne voit pas son contenu scientifique évalué par des pairs. Ainsi, l'utilisation de ce contenu, comme dans notre cas à des fins de recherche, nécessite impérativement de rapprocher ces données de celles contenues dans la littérature, et seule notre indexation des variants dans la base de données est réalisée à partir de la donnée scientifique brute contenue dans les brevets.

Dans l'exemple relaté dans l'article qui suit, repéré au cours des requêtes visant à indexer les brevets pertinents dans notre corpus, nous avons été interpellés par des revendications surprenantes apparaissant dans plusieurs brevets. Ces revendications, toutes identiques, abordaient la création d'anticorps chimériques à portions Fc humaines dérivées d'IgG1 à IgG19. Comme aucune information publiée ne montre d'immunoglobuline au-delà d'IgG4, ces données posent clairement la question de la pertinence des données retrouvées dans les brevets. Nous avons souhaité en faire état pour épingle ce genre d'abus et tenter de le faire cesser. Cet article est un exemple des problèmes posés par le travail de recherche de contenu scientifique dans les brevets, dans lesquels l'information doit être intelligemment remise en question.

Unexplained Abuses of Human IgG Subclass Denomination in Antibody Patents

Jérémy Pottier · Hervé Watier

© Springer International Publishing Switzerland 2014

Patents possibly do (or do not) constitute a source of outstanding information for immunologists. For example, the use of pepsin to digest serum proteins without altering the antitoxin activity of antibodies was a breakthrough discovery by Ivan A. Parfentjev, only described in two patents (US2065196; US2123198) in the 1930s.

A recent patent database survey led us to identify 23 patent families (Table 1) filed on behalf of biopharmaceutical companies in the years 2008–2012, mentioning in their claims or in a particular embodiment of the specification the possibility of “creating chimaeric antibodies with human Fc regions derived from human IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5, IgG6, IgG7, IgG8, IgG9, IgG10, IgG11, IgG12, IgG13, IgG14, IgG15, IgG16, IgG17, IgG18 or IgG19”. Where do these 15 new IgGs (IgG5 to IgG19) come from? Do they derive from newly described segmental duplications in the *IGH* locus on chromosome 14? Humans would then become the species with the largest number of IgG-encoding genes, outperforming horses, which have only seven IgG subclasses [1]. This bewildering numbering

could also result from confusion of IgG subclasses with the IgG allotype numerical system. This hypothesis is, however, unlikely, since IgG allotype numbering is discontinuous, goes far beyond 19, and requires at least one “m” character between G and the number (Gm1 to Gm28) [2, 3].

Despite these patents now dating back several years, there are absolutely no published peer-reviewed data describing more than four IgG subclasses in humans, despite the immunoglobulin heavy constant (IGHC) gene copy number variations observed in healthy individuals with multigene duplications [4, 5]. It is really surprising to see that pending or granted patents refer to IgG subclasses arising from boundless imagination, with the likely goal of freely overextending commercial exclusivity. Why stop at 19 subclasses when one could claim 29 or many more? We do not know whether patent attorneys are now more astute, are now more visionary, or err on the side of caution; however, what is certain is that Köhler and Milstein’s institution lacked foresight when it decided not to protect their hybridoma technology.

J. Pottier · H. Watier (✉)
Université François-Rabelais de Tours, Tours, France
e-mail: watier@med.univ-tours.fr

J. Pottier · H. Watier
CNRS, UMR 7292, Tours, France

H. Watier
CHRU de Tours, Tours, France

Table 1 The 23 patents families where the abuses have been found

Patent family no.	Title	URL
WO2008144757	Novel rabbit antibody humanization methods and humanized rabbit antibodies	http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2008144757
WO2008144763	Antibodies to IL-6 and use thereof	http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2008144763
WO2008144753	Antibodies to TNF alpha and use thereof	http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2008144753
US2009104187	Novel rabbit antibody humanization methods and humanized rabbit antibodies	http://appf1.uspto.gov/netaagi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=20090104187.PGNR
US2009238825	Novel rabbit antibody humanization methods and humanized rabbit antibodies	http://appf1.uspto.gov/netaagi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=20090238825.PGNR
US2009297513	Antibodies to IL-6 and use thereof	http://appf1.uspto.gov/netaagi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=20090297513.PGNR
US2009297436	Antibodies to IL-6 and use thereof	http://appf1.uspto.gov/netaagi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=20090297436.PGNR
US2010129357	Antibodies to IL-6 and use thereof	http://appf1.uspto.gov/netaagi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=20100129357.PGNR
WO2010065079	Antagonists of IL-6 to prevent or treat cachexia, weakness, fatigue and/or fever	http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2010065079
US2010150829	Antibodies to IL-6 and use thereof	http://appf1.uspto.gov/netaagi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=20100150829.PGNR
WO2011066378	Antagonists of IL-6 to prevent or treat thrombosis	https://register.epo.org/application?number=EP10833914
US2011217303	Antagonists of IL-6 to prevent or treat cachexia, weakness, fatigue, and/or fever	http://appf1.uspto.gov/netaagi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=20110217303.PGNR
WO2011150454	Antibodies directed to the unprocessed receptor tyrosine kinase c-met	http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=EP&NR=2576622A1&KC=A1&FT=D
US2012121594	Anti-IL-6 antibodies for the treatment of arthritis	http://appf1.uspto.gov/netaagi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=20120121594.PGNR
US2012128626	Anti-IL-6 antibodies for the treatment of anemia	http://appf1.uspto.gov/netaagi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=20120128626.PGNR
WO2012075340	Anti-NGF compositions and use thereof	http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2012075340
US2012294797	Anti-CGRP compositions and use thereof	http://appf1.uspto.gov/netaagi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=20120294797.PGNR
US2012294802	Use of anti-CGRP antibodies and antibody fragments to prevent or inhibit photophobia or light aversion in subjects in need thereof, especially migraine sufferers	http://appf1.uspto.gov/netaagi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=20120294802.PGNR
US2012294822	Use of anti-CGRP or anti-CGRP-r antibodies or antibody fragments to treat or prevent chronic and acute forms of diarrhea	http://appf1.uspto.gov/netaagi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=20120294822.PGNR
WO2012161956	High-purity production of multi-subunit proteins such as antibodies in transformed microbes such as <i>Pichia pastoris</i>	http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2012161956
US2013045888	Multi-copy strategy for high-titer and high-purity production of multi-subunit proteins such as antibodies in transformed microbes such as <i>Pichia pastoris</i>	http://appf1.uspto.gov/netaagi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=20130045888.PGNR
US2013058949	Antagonists of IL-6 to prevent or treat thrombosis	http://appf1.uspto.gov/netaagi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=20130058949.PGNR
US2013101598	Antagonists of IL-6 to prevent or treat thrombosis	http://appf1.uspto.gov/netaagi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=20130101598.PGNR

Acknowledgments and Disclosures This work was supported by the French Higher Education and Research Ministry under the program “Investissements d’Avenir” grant agreement: LabEx MAbImprove ANR-10-LABX-53-01. It was also part of the MAbMapping®/technological intelligence platform of the University François-Rabelais of Tours. MAbMapping is co-financed by the European Union. Europe is committed to the region’s Centre with the European Regional Development Fund. We thank Lukas Völlmy and Angélique Dacheux for their helpful comments. The authors declare no competing financial interests that are directly relevant to the content of this article.

Author contributions Jérémy Pottier conducted the patent survey; Jérémy Pottier and Hervé Watier wrote the paper.

References

1. Wagner B, Miller DC, Lear TL, Antczak DF. The complete map of the Ig heavy chain constant gene region reveals evidence for seven IgG isotypes and for IgD in the horse. *J Immunol.* 2004;173:3230–42.
2. Jefferis R, Lefranc M. Human immunoglobulin allotypes: possible implications for immunogenicity. *mAbs.* 2009;1(4):332–8.
3. Lefranc MP, Lefranc G. Human Gm, Km, and Am allotypes and their molecular characterization: a remarkable demonstration of polymorphism. *Methods Mol Biol.* 2012;882:635–80.
4. IMGT®, the international ImMunoGenetics information system®. <http://www.imgt.org>. IMGT Repertoire (IG and TR) > Locus and genes > Locus representations > IGH: Human.
5. Lefranc MP, Lefranc G. The immunoglobulin facts book. New York: Academic Press; 2001. p. 46–7.

IV-Article 3 : *Rethinking the INN system for therapeutic antibodies*

Les dénominations communes internationales des anticorps thérapeutiques sont depuis la dernière réforme de 2014 très discutées et critiquées³⁵⁹, en raison des incohérences et des résultats inattendus dans la composition des noms. Dans le cadre de cette thèse, nous avons identifié dans les brevets de nombreux variants Fc, caractérisant l'importance des propriétés pharmacologiques liées à cette portion dans le développement d'un anticorps thérapeutique. La différence de comportement entre des molécules avec ou sans Fc, en lien avec ces propriétés pharmacologiques, nous fait penser qu'il devient indispensable de faire apparaître sa présence par un radical dans les DCI plutôt que des radicaux en lien avec un degré d'humanisation qui ne corrèle en rien avec l'immunogénicité, ou avec le type de cible, ce qui est à peu d'utilité et peut même ajouter de la confusion. De plus, même avant l'apparition des variants Fc, rien n'était prévu pour distinguer un Fab d'une IgG entière, ou encore une IgG1 d'une IgG4, alors que leur comportement est très différent.

Aujourd'hui, 18 molécules commercialisées sont modifiées dans la portion Fc de l'IgG, et il semble ainsi nécessaire de rendre plus facile le repérage par les professionnels de santé d'effets qui seraient liés à des variants identiques. Indiquer dans la DCI qu'un anticorps contient une modification de la portion Fc semble à vrai dire impossible, car trop complexe. La meilleure solution nous semble de créer une nouvelle nomenclature de ces variants Fc et de renseigner celle-ci dans tous les documents mis à la disposition des praticiens. Une nomenclature plus précise a longtemps été envisagée (différente de la numérotation complexe d'IMGT retrouvée dans les bulletins DCI) décrivant précisément les modifications présentes dans la molécule, mais cette idée a été abandonnée, l'idée de base étant de faciliter la caractérisation des variants Fc et non le contraire. Une nomenclature plus simple est donc envisagée dans cet article, calquant le modèle des allotypes et prenant ainsi une forme de dénomination similaire en « G1e1 », par exemple pour le premier variant d'IgG1.

Notre article se veut ainsi force de proposition pour instituer un système revenant aux fondamentaux du système des DCI, c'est-à-dire informer les professionnels de santé et faciliter la compréhension de la molécule par ces acteurs et les patients. De plus, cet article décrit une nomenclature pour les modifications dans les domaines constants des immunoglobulines qui permettraient de comprendre plus rapidement la similitude des molécules, et ainsi déceler plus facilement des effets secondaires potentiels.

PERSPECTIVE

 OPEN ACCESS

Rethinking the INN system for therapeutic antibodies

Jérémy Pottier^{a,b,*}, Romane Chastang^{a,b,*}, Christophe Dumet^{a,b}, and Hervé Watier^{a,b,c}

^aUniversité François Rabelais, Tours, France; ^bUMR 7292, Tours, France; ^cCHRU de Tours, Service d'immunologie, Tours, France

ABSTRACT

In the context of a possible revision of the International Nonproprietary Names (INN) system of recombinant monoclonal antibodies, which is saturated, we propose several avenues of reflection driven by the primary goal of the INN, information of health-care professionals. Clinical considerations argue for an abandon of the subystems A (target category) and B (origin category), which lengthen the INN without real added-value. On the contrary, new subystems or suffixes are required to alert on the absence/presence of an Fc portion and/or multispecificity, which are essential from a pharmacological point of view. Moreover, we think it necessary to explicitly mention Fc variations since they could influence the pharmacology of these biopharmaceuticals, and hence their efficacy and side-effects. Besides indicating the subclass/isotype in the documents easily accessible to health care professionals, we propose to systematically describe both the natural variations (allotypes) by using the Gm (G marker) system, and the artificial variations by using a Ge (G engineering) system that is discussed here and could apply to all IgG constant domains (tentatively called the Fy portion).

ARTICLE HISTORY

Received 27 October 2016
Accepted 28 October 2016

KEYWORDS

Allotypes; bispecific; Fc portion; IgG; INN; International Nonproprietary Name; monoclonal antibody; pharmacokinetics; recombinant; variants

Introduction

As previously described in *mAbs*, a debate is in progress regarding whether the nomenclature of therapeutic antibodies would be based henceforth – or not – on the percentage of nucleotide sequence identity between the genomic DNA encoding the variable regions of a given antibody and the closest human variable gene sequence in the international ImMunoGeneTics information system[®] (IMGT[®]) database.¹ The International Nonproprietary Names (INN) are assigned by the World Health Organization (WHO) and, up to now, for monoclonal antibodies that have been more or less humanized (hereafter called “recombinant antibodies” for simplification), WHO has distinguished chimeric (-xi-), humanized (-zu-) and fully human (-(m)u-) antibodies,² based on the genetic origin of the variable domains of the antibody. This nomenclature, currently incorporated in the penultimate syllable of the INN, is therefore very emblematic of the antibody humanization history, which is tightly associated with the extraordinary current clinical success of this class of biopharmaceuticals.³ Our objective is not to come back to the very relevant arguments that have been developed,¹ nor to discuss them, but to go really further in the debate. Indeed, Jones *et al.*¹ pointed out that an overhaul of the INN system is required. They notably brought the idea that a single substem could encompass all engineered antibodies (-sy- for “synthetic” or -e- for “engineered” for example) and that a new INN system should serve the needs of researchers as well as healthcare professionals. This is at the heart of the debate, and our aim here is to offer new and possibly provocative ideas to achieve this goal.

The xi/zu/u categorization in view of the real purpose of the INN system

As recommended by the Third Health Assembly in 1950, the primary purpose of non-proprietary names for drugs should be the information of health care professionals. Physicians and pharmacists have to find in the INN suitable information about the drug in order to “avoid the difficulties arising from a multiplicity of names for the same medicinal substance” and to treat patients with safety and caution.⁴

This is the reason why the INN should not be the indication of a fabrication process. From this point of view, the xi/zu/u categorization could be viewed as an exception, as it refers to a drug design procedure, although it is not strictly a manufacturing process. At that time, a greater degree of antibody humanization was also very strongly associated with the hope of lower immunogenicity and a better clinical tolerance, as compared to murine monoclonal antibodies. In this respect, it could have been viewed as important information for health care professionals, justifying its presence in the INN.

With distance and hindsight, more and more specialists recognize that the degree of humanization of the variable domains (the current basis for xi/zu/u categorization) is not correlated to immunogenicity, and this vision is not really new.⁵ Indeed, anti-drug antibodies (ADA) are mostly directed against the idiotype, even for chimeric antibodies.⁶ Even in “fully” human antibodies, the idiotype is always antigenic by nature, based on the fact that it is not germline-encoded (especially the CDR3) and that it does not belong to the immunological self. Although humanization of the variable domain could decrease the

CONTACT Hervé Watier  herve.watier@univ-tours.fr

*These authors equally contributed to this work.

number of T-cell epitopes and contribute to a reduction of idio-type immunogenicity, there is mounting evidence that factors other than the degree of humanization play a more important role in the induction of ADA in clinic, such as antibody aggregates⁷ and immune complexes.⁸ Nevertheless, the dosing schedule and the exposition to the therapeutic antibody (circulating concentrations) are probably the most determining factors associated with immunogenicity in clinical practice, which is an adverse effect paradoxically inversely related to the dose.⁹ The fact that murine IgG do not bind to the human neonatal receptor (FcRn) was directly responsible for their poor pharmacokinetic profile, a factor that has very likely contributed to their high immunogenicity.¹⁰ Although caution is still advised during clinical trials, immunogenicity has become a very peripheral problem for most approved antibodies, since all recombinant IgG antibodies, independently of the xi/zu/u categorization, have a human Fc optimal for binding to FcRn. The xi/zu/u categorization has therefore no real clinical interest, and maintaining it only provides an unfounded basis easily diverted for marketing purposes. It could also incorrectly reassure health care professionals about the safety of “human” antibodies. We therefore strongly suggest abandonment of this categorization.

The labyrinth of substem A

Besides the penultimate syllable (substem B, e.g., o/xi/zu/u), the antepenultimate one (substem A), indicating the target,² is another source of confusion for health care professionals. Essentially, it is a rather good idea. For example, the antibodies indicated in cancer can be divided into molecules targeting tumor cells (-tu(m)- substem: rituximab, trastuzumab, panitumumab, dinutuximab, daratumumab, etc.), and those targeting the microenvironment, themselves divided into antibodies targeting angiogenesis and circulation (-ci(r)- substem: bevacizumab, ramucirumab), bone and osteogenesis (-os- substem: denosumab), and lymphocytes (-li- substem: ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab, etc.). In terms of pharmacodynamics and possible adverse effects, this distinction appears relevant. This corresponds more or less to (1) passive anti-tumor immunotherapy (-tu(m)-) whose adverse effects are due to antigen expression in non-cancer tissues; (2) active and non-specific anti-tumor immunotherapy by immune checkpoint inhibitors (-li-), whose adverse effects are due to awakening of autoimmune and inflammatory T cells; and (3) therapeutic modalities that can be hardly defined as immunotherapy (-ci(r)-, -os-) and whose adverse effect are systemic or metabolic (hypertension, hypocalcemia, etc.). However, there are limitations and exceptions. Siltuximab, an anti-interleukin-6 antibody indicated in Castleman's disease has the -tu- radical although it targets an autocrine growth factor/cytokine and not the proliferating B cells, which, moreover, are not considered malignant! Moreover, a single -tu- radical has been attributed to bispecific antibodies (catumaxomab, blinatumomab), although they also target CD3+ T cells. It will be interesting to see which substem will be attributed to MABp1 (XilonixTM), an anti-IL-1 β antibody for treating colorectal cancer, already undergoing review by the European Medicines Agency.

If we now consider one given targeting entity, *i.e.*, antibodies targeting the immune system, they can be divided into

“lymphocyte” targeting (-li- substem, such as ipilimumab or natalizumab) and cytokine targeting (-kin-, such as canakinumab). Logically, antibodies that are cytokine receptor antagonists are -li- (basiliximab, tocilizumab). However this is in fact more complex since -li- is employed for antibodies targeting tumor necrosis factor (TNF)- α , which is usually considered a cytokine, and for soluble proteins that are produced by lymphocytes (such as IgE for omalizumab) or not (such as eculizumab for complement C5). Moreover, when antibodies targeting lymphocytes are first developed for malignant lymphoproliferative diseases and secondarily obtain an approval in a non-cancer indication, they keep their -tu- substem (rituximab, alemtuzumab). This is why some anti-CD20 antibodies are -tu- (rituximab, ofatumumab, obinutuzumab) while others are -li- (ocrelizumab). For autoimmune patients being treated by rituximab, receiving such a drug could suggest that he/she suffers from a cancer. Overall, the INN nomenclature for antibodies targeting the immune system is not only complex and of little use for health care professionals, it could be also misleading from a pharmacological point of view. Indeed, most of these antibodies (most of the -li-, all the -kin- and -tu-) are immunosuppressive: they are indicated in autoimmune and inflammatory diseases, with an increased risk of infections and possibly cancers. In contrast, immune checkpoint inhibitors are immunostimulatory and they are indicated in cancer, with an increased risk of inflammatory and autoimmune manifestations, yet they are designated -li-!

Other illogicalities and sources of misinterpretations can be noted. The radical -c(i)- is a common denominator to bevacizumab (anti-VEGF) indicated in cancer and to evolocumab and alirocumab (anti-PCSK9), which are indicated in familial hypercholesterolemia. Conversely, a mysterious “-ibi-” radical had been attributed to ranibizumab because it inhibits angiogenesis, exactly like bevacizumab, which derives from the same murine monoclonal antibody as ranibizumab.¹¹ It is therefore illusory to establish a nomenclature system on such indistinct categories that evolve over time and could be inaccurate if the indications evolve. Here again, we thus recommend abandoning the current nomenclature concerning the antepenultimate syllable (substem A).

At the crossroad!

Abandoning the current xi/zu/u (substem B, penultimate location, origin category) and tu/li/ci/kin/etc. (substem A, antepenultimate location, targeting category) syllables is an opportunity to shorten the current antibodies INN. Indeed, the names tend to be too long (average 11 letters, extreme 14 letters for brontictuzumab, and average 4.5 syllables, extreme 6 syllables for dapirolizumab or duligotuzumab), being longer than those of other biological and chemical products. The growing number of antibodies is directly responsible for the increase of their length.¹² Besides the difficulties in learning such long terms, the risk of similarities between different antibody INNs is a major risk for clinical practice. Look-alike and sound-alike drug names may be responsible for as many as one in 4 error reports received by surveillance programs.¹³ For examples, the similarities in the INNs imcirimomab and imciromab, monalizumab and motavizumab, sapelizumab and siplizumab, or

tocilizumab and toralizumab, are apparent. It is thus time to desaturate the INN system. Such a need is also an excellent opportunity to start afresh and to entirely rethink the entire antibody nomenclature, taking into account the clinical experience.

Antigen binding dominates Fc functions?

For decades, antibodies have been named after the fact they recognize a specific antigen. As a consequence, antibody fragments (e.g., abciximab, ranibizumab for antigen-binding fragments (Fabs), pexelizumab for single-chain variable fragments (scFv)) and even camelid VHH (single domain antibodies; e.g. caplacizumab) are considered antibodies, and there is no reason to modify this consensual position. However, in the common sense, an antibody of the IgG class is a Y-shaped molecule, bivalent, monospecific, and has a long half-life, prone to prolonged prophylaxis.³ Bivalency (most full-length IgG) vs monovalency (fragments) could be important properties to consider from a pharmacological point of view, but are of far lesser importance than the human Fc portion, which is central for prolonging the plasmatic half-life and spacing the infusions/injections. In case of adverse effects, such as risks of bleeding that could be life-threatening, distinguishing an antibody with or without a human Fc is of utmost importance to evaluate the time required to perform surgery securely. When an INN was attributed to a pegylated Fab, it was indeed considered necessary to mention the PEG presence in the INN, notably to alert health care professionals of the longer half-life. The prefix peg- (as in pegsunercept or peginterferon) was probably avoided because it lengthened the INN name, and it was decided to add “pegol” as a second name (certolizumab pegol).

The same type of reasoning has just started for Fc-fusion biopharmaceuticals. In the case of coagulation factors (-cog), they have now an “ef-” prefix when they are fused to a human IgG Fc (e.g., efmoroctocog alfa, eftrenonacog alfa).¹⁴⁻¹⁶ But this was not the case for other biopharmaceuticals: lenercept (soluble TNF-RI-Fc) was not clearly distinguished from onercept (soluble TNF-RI), dulaglutide (GLP-1 peptide agonist fused to Fc) does not appear different from exenatide (a simple GLP-1 peptide agonist), and romiplostim (peptibody, with an Fc) is not differentiated from other colony stimulating factors without any Fc portion. In contrast to coagulation factors, nothing in the INN of these biopharmaceuticals would alert health care professionals to a different pharmacokinetic profile. Similarly, full-length IgG still remain indistinguishable from fragments. As a consequence, ophthalmologists did not perceive a major difference between bevacizumab (IgG) and ranibizumab (IgG Fab), and used bevacizumab instead of ranibizumab for economic reasons in age-related macular degeneration. Fortunately, no systemic adverse event was noted,¹⁷ although bevacizumab can cross the hemo-retinal barrier while ranibizumab cannot.

Adding the “ef-” prefix to any new biopharmaceutical comprising a human IgG Fc, like the “alb” prefix for peptides or proteins fused to albumin in order to exploit the FcRn rescue system (e.g., albiglutide or albutrepenonacog alfa) or the “peg” prefix for pegylated proteins, has the main drawback of lengthening the INNs. Following the same reasoning as for

pegylation, use of second name could be imagined. Fc is not so easy to phonetically translate into a name, but it could be “efcil” (the letter L being added for esthetic reasons and in reference to the L letter of pegol). Similarly, in case of fusion with albumin for the same purpose, “albal,” “albol” or “albul” could be added. However, it must be decided whether the use of a second word should be restricted to chemical conjugation, as in the case of chemically conjugated antibodies (certolizumab pegol, ibritumomab tiuxetan, brentuximab vedotin, etc.), and the use of a prefix to genetically-fused proteins. Indeed, instability of the conjugate could be a clinical issue, while considering storage/handling of the product and fate in the organism. In this case, “pegol” should be preferred to the “peg-” prefix whereas “ef-” and “alb-” should then be used for fusion proteins.

Coming back to an antibody, it seems ridiculous to add the “ef-” prefix to all full-length IgG, even if it can be viewed as an antigen-binding protein fused with an Fc. Full-length IgG being the standard for therapeutic applications and our own antibodies having an Fc, we are of the opinion that the presence of an Fc does not need to be mentioned in the INN (Fc would be present by default), but this means that the absence of an Fc should be clearly mentioned!

To tackle an emblem!

To resolve the problem that some -mab have an Fc while others do not, the solution we propose is nothing less than abandoning the -mab suffix for recombinant antibodies! We are perfectly aware that we tackle an emblem, which is also the title of this journal, and which has led to a certain Mab-mania that we have also exploited.¹⁸ There is no reason to be worried about such a radical step, because a sufficient number of “-mab” are already attributed to allow keeping “mab” as a flagship for the antibody community, even if future INNs attributed to monoclonal antibodies are not stamped “-mab.” As Mab starts with a consonant, it necessarily forms a syllable, automatically lengthening the INN name and preventing the use of other consonants in association with the suffix -ab (referring both to “Ab,” the historical antibody abbreviation, and also to “antigen binding” like in Fab), which must be absolutely preserved. Moreover, future antibody products will be perfectly well-defined (glyco)-proteins, produced by a clone of genetically-modified factory cells, far from the historical hybridoma! All of them will be monoclonal by essence, rendering its mention in the INN unnecessary.

New suffixes

Knowing that health care professionals must know whether an Fc is present or not, or whether the antibody targets one, 2 or more antigens, the suffixes we propose to use would be:

- rab for recombinant full-length monospecific IgGs;
- frab for fragments of recombinant IgG, without an Fc;
- birab or -bifrab (“-bi-” substem) in case of bispecificity;
- tirab or -tifrab (“-ti-” substem) in case of multispecificity (more than 2);

Substems -axo, -a, -o and -e could be kept in case of variable and constant regions of animal origin, with the -mab suffix. Bispecificity of antibodies derived from heterohybridomas,

such as catumaxomab, is already suggested by the x within -axo-, rendering the use of the “-bi-” substem unnecessary. In the case of recombinant antibody fragments of animal origin without any human constant region, we propose to use the animal substems with the new suffixes. With this new nomenclature, blinatumomab (CD19 scFv x CD3 scFv) would have been blinatobifrab. A more radical alternative could be to simplify the system, by using a single substem such as “-(a)ni(m)-” indicating the complete animal origin of antibodies.

In the case of antibody cocktails, the problem is more complex, even if we restrict it to cocktails of monospecific antibodies. Indeed, it could be a combination of antibodies targeting different epitopes of the same antigen (monospecificity), or antibodies targeting different antigens (multispecificity). The suffix could be simply -cab or -kab (cocktail of antibodies), but it then becomes difficult to note whether they are fragments or not. The suffixes -corab and -cofrab would be better, and more appropriate when antibodies are targeting the same antigen. In case of multiple specificity, we fear it is necessary to add a syllable, giving -bikorab, -bicofrab, -ticorab, -ticrofab. Of course, bispecificity in the case of a cocktail is different from bispecificity of a single molecule, but we think we can use the same substem.

Going deeper in Fc engineering and pharmacology?

Besides binding FcRn, another important Fc-associated function is the ability to recruit immune effector mechanisms, to activate immune functions and to kill target cells. This is highly dependent on the human IgG subclass, since IgG1 are or could be cytotoxic and depleting, and proinflammatory, whereas IgG2 and IgG4 usually are not. It is important for health care professionals to know whether an antibody therapeutic might activate the immune system or kill cells, particularly to interpret adverse events (cytopenias, etc.). The subclass, which depends on the heavy chain isotype, is indicated in the Lists of Recommended and Proposed INNs and is usually reported in documents easily accessible to health care professionals as the Physicians' Desk Reference or the Summary of Product Characteristics. Therefore, we do not think it is necessary to add this component to the INN.

Mentioning the IgG subclass is not sufficient, however, because IgG constant domains are subjected to natural variations (genetic polymorphisms) called allotypes, which could modify their functions.^{19–22} Because of their potential clinical impact, it would therefore be important to have a clear and easily description of the allotype used. The Gm (for IgG genetic

marker) international nomenclature (with Arabic numbers) appear to be the more consensual, although it is based on allotypes antigenicity, and does not integrate iso-allotypes (unless they are opposite to a Gm marker and could be called Gm-(minus)).²³ This nomenclature should be updated to integrate all the polymorphic variants, whatever their supposed antigenicity, and the Gm markers (as well as the Km markers for the light chain) should be systematically mentioned in the INN bulletin, as well as in documents accessible to health care professionals.

Since 1987,²⁴ substantial efforts have been made to modulate IgG properties through Fc engineering (peptide engineering, glycoengineering, etc.). Emphasis had initially been placed on reducing effector functions and prevention of cell depletion and/or adverse effects, but Fc engineering was also developed to increase IgG stability, to potentiate effector mechanisms, to precisely tune the different effector functions, to improve FcRn binding and extend IgG half-life, etc. More generally, exactly what comprises an Fc needs to be better defined for biopharmaceuticals. The historical definition (crystallizable fragment after papain cleavage of IgG) has the disadvantage of giving different N-terminal endings depending on the subclass. It is therefore simpler to include the entire hinge region within the Fc, when considering Fc engineering.²⁵ With this definition, 15 approved antibody-based therapeutics harbor Fc variations (Table 1 and 2). Beyond the Fc, protein engineering in the constant regions of the Fab has already been envisioned to modify interchain disulfide bridges and increase IgG stability,^{26,27} and even to improve FcRn binding.^{21,28} In the future, it will probably be necessary to consider all the constant regions of an IgG, which could be named the Fy (in reference to its Y-shape) (Fig. 1).

Fc/Fy variations can have pharmacological consequences and clinical impact. For example, obinutuzumab has been glycoengineered to increase its binding to FcγRIIIA (and FcγRIIIB), and this modification could explain the higher number of cytokine release syndromes and chronic neutropenias, in comparison to rituximab.²⁹ Furthermore, mydriasis and impaired accommodation has been more frequently observed in patients with neuroblastoma receiving the anti-GD2 hu14.18K322A antibody than in patients receiving dinutuximab, an anti-GD2 IgG1 antibody.³⁰ The fact that these effects could be related to the K322A mutation in IgG1 has not been considered nor discussed, but is possible. We can also imagine that identical adverse effects could be observed for 2 completely different antibodies, directed against very different antigens and administered to patients with completely different diseases,

Table 1. IgG1 modified Fc-based biopharmaceuticals, classified by year of first approval, with allotypes, Fc variations and correspondence with the proposed G1e numbering.

International non-proprietary names	First approval year (US, EU or Japan)	Allotype	Fc variations (Eu)	Numbering
abatacept	2005	G1m1 (lacks Fab)	C220S C226S C229S P238S substitutions	G1e1
romiplostim	2008	G1m1 (lacks Fab)	Production in <i>E.coli</i> (aglycosylation)	G1e2
belatacept	2011	G1m1 (lacks Fab)	C220S C226S C229S P238S substitutions	G1e1
afibercept	2011	G1m1 (lacks Fab)	Deletion of the 5 first amino-acids of hinge region	G1e3
mogamulizumab	2012	G1m17,1	Afucosylation	G1e4
obinutuzumab	2013	G1m17,1	Addition of a bisecting GlcNAc	G1e5
vedolizumab	2014	G1m17,1	L235A and G237A substitutions	G1e6
efmoroctocog α	2014	G1m1 (lacks Fab)	Deletion of the 5 first amino-acids of hinge region	G1e3
eftrenonacog α	2014	G1m1 (lacks Fab)	Deletion of the 5 first amino-acids of hinge region	G1e3
atezolizumab	2016	G1m17,-1	N297A substitution	G1e7

Table 2. IgG4 modified Fc-based biopharmaceuticals, classified by year of first approval, with allotypes, Fc variations and correspondence with the proposed G4e numbering.

International non-proprietary name	First approval year	Allotypes	Fc variations (Eu)	Numbering
gemtuzumab ozogamicin	2000 [#]	—	S228P substitution	G4e1
eculizumab [*]	2007	L309 / R409	Hybrid IgG2 (before T260) / IgG4 (after)	G2e1 and G4e2
dulaglutide	2014	L309 / R409	S228P F234A, L235A substitutions and removal of K447	G4e2
pembrolizumab	2014	L309 / R409	S228P substitution	G4e1
nivolumab	2014	L309 / R409	S228P substitution	G4e1
ixekizumab	2016	L309 / R409	S228P substitution and removal of K447	G4e3

-, No sequence available.

^{*}Eculizumab is a hybrid between IgG2 and IgG4. No other IgG2 has been approved with Fc modification.

[#],withdrawn or marketing discontinued for the first approved indication.

because these events originate from the same Fc variation. If health care professionals do not have direct access to information about the IgG Fc/Fy variants, it is likely that the connection will not be made quickly enough.

Due to the clinical impact of Fc/Fy variations, their presence should be explicitly mentioned under an international nomenclature that does not exist yet. The INN bulletins and the IMGT mAb-DB mention all the peptide variations, as well as the variations of glycosylation, but the format is not convenient. First of all, the variations are listed under the IMGT nomenclature, which is very useful for the variable regions, but is not practical at all for constant domains because it restarts at 1 for each region or domain. Moreover, it is far less used than the old Eu nomenclature.³¹ Secondly, for complex mutations such as those of emicizumab,³² the description under the IMGT nomenclature is tedious and difficult for health care professionals. Artificial variations can be extremely complex, giving rise to molecules with many modified amino-acids, a modified glycosylation pattern or even entire domains

substitutions. A combination of those 3 types of modification is even conceivable; it is therefore very difficult to systematize an appropriate nomenclature.

Use a single substem for all engineered antibodies (-sy- for “synthetic” or -e- for “engineered” for example) was suggested by Jones *et al.*¹ This suggestion probably relates mostly to variable domains and implies an integration in the INN, but it would be too complex and would not indicate which antibody portion is engineered, or the kind of variation. We rather think that the artificial Fc variants, and more generally variants in constant domains (Fy), could be indicated by a nomenclature system similar but different from the natural variant/allotypes system, permitting, for example, easy identification of the cause of some adverse events for molecules that have nothing in common except their constant region mutations. The substem -e- proposed by Jones *et al.*¹ could be integrated in a Ge system, besides the Gm system. For IgG1, there would be the G1m and the G1e systems, for IgG2, G2m and G2e, for IgG4, G4m and G4e. If the constant domain of the κ light chain is subjected to

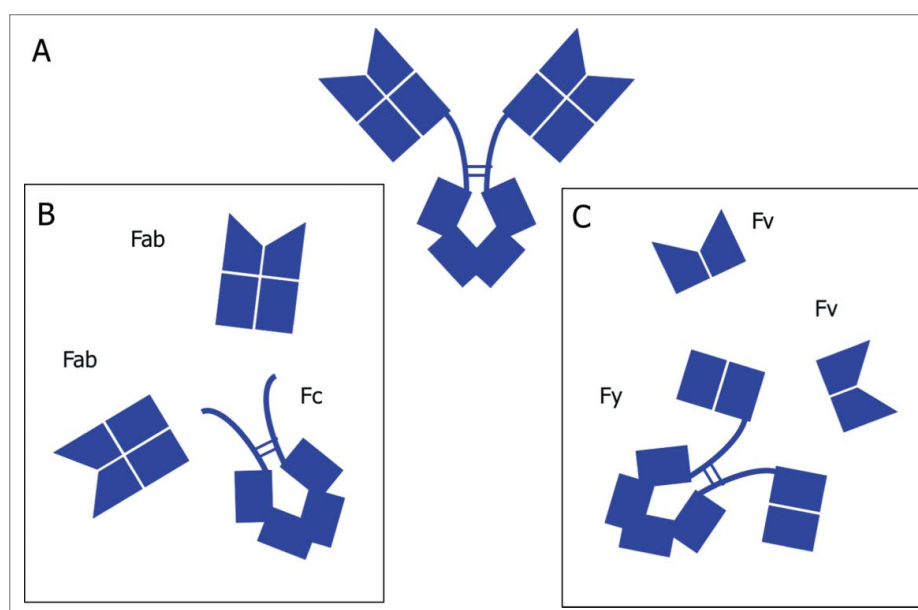


Figure 1. Designation of antibody fragments. (A) Schematic representation of a full-length IgG; (B) Papain digestion of an IgG generates 2 Fab fragments (antigen binding) and one Fc (crystallizable), but the precise cleavage site could vary from one IgG subclass to another. We have therefore to include the entire hinge region in the definition of Fc.²⁵ (C) The fragment containing VH and VL was called Fv in 1972³³ and was popularized when it was possible to produce it as a single chain (scFv). However, a name has never been attributed to the remaining part of the IgG, containing the whole constant domains (CH1-CL and Hinge-CH2-CH3). This portion of the IgG is subjected to natural variations (allotypes) and is engineered for therapeutic purposes. Because it is encoded by the genes determining the heavy and light chain isotypes, it could be logical to name “Fi” (for isotype), but the “i” letter would be hard to read and poorly understandable. We rather propose to name it “Fy,” in relation to its Y-shaped configuration.

engineering, there would be a Ke system. Our system would be very pragmatic, attributing a new number to each newly approved antibody whose constant regions have been subjected to engineering. In case an antibody is a chimera between 2 subclasses, like IgG2/4 eculizumab, it will have a double nomenclature (G2e and G4e). Because 15 engineered IgG-based therapeutics are already on the market, we propose the following numbering (Table 1 and 2), based on the date of first approval in the world.

Conclusion

We are aware that our proposals are radical and that they will unsettle habits and consciences, but they fit better to the fundamental guidelines promulgated by WHO, and will therefore be far more useful for professionals and for the key stakeholders, *i.e.*, patients. Obviously our proposals must be discussed and debated with all the stakeholders in the antibody research and development field, but we hope that our proposals will promptly lead to a broad consensus. With the increasing number of antibodies approved every year, these new standards should be assimilated quickly.

Acknowledgments and disclosures

This work was supported by the French Higher Education and Research Ministry under the program “Investissements d’Avenir” grant agreement: LabEx MAbImprove ANR-10-LABX-53-01. We thank Dr. Paul Parren and Dr. Alain Beck for their helpful comments.

The authors declare no competing financial interests that are directly relevant to the content of this article.

References

- Jones TD, Carter PJ, Plückthun A, Vásquez M, Holgate RGE, Hötzel I, Popplewell AG, Parren PWHI, Enzelberger M, Rademaker HJ, et al. The INNs and outs of antibody nonproprietary names. *MAbs* 2016; 8:1-9; PMID:26716992; <http://dx.doi.org/10.1080/19420862.2015.1114320>
- World Health Organization. General policies for monoclonal antibodies. 2009; <http://www.who.int/medicines/services/inn/Generalpoliciesformonoclonalantibodies2009.pdf>
- Watier H, Reichert J. Evolution of antibody therapeutics (Chapter 2). In: Jallal B, Vaughan T, Osbur J, eds Protein Therapeutics. Wiley, 2016 in press
- World Health Organization. Expert Committee of the Unification of Pharmacopoeias. Report on the Sixth Session. 1950; http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/38948/1/WHO_TRS_29.pdf
- Clark M. Antibody humanization: a case of the “Emperor’s new clothes”? *Immunol Today* 2000; 21:397–402; PMID:10916143; [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01680-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01680-7)
- Van Schie KA, Hart MH, de Groot ER, Kruithof S, Aarden LA, Wolbink GJ, Rispen T. The antibody response against human and chimeric anti-TNF therapeutic antibodies primarily targets the TNF binding region. *Ann Rheum Dis* 2015; 74:311–4; PMID:25342759; <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206237>
- Ratanji KD, Derrick JP, Dearman RJ, Kimber I. Immunogenicity of therapeutic proteins: influence of aggregation. *J Immunotoxicol* 2013; 11:99-109; PMID:23919460; <http://dx.doi.org/10.3109/1547691X.2013.821564>
- Krishna M, Nadler SG. Immunogenicity to Biotherapeutics - The role of anti-drug immune complexes. *Front Immunol* 2016; 7:21; PMID:26870037; <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2016.00021>
- Chaigne B, Watier H. Monoclonal antibodies in excess: A simple way to avoid immunogenicity in patients? *J Allergy Clin Immunol* 2015; 136:814-6; PMID:25930194; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.03.013>
- Ober RJ, Radu CG, Ghetie V, Ward ES. Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *Int Immunol* 2001; 13:1551-9; PMID:11717196; <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/13.12.1551>
- Magdelaine-Beuzelin C, Kaas Q, Wehbi V, Ohresser M, Jefferis R, Lefranc M-P, Watier H. Structure-function relationships of the variable domains of monoclonal antibodies approved for cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 64:210-25; PMID:17624800; <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.04.011>
- World Health Organization. WHO Drug Information 2009; 23:195-9. <http://www.who.int/medicines/publications/druginformation/issues/DrugInfo09vol23-2.pdf>
- Sally Pepper, Malan S, Mignot G, Mattavelli RB. WHO Programme on International Nonproprietary Names (INN). Work Doc 15381 2015:29-34
- World Health Organization. 62nd Consultation on International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances. 2016; http://www.who.int/medicines/services/inn/62nd_Executive_Summary.pdf?ua=1
- World Health Organization. International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review). 2016; <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioReview2016.pdf>
- World Health Organization. 56th Consultation on International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances. 2013; http://www.who.int/medicines/services/inn/56th_Executive_Summary.pdf
- Thulliez M, Angoulvant D, Le Lez ML, Jonville-Bera A-P, Pisella P-J, Gueyffier F, Bejan-Angoulvant T. Cardiovascular events and bleeding risk associated with intravitreal antivascular endothelial growth factor monoclonal antibodies: systematic review and meta-analysis. *JAMA Ophthalmol* 2014; 132:1317-26; PMID:25058694; <http://dx.doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2014.2333>
- Pèlerin A, Daguet A, Watier H. MAbImprove: a French “Laboratoire d’excellence” (LabEx) dedicated to therapeutic antibodies. *MAbs* 2014; 6:803-4; <http://dx.doi.org/10.4161/mabs.29262>
- Pandey JP, Namboodiri AM. Genetic variants of IgG1 antibodies and FcγRIIIa receptors influence the magnitude of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against prostate cancer cells. *Oncimmunology* 2014; 3:e27317; PMID:24701371; <http://dx.doi.org/10.4161/onci.27317>
- Vidarsson G, Dekkers G, Rispen T. IgG Subclasses and Allotypes: From structure to effector functions. *Front Immunol* 2014; 5:1-17; <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>
- Ternant D, Arnoult C, Pugnère M, Dhommée C, Drocourt D, Perouzel E, Passot C, Baroukh N, Mulleman D, Tiraby G, et al. IgG1 Allotypes Influence the Pharmacokinetics of Therapeutic Monoclonal Antibodies through FcRn Binding. *J Immunol* 2016; 196:607-13; PMID:26685205; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1501780>
- Stapleton NM, Andersen JT, Stemmerding AM, Bjarnarson SP, Verheul RC, Gerritsen J, Zhao Y, Kleijer M, Sandlie I, de Haas M, et al. Competition for FcRn-mediated transport gives rise to short half-life of human IgG3 and offers therapeutic potential. *Nat Commun* 2011; 2:599; PMID:22186895; <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1608>
- Jefferis R, Lefranc M. Human immunoglobulin allotypes: possible implications for immunogenicity. *MAbs* 2009; 1:332-8; PMID:20073133; <http://dx.doi.org/10.4161/mabs.1.4.9122>
- Winter GP, Duncan AR, Burton DR. Altered antibodies. 1987
- Pottier J, Watier H, Gouilleux-Gruart V. Modifications in the IgG4 Fc portion of therapeutics in patents: opportunities for a twisting IgG subclass. Submitted 2016
- White AL, Chan HTC, French RR, Willoughby J, Mockridge CI, Roghanian A, Penfold CA, Booth SG, Dodhy A, Polak ME, et al. conformation of the human immunoglobulin G2 hinge imparts superagonistic properties to immunostimulatory anticancer antibodies. *Cancer Cell* 2015; 27:138-48; PMID:25500122; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.001>
- Dillon TM, Ricci MS, Vezina C, Flynn GC, Liu YD, Rehder DS, Plant M, Henkle B, Li Y, Deechongkit S, et al. Structural and functional characterization of disulfide isoforms of the human IgG2 subclass. *J Biol Chem* 2008; 283:16206-15; PMID:18339626; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M709988200>
- Monnet C, Jorieux S, Urbain R, Fournier N, Bouayadi K, De Romeuf C, Behrens CK, Fontayne A, Mondon P. Selection of IgG variants with increased FcRn binding using random and directed mutagenesis:

- impact on effector functions. *Front Immunol* 2015; 6:1-14; PMID:25657648; <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00039>
29. Snowden A, Hayden I, Dixon J, Gregory G. Prevention and management of obinutuzumab-associated toxicities: Australian experience. *Int J Nurs Pract* 2015; 21 Suppl 3:15-27; PMID:26681665; <http://dx.doi.org/10.1111/ijn.12412>
 30. Tse BC, Navid F, Billups CA, O'Donnell T, Hoehn ME. Ocular abnormalities in patients treated with a novel anti-GD2 monoclonal antibody, hu14.18K322A. *J AAPOS* 2015; 19:112-5; PMID:25818285; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaapos.2014.11.005>
 31. Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, Gottlieb PD, Rutishauser U, Waxdal MJ. The covalent structure of an entire gamma G immunoglobulin molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969; 63:78-85; PMID:5257969; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.63.1.78>
 32. World Health Organization. International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (INN): Recommended International Nonproprietary Names List 75. *WHO Drug Inf* 2016; 75:19; <http://www.who.int/medicines/publications/druginformation/innlists/RL75.pdf?ua=1>
 33. Inbar D, Hochman J, Givol D. Localization of antibody-combining sites within the variable portions of heavy and light chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972; 69:2659-62; PMID:4560694; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.69.9.2659>

Discussion générale – Perspectives

Nous décrivons dans ce manuscrit de thèse la réalisation d'une cartographie des brevets portant sur les modifications dans la partie Fc des IgG, et une analyse approfondie de ces brevets ayant conduit à l'indexation des variants décrits dans une base de données que nous avons conçue. Bien que l'analyse soit encore partielle, le travail sur les IgG4 témoigne du potentiel de l'approche et de la valeur de cette base.

Réalisée essentiellement à partir de mots clés et de codes de classification CPC, cette cartographie a permis d'indexer 998 brevets répartis de façon croissante au fil des années depuis 1988, avec une augmentation réellement significative depuis trois ans. Ceci traduit l'enjeu majeur qu'il y a à maîtriser ce secteur de la propriété intellectuelle, mais aussi pour l'industrie pharmaceutique à le dominer, à l'image de Roche et de ses filiales, et de Xencor, la société de biotechnologies spécialisée dans les modifications de la portion Fc.

L'analyse microscopique du corpus de brevets n'a hélas pu être réalisée entièrement, en raison premièrement du nombre considérable de brevets qu'il contient désormais, et de leur nombre de variants, lui aussi en constante augmentation. Cette analyse s'est parfois révélée fastidieuse, d'autant que le document brevet n'est pas optimisé pour l'utilisation scientifique des données qu'il contient, et que la stratégie des déposants est même parfois d'essayer de rester le moins visible et le moins clair possible. De plus, ces documents ne sont pas révisés par des pairs, comme en atteste certaines coquilles que nous avons pu mettre en évidence⁴³⁷. La conception d'une base de données en SQL s'est révélée indispensable et n'a pu se faire qu'en la développant nous-mêmes. C'est ainsi que seule une analyse partielle du corpus total a pu être réalisée, qui sera comparée à l'analyse complète des variants portant sur IgG4 réalisée dans le cadre de ce travail de thèse, et à celle des variants G2, réalisée dans le cadre du stage de Master II de Christophe Dumet⁴³⁸.

Les 317 premiers brevets de ce corpus ont ainsi été analysés et leurs 5038 variants ont été indexés dans IgVarImprove. Le nombre de variants par société, ainsi que leur type de modification, définissent les domaines de compétences de chacun. Xencor est en effet spécialiste des modifications peptidiques, qu'elle réalise de façon systématique sur de très nombreuses positions d'acides aminés, ce qui en fait de très loin le premier acteur en termes de variants, au nombre de 2340. Roche, via ses filiales Glycart, Genentech et Chugai explore les modifications autant peptidiques que glycosidiques. Leurs brevets traitant de variants peptidiques décrivent cependant moins de variants que ceux de Xencor, et les brevets traitant de variants glycosidiques contiennent en général peu de variants, le procédé résidant principalement en la modification d'une cellule-usine ou en un traitement post-expression

d'anticorps. Le relatif faible nombre de glycoformes possibles comparé au nombre d'acides aminés présents sur le Fc explique également cette répartition en défaveur des variants glycosidiques. Les modifications décrites dans ces 317 premiers brevets sont pour la majorité peptidiques et portent sur des IgG1. Les propriétés étudiées pour ces variants sont essentiellement les capacités effectrices, suivies de loin par l'interaction avec le FcRn, principalement synonyme de demi-vie de la molécule. Pour ces deux propriétés, c'est autant l'augmentation que la diminution qui sont étudiées, l'une comme l'autre ayant un intérêt pharmacologique et clinique. L'augmentation ou la diminution des propriétés pharmacodynamiques dépend des propriétés cytolytiques du biomédicament, et les variations de pharmacocinétique (persistance de la molécule dans l'organisme et biodistribution) dépendent du site d'administration et de la liaison à FcRn. Par exemple, un anticorps injecté en intraoculaire devra se lier plus faiblement à FcRn pour ne pas que ce récepteur le refoule au travers de la barrière hémochoroïdienne vers la circulation générale. Logiquement, la plupart des mutations sont réalisées aux sites d'interaction avec les FcγR dans le CH2 au pôle supérieur proche de la charnière, et au niveau du site d'interaction avec le FcRn, à l'interface entre le CH2 et le CH3.

L'impact des 317 premiers brevets sur les anticorps commercialisés est déjà visible. En effet, 12 molécules commercialisées aujourd'hui sont des IgG1 modifiées dans leur Fc, dont les technologies ont pu être analysées dans le cadre de ce travail. On y retrouve notamment le vedolizumab, une IgG1 modifiée aux positions L235A et G237A pour abolir les fonctions effectrices. On retrouve également des variants augmentant les fonctions effectrices, comme le mogamulizumab ou l'obinituzumab, modifiés respectivement au niveau de leur glycanne pour ne plus porter de fucose (et porter un GlcNAc pour l'obinituzumab), ceci augmentant leur capacité de liaison au FcγRIIIA et d'ADCC.

L'analyse complète des brevets décrivant des variants d'IgG4 a été réalisée en parcourant notre corpus à l'aide de mots-clés caractéristiques. Un sous-corpus de 103 brevets a pu être constitué, montrant comme pour le corpus entier un nombre croissant de brevets par an, avec une plus forte augmentation dans les deux dernières années. Une répartition similaire des brevets a été caractérisée pour IgG2, pour un nombre plus faible de brevets (49)⁴³⁸.

Certaines tendances de ce corpus IgG4 diffèrent cependant, à commencer par les déposants. En effet, si parmi les déposants majeurs Roche est toujours présent aux avant-postes, cette société n'est cette fois plus suivie par Xencor mais entourée par Genmab et UCB, sociétés

qui se trouvent respectivement à la dernière place et tout simplement absente du Top 10 des déposants dans le corpus entier. Ces deux sociétés se focalisent spécifiquement sur les IgG4, puisque parmi les 19 brevets de Genmab et les 14 d'UCB indexés dans le corpus entier, 11 et 10 respectivement contiennent des variants de cette sous-classe et apparaissent ainsi dans notre sous-corpus IgG4. Ceci est confirmé par la répartition des 537 variants d'IgG4 indexés dans la base de données, où Genmab et UCB sont les plus représentés, ayant respectivement 113 et 104 variants. L'intérêt de Roche pour les IgG4 reste au contraire modeste en termes de variants, puisque seulement 11 variants IgG4 ont pu être indexés dans IgVarImprove. Roche utilise d'ailleurs des modifications décrites dans des brevets d'autres sociétés pour les apposer à leurs molécules. Biogen et Medimmune montrent une tendance inverse à celle de Roche, avec un nombre de brevets très faible en comparaison (3 chacun), mais qui décrivent de nombreux nouveaux variants d'IgG4, respectivement 74 et 90 variants.

Comme pour les 317 premiers brevets du corpus entier et pour le corpus IgG2 (qui indexe 330 variants)⁴³⁸, la majeure partie (503 sur 537) des variants de la portion Fc d'IgG4 sont modifiés de façon peptidique. Le Fc de l'IgG4 diffère de celui de l'IgG1 par 19 acides aminés, notamment aux sites d'interactions avec les récepteurs FcγR et au C1q, et par une charnière plus courte. L'IgG4 est ainsi classiquement caractérisée comme ayant des propriétés effectrices (ADCC, CDC) plus faibles^{114,115,339}, permettant d'utiliser cette sous-classe quand une activité cytolytique n'est pas désirée. Ayant certes une activité CDC des plus faibles pour les 4 sous-classes d'IgG, et une activité ADCC plus faible que celle d'IgG1, sa liaison à certains récepteurs Fcγ reste cependant notable (FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, et FcγRIIIA, particulièrement l'allotype V158)^{157,184}. C'est pourquoi, comme pour IgG1, de nombreux variants modulent les capacités effectrices d'IgG4. Au contraire des IgG1 cependant, et comme pour les IgG2⁴³⁸, la plupart de ces variants présentent une diminution ou une abolition des propriétés effectrices déjà faibles de cette IgG, dans le but de limiter grandement les risques d'effets secondaires par recrutement d'effecteurs dans le traitement de certaines maladies. Si des fonctions effectrices étaient nécessaires, une IgG1 aurait en effet été davantage développée qu'une IgG4. Ces variants sont réalisés aux mêmes positions que pour IgG1, au niveau des sites d'interactions avec les récepteurs Fcγ, au pôle supérieur du CH2. Les modifications les plus rencontrées sont situées notamment aux positions F234 et L235, où un remplacement de ces acides aminés entraîne une abolition des fonctions effectrices. Ces remplacements étant décrits dans un brevet désormais expiré, cette technologie est libre d'être utilisée par des sociétés tierces.

De plus, comme pour les 317 premiers brevets d'IgG1 et pour le corpus IgG2⁴³⁸, quelques variants d'IgG4 dans les brevets portent sur la modulation de la liaison au FcRn, autant pour l'augmenter que la diminuer. Ces brevets transposent en fait surtout des positions connues pour influencer l'interaction des IgG1 avec FcRn, et ne sont ainsi pas spécifiques à IgG4. On retrouve ainsi des remplacements au niveau de l'interface CH2-CH3, notamment au niveau des acides aminés 307 et 309.

La propriété pharmacologique la plus étudiée pour les variants IgG4 n'est en réalité pas liée à ses propriétés effectrices, mais à sa stabilité. Cette sous-classe montre en effet une tendance à se dissocier en héli-molécules seulement composées d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère^{82,83}. Ce phénomène a été initialement attribué à la dissociation dans la charnière des ponts disulfures inter-chaînes lourdes⁸²⁻⁸⁴ et leur réassociation en ponts disulfures intra-chaînes⁸⁵. Ce phénomène explique que l'IgG4 « normale » soit en réalité bispécifique⁸⁶, par un phénomène d'échange de ces héli-molécules. Un peu plus tard, il est apparu que le CH3 jouait également un rôle dans ce phénomène, l'introduction d'un CH3 d'IgG4 dans une IgG1 entraînant également la formation de bispécifiques⁸⁷. Bien qu'aucun effet secondaire n'ait été corrélé à ce phénomène pour le natalizumab, une IgG4 de type sauvage connue pour se séparer en héli-molécules et créer des bispécifiques avec les IgG4 endogènes du patient⁸⁸, de nombreux développements ont été réalisés pour endiguer cet échange. En effet, au contraire de l'IgG1 pour nos 317 premiers brevets et de l'IgG2⁴³⁸, le domaine le plus modifié dans le Fc n'est pas le CH2 (258 remplacements d'acide aminés), mais la région charnière (403) et le CH3 (329). Dans la charnière, la position 228 a été identifiée comme déterminante pour le phénomène de dissociation en héli-molécules, le remplacement de la sérine par une proline présente dans les autres sous-classes abolissant ce phénomène. Cette substitution est de fait la plus réalisée dans le Fc d'IgG4, étant présente dans 187 des 537 variants. Le brevet de cette technologie datant de 1994, celui-ci est désormais expiré et libre d'utilisation par les tiers, au contraire des brevets couvrant une technologie de stabilisation de l'IgG4 par un remplacement d'acides aminés dans le CH3, qui sont beaucoup plus récents. Ces brevets décrivent la stabilisation de l'IgG4 par des remplacements notamment en positions 370, 405, ou 409, cette dernière étant le déterminant principal d'instabilité. En effet, comme pour la position 228, l'acide aminé en position 409 dans l'IgG4 est différent de celui présent dans les autres sous-classes, puisqu'on trouve une arginine à la place d'une lysine. Le remplacement R409K stabilise en réalité l'interaction CH3-CH3. Cette position est de plus un isoallotype d'IgG4, puisque les deux formes, R409 et K409 sont retrouvées naturellement. La question de la

protection de cette position est d'ailleurs à discuter, puisque si retrouver une lysine en 409 est naturel chez certains individus, une revendication portant sur la substitution R409K est exclu de la brevetabilité. La liaison de cette substitution au caractère stabilisateur de l'IgG4 peut cependant restaurer la brevetabilité, et pourrait expliquer la solidité des revendications de Genmab.

L'expiration des brevets portant sur la stabilisation via S228P et sur le retrait des fonctions effectrices par remplacement des acides aminés F234 et L235 a rendu possible l'utilisation de ces technologies par les concurrents d'UCB et MacroGenics. Ceci s'identifie clairement pour la technologie de stabilisation, puisque seul le gemtuzumab ozogamicine développé par UCB portait cette modification avant 2014, année d'expiration du brevet. Depuis, 4 molécules d'autres sociétés, le dulaglutide, le nivolumab, le pembrolizumab et l'ixékizumab ont été approuvés et incorporent cette mutation, et de nombreuses autres sont en phases cliniques avancées.

Toujours en raison de ces expirations de brevets, les développements récents de brevets retrouvés dans notre corpus s'orientent vers de nouvelles applications pour les propriétés particulières de cette sous-classe. On retrouve notamment une technologie de création de bispécifique, DuoBody[®] de Genmab qui applique cette instabilité propre à IgG4 à des IgG1 pour obtenir une bonne hétérodimérisation de leurs chaînes lourdes. Toujours pour faire des bispécifiques, Pfizer a utilisé l'instabilité de la position 228, en réalisant une substitution S228R sur une des chaînes lourdes, et une substitution S228E dans la seconde, favorisant le bon appareillage des deux chaînes lourdes par des interactions de charge. Au contraire, Medimmune a cherché à amplifier le phénomène de dissociation des deux chaînes lourdes, pour créer des héli-molécules et utiliser ces Fc monomériques comme des fragments à coupler par exemple dans des protéines de fusion, et permettant d'avoir toujours une demi-vie plus longue, ce qui peut d'ailleurs paraître surprenant compte tenu des données de cocrystallisation qui suggèrent la nécessité d'un pontage de deux molécules de FcRn par un Fc⁴³⁹.

Tous les développements décrits dans ces brevets sont effectués pour moduler les effets thérapeutiques de ces molécules. Ceux-ci peuvent être amplifiés, dans le cas d'une IgG1 où les fonctions effectrices sont augmentées. Au contraire, les fonctions effectrices de la molécule peuvent être réduites par l'abolition des fonctions effectrices d'IgG1 ou par le choix d'une sous-classe moins cytolytique comme IgG4 ou IgG2. Le retrait des fonctions effectrices comme le fait de stabiliser l'IgG4, est réalisé pour réduire de possibles effets secondaires pouvant être

dommageables pour les patients. C'est pourquoi, nous pensons qu'inclure un radical dans la DCI indiquant la présence d'un Fc dans une molécule est indispensable, puisque celui-ci modifie considérablement la prise en charge de celle-ci par l'organisme, autant en terme d'interaction avec les cellules de l'immunité qu'au niveau de sa persistance et de sa biodistribution. Le récent débat autour de la nouvelle définition des DCI nous donne une opportunité de proposer une refonte de ce système, aujourd'hui dépassé. Indiquer la cible dans le nom de l'anticorps est par exemple totalement inutile et contre-productif quand on pense par exemple au rituximab (le radical « tu » indiquant tumeur), approuvé initialement en cancérologie et qui est finalement également utilisé dans les maladies inflammatoires. Il en est de même pour les radicaux indiquant la provenance des fragments variables ou la technique utilisée pour les rendre plus proche de l'humain, puisque aucune donnée clinique ne rapporte une immunogénicité supérieure pour des fragments variables non humains.

Les DCI, qui se veulent des outils d'information et de simplification pour les professionnels de santé ne doivent ainsi pas indiquer des faits sans importance, mais plutôt par définition informer qualitativement sur la molécule désignée par sa DCI. Et le Fc est clairement une partie de l'anticorps influençant le comportement de la molécule dans l'organisme du patient, comme peut l'être le PEG, qui est indiqué dans le certolizumab pegol, un Fab pégylé. Le PEG a notamment la propriété d'allonger la demi-vie de la molécule, comme la présence d'un Fc peut le faire grâce à son interaction avec le FcRn, et développer un Fab-pégylé représente pharmacologiquement parlant le même type de molécule qu'un anticorps entier sans fonction effectrice. Le même raisonnement n'étant pas appliqué au Fc, les fragments d'anticorps sont impossibles à distinguer des anticorps entiers, et par exemple les ophtalmologistes n'ont jamais pu identifier la différence majeure entre le bévacizumab, une IgG entière, et le ranibizumab, un fragment Fab, et ont commencé à utiliser le bévacizumab dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Par chance aucun effet secondaire n'a été identifié, bien que le bévacizumab puisse traverser la barrière hémato-rétinienne. La même chose est présente pour les protéines de fusion, où la présence d'un Fc, allongeant sensiblement la demi-vie, n'est pas indiquée. Ainsi, des protéines comme le dulaglutide (peptide agoniste de GLP-1 fusionné à un Fc d'IgG4) et le lixisenatide (peptide agoniste de GLP-1 non fusionné) ont des persistances dans l'organisme très différentes alors qu'à travers leur nom ils sont de la même classe thérapeutique. C'est pourquoi l'ajout d'un mot similaire au pegol comme « efcil » peut être envisageable pour indiquer la présence d'un Fc dans une protéine de fusion. Pour les

immunoglobulines, plutôt que d'indiquer la présence du Fc, implicite, il serait plus simple d'indiquer par un radical quand l'anticorps n'est en réalité qu'un fragment, sans Fc.

Les modifications du fragment Fc devraient également être plus repérables quand les DCI sont délivrées, maintenant que 18 molécules commercialisées en portent. Indiquer ces modifications dans le nom de l'anticorps semble impossible, mais introduire une nouvelle nomenclature de ces variants Fc et renseigner celle-ci dans les documents décrivant l'anticorps à l'attention des professionnels de santé pourrait faciliter par exemple l'identification d'effets secondaires communs à deux anticorps porteurs des mêmes modifications. Pour ce faire, nous avons longuement réfléchi à une nomenclature complexe incorporant les positions modifiées ou les configurations du glycanne, mais ceci semble trop compliqué, les combinaisons de modifications donnant des termes inadaptés. La meilleure façon de procéder nous semble au final de calquer notre nomenclature sur celle des allotypes (G1mX, G2mX, G4mX), en modifiant le « m » par un « e » pour « *engineered* ». En classant chronologiquement par sous-classe les variants arrivés sur le marché, le gemtuzumab ozogamicine est la première IgG4 modifiée, et serait nommée G4e1. Ainsi, toutes les molécules contenant un Fc IgG4 contenant une simple mutation S228P comme cet anticorps seraient nommées G4e1 (par exemple le pembrolizumab et le nivolumab), et à chaque nouvelle configuration de modification approuvée la nomenclature avance (G4e2, G4e3...). Idem pour IgG1, l'abatacept est le premier variant Fc commercialisé pour cette sous-classe, et donc tous les anticorps ayant exactement les substitutions C220S C226S C229S et P238S seront des G1e1, comme par exemple le bélatacept.

Tout en continuant la relance des requêtes pour garder l'exhaustivité du corpus, l'analyse complète de celui-ci reste à faire. L'analyse des brevets les plus anciens a pour l'heure permis d'identifier les technologies pionnières de ce sujet, aujourd'hui appliquée à des anticorps commercialisés comme le védolizumab, le mogamulizumab ou encore l'obinutuzumab. Cette analyse a également identifié les technologies expirées ou qui le seront prochainement, permettant leur utilisation par les chercheurs et les sociétés concurrentes. De façon identique, l'analyse complète du corpus IgG4 a caractérisé la liberté d'utilisation des technologies de réduction des fonctions effectrices et de stabilité de cette sous-classe, et a permis d'identifier de nouvelles technologies récentes. Les données liées aux variants d'IgG4 sont cependant, depuis la découverte du phénomène de rotation du CH2 dans le pembrolizumab, à remettre en

cause, car comme nous l'avons caractérisé dans notre article, des acides aminés important dans l'interaction avec les récepteurs Fcγ et le FcRn, classiquement tournés vers l'intérieur se retrouve exposé, et vice-versa. Ceci doit sans nul doute impacter sur la liaison à ces récepteurs, et des expérimentations complémentaires étudiant ce phénomène sont donc nécessaire. Le protocole mis en place durant cette thèse permet également d'avoir accès à des informations non publiées, seulement présente dans les brevets. Nous avons par exemple lors d'une recherche effectuée pour une équipe du LabEx MAbImprove identifié un brevet de la société Verenium (WO2008030564), traitant de variants aglycosylés gardant une affinité pour les récepteurs Fcγ, à propos desquels aucune donnée ne figure dans la littérature scientifique. Le support brevet est également très intéressant pour dénicher des informations dissimulées par les sociétés pharmaceutiques, comme les séquences des anticorps, indispensables pour caractériser l'utilisation commerciale des modifications identifiées dans les brevets présents dans notre corpus, ou pour justifier des caractéristiques particulières d'anticorps commercialisés identifiés par les chercheurs de notre équipe.

La base de données IgVarImprove, aujourd'hui fonctionnelle et consultable en ligne dans le périmètre de notre équipe de recherche à Tours, nécessite maintenant de voir arriver des premiers utilisateurs extérieurs pour compiler des retours et améliorer son contenu et son interface. Ces utilisateurs seraient principalement des chercheurs voulant développer des anticorps aux propriétés pharmacologiques affinées, et qui auraient ainsi un accès facilité aux informations disponibles dans les brevets, leur permettant d'appliquer les modifications adéquates à leur molécule. Des modifications de la base de données semblent cependant déjà indispensables, comme l'amélioration de l'interface, l'incorporation de la liberté d'exploitation des variants en fonction de leur brevet, et bien sûr l'étendue possible de consultation (plus large que le site Médecine à Tours). L'incorporation des modifications réalisées dans le CH1 semble également à envisager. En effet, des résultats de notre équipe de recherche⁹² montrant l'importance de résidus du CH1 dans la liaison au FcRn, ainsi que l'analyse des brevets traitant des variants d'IgG2 qui a montré l'importance des résidus dans le CH1 pour l'arrangement des ponts disulfures de cette sous-classe, nous suggèrent qu'il est indispensable de revoir notre définition du Fc, pour finalement inclure également le CH1 dans nos études. L'ensemble des modifications dans les domaines constants de la chaîne lourde seront ainsi couvertes, ainsi que leur impact sur les propriétés pharmacologiques des anticorps thérapeutiques.

En conclusion, une fois que l'analyse du corpus de brevets sera terminée, il sera possible d'étudier la liberté d'exploitation des technologies dans leur ensemble, permettant d'identifier quelles technologies libres favoriser suivant le contexte de tel ou tel développement, ou quelle société contacter si la technologie est encore protégée. Toutes ces technologies pourront également en inspirer de nouvelles, dites de « niches », non protégées à l'heure actuelle, et permettre des nouveaux dépôts de brevets. Enfin, la compilation de toutes ces données sur les variants Fc permettra de réaliser une méta-analyse, caractérisant chaque modification d'acide aminé et chaque glycoforme avec leurs propriétés pharmacologiques associées, résultants de la compilation des données colligées dans les brevets du corpus.

Bibliographie

1. Cartron, G. *et al.* Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene. *Blood* **99**, 754–8 (2002).
2. Louis, E. *et al.* Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **19**, 511–519 (2004).
3. Ternant, D. *et al.* Interindividual variability in the concentration-effect relationship of antilymphocyte globulins - a possible influence of FcgammaRIIIa genetic polymorphism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **65**, 60–8 (2008).
4. Dall'Ozzo, S. *et al.* Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res.* **64**, 4664–9 (2004).
5. Congy-Jolivet, N. *et al.* Fc gamma RIIIa expression is not increased on natural killer cells expressing the Fc gamma RIIIa-158V allotype. *Cancer Res.* **68**, 976–80 (2008).
6. Von Behring, E. & Kitasato, S. Ueber Das Zustandekommen Der Diphtherie-Immunität Und Der Tetanus-Immunität Bei Thieren. *Mol. Immunol.* **28**, 1319–1320 (1991).
7. Ehrlich, P. Experimentelle untersuchungen über Immunität. II. Ueber Abrin. *Dtsch. med. Wochenschr.* **1218**, (1891).
8. Lindenmann, J. Origin of the terms 'antibody' and 'antigen'. *Scand. J. Immunol.* **19**, 281–5 (1984).
9. Deutsch, L. Contribution à l'étude de l'origine des anticorps typhiques. *Ann. Inst. Pasteur* **13**, (1899).
10. Deutsch, L. & Feistmantel, C. Die Impfstoffe und Sera. *Thieme, Leipzig* (1903).
11. Schroeder, H. W. J. & Cavacini, L. Structure and Function of Immunoglobulins (author manuscript). *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S41–S52 (2010).
12. Heremans, J. F. Les Globulines sériques du système gamma : Leur nature et leur pathologie, par Joseph Heremans - Joseph Heremans - Livres.

13. WHO. Memorandum from WHO meeting on Nomenclature of Human Immunoglobulins. *Bull. World Health Organ.* **30**, 447–50 (1964).
14. Bence Jones, H. Papers on chemical pathology : Prefaced by the Gulstonian Lectures, read at the Royal College of Physicians, 1846. *Lancet* **50**, 60–64 (1847).
15. Korngold, L. & Lipari, R. Multiple-myeloma proteins. III. The antigenic relationship of Bence Jones proteins to normal gammaglobulin and multiple-myeloma serum proteins. *Cancer* **9**, 262–72 (1956).
16. Putnam, F. W. From the first to the last of the immunoglobulins. Perspectives and prospects. *Clin. Physiol. Biochem.* **1**, 63–91 (1983).
17. Black, C. a. A brief history of the discovery of the immunoglobulins and the origin of the modern immunoglobulin nomenclature. *Immunol. Cell Biol.* **75**, 65–68 (1997).
18. Tiselius, A. The Moving boundary method of studying the electrophoresis of proteins.
19. Cohen, S. Nomenclature of human immunoglobulins. *Bull. World Health Organ.* **48**, 373–374 (1965).
20. Tiselius, A. & Kabat, E. A. An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *J. Exp. Med.* **69**, 119–31 (1939).
21. Heremans, J. F., Heremans, M. T. & Schultze, H. E. Isolation and description of a few properties of the beta 2A-globulin of human serum. *Clin. Chim. Acta.* **4**, 96–102 (1959).
22. Rowe, D. S. & Fahey, J. L. A new Class of Human Immunoglobulins. Ii. Normal Serum Igd. *J. Exp. Med.* **121**, 185–99 (1965).
23. Ishizaka, K., Ishizaka, T. & Hornbrook, M. M. Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J. Immunol.* **97**, 75–85 (1966).
24. Ishizaka, K., Ishizaka, T. & Hornbrook, M. M. Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with gamma-E-globulin antibody. *J. Immunol.* **97**, 840–853 (1966).

25. Jaspard, E. Les immunoglobulines et la recombinaison V(D)J. (2014). at <<http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/Zsuite/8Immunoglobulines/1Immunoglobulin.htm#Recombinaison>>
26. Lefranc, M.-P. *et al.* IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. *Nucleic Acids Res.* **37**, D1006–12 (2009).
27. Li, S. *et al.* Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* **7**, 301–11 (2005).
28. Peter Parham. *The Immune System*. (Garland Publishing/Elsevier Science, 2000).
29. Cruse, J. M., MD, PhD & Lewis, R. E. *Atlas of Immunology, Third Edition*. (CRC Press, 2010).
30. Marie-Paule Lefranc; & Gerard Lefranc. The Immunoglobulin FactsBook, 1st Edition | Marie-Paule Lefranc, Gerard Lefranc | ISBN 9780080574479. *Academic Press* (2001).
31. Batteux, F., Garraud, O., Prin, L., Renaudineau, Y. & Vallat, L. Les Immunoglobulines : Structure et fonctions. 1–10
32. Clynes, R. *et al.* Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *J. Exp. Med.* **189**, 179–85 (1999).
33. Schur, P. H. IgG subclasses. A historical perspective. *Monogr. Allergy* **23**, 1–11 (1988).
34. Grey, H. M. H chain subgroups of myeloma proteins and normal 7S gamma-globulin. *J. Exp. Med.* **120**, 253–266 (1964).
35. Woof, J. M. & Kerr, M. A. IgA function - variations on a theme. *Immunology* **113**, 175–177 (2004).
36. Woof, J. M. & Mestecky, J. Mucosal immunoglobulins. *Immunol. Rev.* **206**, 64–82 (2005).
37. Chen, K. *et al.* Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating

- antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat. Immunol.* **10**, 889–898 (2009).
38. The Erik Selsing Lab. Mechanism of recombination and somatic mutation. at <<http://sackler.tufts.edu/Faculty-and-Research/Faculty-Research-Pages/Erik-Selsing>>
 39. Edelman, G. M. Dissociation of γ -Globulin. *J. Am. Chem. Soc.* **184**, 3155–3156 (1959).
 40. Porter, R. R. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.* **73**, 119–127 (1959).
 41. Nisonoff, A. & Wissler, F. C. Separation Antibody of Univalent Molecule by Fragments Reduction from the Bivalent Rabbit of Disulfide Bonds. *Arch. Biochem. Biophys.* 230–244 (1960).
 42. Nisonoff, A., Markus, G. & Wissler, F. Separation of univalent fragments of rabbit antibody by reduction of a single, labile disulphide bond. *Nature* (1961). doi:10.1038/189293a0
 43. G M Edelman, B. B. on Structural and Functional Relations Between Antibodies and Proteins of the Gamma-System. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **48**, 1035 (1962).
 44. Hilschmann, N. & Craig, L. C. Amino acid sequence studies with Bence-Jones proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **53**, 1403–9 (1965).
 45. Feinstein, A. & Rowe, A. J. Molecular Mechanism of Formation of an Antigen-Antibody Complex. *Nature* **205**, 147–9 (1965).
 46. Gall, W. E., Cunningham, B. A., Waxdal, M. J., Konigsberg, W. H. & Edelman, G. M. The covalent structure of a human gamma G-immunoglobulin. IV. The interchain disulfide bonds. *Biochemistry* **7**, 1973–82 (1968).
 47. Waxdal, M. J., Konigsberg, W. H. & Edelman, G. M. The covalent structure of a human γ G-immunoglobulin. III. Arrangement of the cyanogen bromide fragments. *Biochemistry* **7**, 1967–1972 (1968).
 48. Edelman, G. M. *et al.* The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **63**, 78–85 (1969).

49. Edelman, G. M. The Covalent Structure of a Human γ G-Immunoglobulin. XI. Functional Implications'. **9**, 3197–3205 (1969).
50. Poljak, R. J., Amzel, L. M., Avey, H. P. & Becka, L. N. Structure of Fab' New at 6 Å resolution. *Nat. New Biol.* **235**, 137–40 (1972).
51. Peterson, P. A., Cunningham, B. A., Berggardt, I. & Edelman, G. M. Free Domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**, 1697–1701 (1972).
52. Lefranc, M.-P. *et al.* IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev. Comp. Immunol.* **27**, 55–77 (2003).
53. Stapleton, N. M. *et al.* Competition for FcRn-mediated transport gives rise to short half-life of human IgG3 and offers therapeutic potential. *Nat. Commun.* **2**, 599 (2011).
54. van der Giessen, M. *et al.* Quantification of IgG subclasses in sera of normal adults and healthy children between 4 and 12 years of age. *Clin. Exp. Immunol.* **21**, 501–509 (1975).
55. Ferrante, A., Beard, L. J. & Feldman, R. G. IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **9**, S16–24 (1990).
56. Saphire, E. O. *et al.* Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science* **293**, 1155–9 (2001).
57. Roux, K. H., Strelets, L. & Michaelsen, T. E. Flexibility of human IgG subclasses. *J Immunol* **159**, 3372–3382 (1997).
58. Frangione, B., Milstein, C. & Pink, J. R. L. Immunoglobulins: Structural Studies of Immunoglobulin G. *Nature* **221**, 145–148 (1969).
59. Brezski, R. J., Oberholtzer, A., Strake, B. & Jordan, R. E. The in vitro resistance of IgG2 to proteolytic attack concurs with a comparative paucity of autoantibodies against peptide analogs of the IgG2 hinge. *MAbs* **3**, 558–567 (2011).
60. Saluk, P. H. & Clem, L. W. The unique molecular weight of the heavy chain from human IgG3. *J. Immunol.* **107**, 298–301 (1971).

61. Michaelsen, T. E., Naess, L. M. & Aase, A. Human IgG3 is decreased and IgG1, IgG2 and IgG4 are unchanged in molecular size by mild reduction and reoxidation without any major change in effector functions. *Mol. Immunol.* **30**, 35–45 (1993).
62. Liu, H. & May, K. Structural variations , chemical modifications and possible impacts to stability and biological function Disulfide bond structures of IgG molecules © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . Do not distribute . *MAbs* **4**, 17–23 (2012).
63. Wang, a C., Tung, E. & Fudenberg, H. H. The primary structure of a human IgG2 heavy chain: genetic, evolutionary, and functional implications. *J. Immunol.* **125**, 1048–54 (1980).
64. Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispens, T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Front. Immunol.* **5**, 1–17 (2014).
65. Barrett, D. J. & Ayoub, E. M. IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides. *Clin. Exp. Immunol.* **63**, 127–34 (1986).
66. Schauer, U. *et al.* Levels of Antibodies Specific to Tetanus Toxoid , Haemophilus influenzae Type b , and Pneumococcal Capsular Polysaccharide in Healthy Children and Adults. *Society* **10**, 202–207 (2003).
67. Siber, G. R., Schur, P. H., Aisenberg, A. C., Weitzman, S. A. & Schiffman, G. Correlation between serum IgG-2 concentrations and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens. *N. Engl. J. Med.* **303**, 178–82 (1980).
68. Lightle, S. *et al.* Mutations within a human IgG2 antibody form distinct and homogeneous disulfide isomers but do not affect Fc gamma receptor or C1q binding. *Protein Sci.* **19**, 753–762 (2010).
69. Yoo, E. M., Wims, L. A., Chan, L. A. & Morrison, S. L. Human IgG2 can form covalent dimers. *J. Immunol.* **170**, 3134–8 (2003).
70. Dillon, T. M. *et al.* Structural and functional characterization of disulfide isoforms of the human IgG2 subclass. *J. Biol. Chem.* **283**, 16206–15 (2008).
71. Wypych, J. *et al.* Human IgG2 antibodies display disulfide-mediated structural isoforms. *J. Biol. Chem.* **283**, 16194–205 (2008).

72. Zhang, B., Harder, A. G., Connelly, H. M., Maheu, L. L. & Cockrill, S. L. Determination of fab-hinge disulfide connectivity in structural isoforms of a recombinant human immunoglobulin G2 antibody. *Anal. Chem.* **82**, 1090–1099 (2010).
73. Ellison, J., Buxbaum, J. & Hoodf, L. Nucleotide Sequence of a Human Immunoglobulin Cy4 Gene. **1**, (1981).
74. Pink, J. R., Buttery, S. H., De Vries, G. M. & Milstein, C. Human immunoglobulin subclasses. Partial amino acid sequence of the constant region of a gamma 4 chain. *Biochem. J.* **117**, 33–47 (1970).
75. Aalberse, R. C., Stapel, S. O., Schuurman, J. & Rispens, T. Immunoglobulin G4: An odd antibody. *Clin. Exp. Allergy* **39**, 469–477 (2009).
76. Nouri-Aria, K. T. *et al.* Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J. Immunol.* **172**, 3252–9 (2004).
77. Aalberse, R. C. *et al.* IgG4 as a blocking antibody. *Clin. Rev. Allergy* **1**, 289–302 (1983).
78. Aalberse, R. C., van der Gaag, R. & van Leeuwen, J. Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. *J. Immunol.* **130**, 722–6 (1983).
79. Aalberse, R. C., van der Gaag, R. & van Leeuwen, J. Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. *J. Immunol.* **130**, 722–726 (1983).
80. Scapin, G. *et al.* Structure of full-length human anti-PD1 therapeutic IgG4 antibody pembrolizumab. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2015). doi:10.1038/nsmb.3129
81. van der Zee, J. S., van Swieten, P. & Aalberse, R. C. Serologic aspects of IgG4 antibodies. II. IgG4 antibodies form small, nonprecipitating immune complexes due to functional monovalency. *J. Immunol.* **137**, 3566–71 (1986).
82. Tan, L. K., Shopes, R. J., Oi, V. T. & Morrison, S. L. Influence of the hinge region on complement activation, C1q binding, and segmental flexibility in chimeric human immunoglobulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 162–6 (1990).

83. King, D. J. *et al.* Expression, purification and characterization of a mouse-human chimeric antibody and chimeric Fab' fragment. *Biochem. J.* **281** (Pt 2, 317–323 (1992).
84. Colcher, D. *et al.* Characterization and Biodistribution of Recombinant and Recombinant / Chimeric Constructs of Monoclonal Antibody Characterization and Biodistribution of Recombinant and Recombinant / Chimeric Constructs of Monoclonal Antibody B72 . 3. *Analysis* **3**, 1738–1745 (1989).
85. Schuurman, J., Perdok, G. J., Gorter, A. D. & Aalberse, R. C. The inter-heavy chain disulfide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-chain disulfide bonds. *Mol. Immunol.* **38**, 1–8 (2001).
86. Schuurman, J. *et al.* Normal human immunoglobulin G4 is bispecific : it has two different antigen-combining sites. **178**, (1999).
87. van der Neut Kolfchoten, M. *et al.* Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science* **317**, 1554–1557 (2007).
88. Labrijn, A. F. *et al.* Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo. *Nat. Biotechnol.* **27**, 767–771 (2009).
89. Labrijn, A. F. *et al.* Species-Specific Determinants in the IgG CH3 Domain Enable Fab-Arm Exchange by Affecting the Noncovalent CH3-CH3 Interaction Strength. *J. Immunol.* **187**, 3238–3246 (2011).
90. Huck, S., Fort, P., Crawford, D. H., Lefranc, M. P. & Lefranc, G. Sequence of a human immunoglobulin gamma 3 heavy chain constant region gene: comparison with the other human C gamma genes. *Nucleic Acids Res.* **14**, 1779–89 (1986).
91. Jefferis, R. & Lefranc, M. Human immunoglobulin allotypes: possible implications for immunogenicity. *MAbs* **1**, 332–8 (2009).
92. Ternant, D. *et al.* IgG1 Allotypes Influence the Pharmacokinetics of Therapeutic Monoclonal Antibodies through FcRn Binding. *J. Immunol.* **196**, 607–13 (2016).
93. Pandey, J. P. & Namboodiri, A. M. Genetic variants of IgG1 antibodies and FcγRIIIa receptors influence the magnitude of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against prostate cancer cells. *Oncoimmunology* **3**, e27317 (2014).

94. Wright, A., Tao, M. H., Kabat, E. A. & Morrison, S. L. Antibody variable region glycosylation: position effects on antigen binding and carbohydrate structure. *EMBO J.* **10**, 2717–23 (1991).
95. Krapp, S., Mimura, Y., Jefferis, R., Huber, R. & Sondermann, P. Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *J. Mol. Biol.* **325**, 979–89 (2003).
96. Matsumiya, S. *et al.* Structural comparison of fucosylated and nonfucosylated Fc fragments of human immunoglobulin G1. *J. Mol. Biol.* **368**, 767–79 (2007).
97. Jefferis, R. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol. Prog.* **21**, 11–6 (2005).
98. Jefferis, R. Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**, 356–62 (2009).
99. Liu, L. Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *J. Pharm. Sci.* **104**, 1866–1884 (2015).
100. Holland, M. *et al.* Differential glycosylation of polyclonal IgG, IgG-Fc and IgG-Fab isolated from the sera of patients with ANCA-associated systemic vasculitis. *Biochim. Biophys. Acta* **1760**, 669–77 (2006).
101. Guile, G. R., Rudd, P. M., Wing, D. R., Prime, S. B. & Dwek, R. A. A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. *Anal. Biochem.* **240**, 210–26 (1996).
102. Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M. & Dwek, R. A. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 21–50 (2007).
103. Wright, A. & Morrison, S. L. Effect of altered CH2-associated carbohydrate structure on the functional properties and in vivo fate of chimeric mouse-human immunoglobulin G1. *J. Exp. Med.* **180**, 1087–96 (1994).
104. Mimura, Y. *et al.* The influence of glycosylation on the thermal stability and effector

- function expression of human IgG1-Fc: properties of a series of truncated glycoforms. *Mol. Immunol.* **37**, 697–706
105. Scanlan, C. N., Burton, D. R. & Dwek, R. A. Making autoantibodies safe. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 4081–2 (2008).
 106. Karsten, C. M. *et al.* Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nat. Med.* **18**, 1401–6 (2012).
 107. Rademacher, T. W., Williams, P. & Dwek, R. A. Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 6123–7 (1994).
 108. Shields, R. L. *et al.* Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγgamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J. Biol. Chem.* **277**, 26733–40 (2002).
 109. Niwa, R. *et al.* Defucosylated chimeric anti-CC chemokine receptor 4 IgG1 with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity shows potent therapeutic activity to T-cell leukemia and lymphoma. *Cancer Res.* **64**, 2127–33 (2004).
 110. Müller-Eberhard, H. J. Complement. *Annu. Rev. Biochem.* **44**, 697–724 (1975).
 111. Dalmaso, A. P., Falk, R. J. & Raij, L. The pathobiology of the terminal complement complexes. *Complement Inflamm.* **6**, 36–48 (1989).
 112. Frchet, P., Tacnet-Delorme, P., Gaboriaud, C. & Thielens, N. M. Role of C1q in Efferocytosis and Self-Tolerance — Links With Autoimmunity. *Autoimmun. Pathog. Clin. Asp. Ther. Specif. autoimmune Dis.* (2015). doi:10.5772/60519
 113. Gaboriaud, C., Ling, W. L., Thielens, N. M., Bally, I. & Rossi, V. Deciphering the fine details of C1 assembly and activation mechanisms: ‘Mission impossible’? *Front. Immunol.* **5**, 3–9 (2014).
 114. Bindon, C. I., Hale, G., Brüggemann, M. & Waldmann, H. Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *J. Exp. Med.* **168**, 127–42 (1988).
 115. Brüggemann, M. *et al.* Comparison of the effector functions of human immunoglobulins

- using a matched set of chimeric antibodies. *J. Exp. Med.* **166**, 1351–61 (1987).
116. Ishizaka, T., Ishizaka, K., Salmon, S. & Fudenberg, H. Biologic activities of aggregated gamma-globulin. 8. Aggregated immunoglobulins of different classes. *J. Immunol.* **99**, 82–91 (1967).
 117. Tao, M. H., Smith, R. I. & Morrison, S. L. Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation. *J. Exp. Med.* **178**, 661–7 (1993).
 118. Schumaker, V. N., Calcott, M. A., Spiegelberg, H. L. & Mueller-Eberhard, H. J. Ultracentrifuge studies of the binding of IgG of different subclasses to the C1q subunit of the first component of complement. *Biochemistry* **15**, 5175–5181 (1976).
 119. Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. & Winter, G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* **332**, 323–7 (1988).
 120. Brekke, O. H., Michaelsen, T. E., Aase, A., Sandin, R. H. & Sandlie, I. Human IgG isotype-specific amino acid residues affecting complement-mediated cell lysis and phagocytosis. *Eur. J. Immunol.* **24**, 2542–7 (1994).
 121. Idusogie, E. E. *et al.* Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J. Immunol.* **164**, 4178–84 (2000).
 122. Morgan, A. *et al.* The N-terminal end of the CH2 domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for C1q, Fc gamma RI and Fc gamma RIII binding. *Immunology* **86**, 319–24 (1995).
 123. Dall’Acqua, W. F., Cook, K. E., Damschroder, M. M., Woods, R. M. & Wu, H. Modulation of the effector functions of a human IgG1 through engineering of its hinge region. *J. Immunol.* **177**, 1129–38 (2006).
 124. Dangl, J. L. *et al.* Segmental flexibility and complement fixation of genetically engineered chimeric human, rabbit and mouse antibodies. *EMBO J.* **7**, 1989–94 (1988).
 125. Lu, Y. *et al.* Solution conformation of wild-type and mutant IgG3 and IgG4 immunoglobulins using crystallohydrodynamics: possible implications for complement activation. *Biophys. J.* **93**, 3733–3744 (2007).

126. Diebold, C. a *et al.* Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science* **343**, 1260–3 (2014).
127. Abe, Y., Gor, J., Bracewell, D. G., Perkins, S. J. & Dalby, P. A. Masking of the Fc region in human IgG4 by constrained X-ray scattering modelling: implications for antibody function and therapy. *Biochem. J.* **432**, 101–114 (2010).
128. Rispen, T., Ooijevaar-De Heer, P., Bende, O. & Aalberse, R. C. Mechanism of immunoglobulin G4 Fab-arm exchange. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 10302–10311 (2011).
129. Saeland, E. *et al.* Central Role of Complement in Passive Protection by Human IgG1 and IgG2 Anti-pneumococcal Antibodies in Mice. *J. Immunol.* **170**, 6158–6164 (2003).
130. Swanson, J. A. & Hoppe, A. D. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 1093–1103 (2004).
131. Flannagan, R. S., Harrison, R. E., Yip, C. M., Jaqaman, K. & Grinstein, S. Dynamic macrophage ‘probing’ is required for the efficient capture of phagocytic targets. *J. Cell Biol.* **191**, 1205–18 (2010).
132. Zhang, Y., Hoppe, A. D. & Swanson, J. A. Coordination of Fc receptor signaling regulates cellular commitment to phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 19332–7 (2010).
133. Nagashima, H. *et al.* Enhanced antibody-dependent cellular phagocytosis by chimeric monoclonal antibodies with tandemly repeated Fc domains. *J. Biosci. Bioeng.* **111**, 391–396 (2011).
134. Indik, Z. K. *et al.* The high affinity Fc gamma receptor (CD64) induces phagocytosis in the absence of its cytoplasmic domain: the gamma subunit of Fc gamma RIIIA imparts phagocytic function to Fc gamma RI. *Exp. Hematol.* **22**, 599–606 (1994).
135. Tuijnman, W. B., Capel, P. J. & van de Winkel, J. G. Human low-affinity IgG receptor Fc gamma RIIa (CD32) introduced into mouse fibroblasts mediates phagocytosis of sensitized erythrocytes. *Blood* **79**, 1651–6 (1992).
136. Park, J. G., Isaacs, R. E., Chien, P. & Schreiber, A. D. In the absence of other Fc receptors, Fc gamma RIIIA transmits a phagocytic signal that requires the cytoplasmic

- domain of its gamma subunit. *J. Clin. Invest.* **92**, 1967–73 (1993).
137. Tridandapani, S. *et al.* Regulated expression and inhibitory function of Fcgamma RIIb in human monocytic cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 5082–9 (2002).
 138. Hunter, S. *et al.* Inhibition of Fcgamma receptor-mediated phagocytosis by a nonphagocytic Fcgamma receptor. *Blood* **91**, 1762–8 (1998).
 139. Wallace, P. K., Howell, A. L. & Fanger, M. W. Role of Fc gamma receptors in cancer and infectious disease. *J. Leukoc. Biol.* **55**, 816–26 (1994).
 140. Moeller, E. Contact-induced cytotoxicity by lymphoid cells containing foreign isoantigens. *Science* **147**, 873–9 (1965).
 141. MacLennan, I. C., Loewi, G. & Harding, B. The role of immunoglobulins in lymphocyte-mediated cell damage, in vitro. I. Comparison of the effects of target cell specific antibody and normal serum factors on cellular damage by immune and non-immune lymphocytes. *Immunology* **18**, 397–404 (1970).
 142. Pudifin, D. J., Harding, B. & MacLennan, I. C. The differential effect of gamma irradiation on the sensitizing and effector stages of antibody dependent lymphocyte mediated cytotoxicity. *Immunology* **21**, 853–60 (1971).
 143. Clynes, R. a, Towers, T. L., Presta, L. G. & Ravetch, J. V. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* **6**, 443–446 (2000).
 144. Tudor, D. & Bomsel, M. The broadly neutralizing HIV-1 IgG 2F5 elicits gp41-specific antibody-dependent cell cytotoxicity in a FcγRI-dependent manner. *AIDS* **25**, 751–9 (2011).
 145. Horner, H. *et al.* Intimate cell conjugate formation and exchange of membrane lipids precede apoptosis induction in target cells during antibody-dependent, granulocyte-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* **179**, 337–45 (2007).
 146. Unkeless, J. C., Scigliano, E. & Freedman, V. H. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu Rev Immunol* **6**, 251–281 (1988).
 147. Ravetch, J. V & Bolland, S. IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 275–290 (2001).

148. Vély, F. & Vivier, E. Conservation of structural features reveals the existence of a large family of inhibitory cell surface receptors and noninhibitory/activatory counterparts. *J. Immunol.* **159**, 2075–7 (1997).
149. Muta, T. *et al.* A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIB modulates B-cell receptor signalling. *Nature* **368**, 70–3 (1994).
150. Daëron, M. *et al.* The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity* **3**, 635–46 (1995).
151. Amigorena, S. *et al.* Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science* **256**, 1808–12 (1992).
152. van der Poel, C. E., Spaapen, R. M., van de Winkel, J. G. J. & Leusen, J. H. W. Functional characteristics of the high affinity IgG receptor, FcγRI. *J. Immunol.* **186**, 2699–704 (2011).
153. Galon, J. *et al.* Soluble Fcγ receptor type III (FcγRIII, CD16) triggers cell activation through interaction with complement receptors. *J. Immunol.* **157**, 1184–92 (1996).
154. Kimberly, R. P., Ahlstrom, J. W., Click, M. E. & Edberg, J. C. The glycosyl phosphatidylinositol-linked Fc gamma RIIPMN mediates transmembrane signaling events distinct from Fc gamma RII. *J. Exp. Med.* **171**, 1239–55 (1990).
155. Unkeless, J. C., Shen, Z., Lin, C. W. & DeBeus, E. Function of human Fc gamma RIIA and Fc gamma RIIB. *Semin. Immunol.* **7**, 37–44 (1995).
156. Bruhns, P. Mouse and human FcR effector functions. 25–51 (2015).
157. Bruhns, P. *et al.* Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* **113**, 3716–25 (2009).
158. Allen, J. M. & Seed, B. Isolation and expression of functional high-affinity Fc receptor complementary DNAs. *Science* **243**, 378–81 (1989).
159. Harrison, P. T. & Allen, J. M. High affinity IgG binding by FcγRI (CD64) is

- modulated by two distinct IgSF domains and the transmembrane domain of the receptor. *Protein Eng.* **11**, 225–32 (1998).
160. Hayes, J. M. *et al.* Glycosylation and Fc receptors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **382**, 165–99 (2014).
 161. Lu, J., Ellsworth, J. L., Hamacher, N., Oak, S. W. & Sun, P. D. Crystal structure of Fcγ receptor I and its implication in high affinity γ-immunoglobulin binding. *J. Biol. Chem.* **286**, 40608–13 (2011).
 162. Fairchild, K. D., Hudson, R. G., Douglas, S. D., McKenzie, S. E. & Polin, R. A. Effect of gamma interferon on expression of Fc gamma receptors in monocytes of newborn infants and adults. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **3**, 464–9 (1996).
 163. Ravetch, J. V & Kinet, J. P. Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 457–92 (1991).
 164. Okayama, Y., Kirshenbaum, A. S. & Metcalfe, D. D. Expression of a functional high-affinity IgG receptor, Fc gamma RI, on human mast cells: Up-regulation by IFN-gamma. *J. Immunol.* **164**, 4332–9 (2000).
 165. Jönsson, F. *et al.* Human FcγRIIA induces anaphylactic and allergic reactions. *Blood* **119**, 2533–44 (2012).
 166. Zhao, W. *et al.* Fc gamma RIIa, not Fc gamma RIIb, is constitutively and functionally expressed on skin-derived human mast cells. *J. Immunol.* **177**, 694–701 (2006).
 167. Rosenfeld, S. I. *et al.* Human platelet Fc receptor for immunoglobulin G. Identification as a 40,000-molecular-weight membrane protein shared by monocytes. *J. Clin. Invest.* **76**, 2317–22 (1985).
 168. Sylvestre, D. L. & Ravetch, J. V. A dominant role for mast cell Fc receptors in the Arthus reaction. *Immunity* **5**, 387–90 (1996).
 169. Schmitt, D. A. *et al.* Human epidermal Langerhans cells express only the 40-kilodalton Fc gamma receptor (FcRII). *J. Immunol.* **144**, 4284–90 (1990).
 170. Sedmak, D. D., Davis, D. H., Singh, U., van de Winkel, J. G. & Anderson, C. L. Expression of IgG Fc receptor antigens in placenta and on endothelial cells in humans.

An immunohistochemical study. *Am. J. Pathol.* **138**, 175–81 (1991).

171. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **179**, 1109–18 (1994).
172. Warmerdam, P. A., van de Winkel, J. G., Vlug, A., Westerdaal, N. A. & Capel, P. J. A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding. *J. Immunol.* **147**, 1338–43 (1991).
173. Dutertre, C.-A. *et al.* A novel subset of NK cells expressing high levels of inhibitory FcgammaRIIB modulating antibody-dependent function. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 1511–20 (2008).
174. Veri, M.-C. *et al.* Monoclonal antibodies capable of discriminating the human inhibitory Fcgamma-receptor IIB (CD32B) from the activating Fcgamma-receptor IIA (CD32A): biochemical, biological and functional characterization. *Immunology* **121**, 392–404 (2007).
175. Magnusson, S. E., Engström, M., Jacob, U., Ulfgren, A.-K. & Kleinau, S. High synovial expression of the inhibitory FcgammaRIIb in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **9**, R51 (2007).
176. Cassard, L., Jönsson, F., Arnaud, S. & Daëron, M. Fcγ receptors inhibit mouse and human basophil activation. *J. Immunol.* **189**, 2995–3006 (2012).
177. Liu, Y. *et al.* Cytokine-mediated regulation of activating and inhibitory Fc gamma receptors in human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 767–76 (2005).
178. Bruhns, P. Review article Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* **119**, 5640–5650 (2015).
179. Warmerdam, P. A., Nabben, N. M., van de Graaf, S. A., van de Winkel, J. G. & Capel, P. J. The human low affinity immunoglobulin G Fc receptor IIC gene is a result of an unequal crossover event. *J. Biol. Chem.* **268**, 7346–9 (1993).
180. Metes, D. *et al.* Expression of functional CD32 molecules on human NK cells is

- determined by an allelic polymorphism of the FcgammaRIIC gene. *Blood* **91**, 2369–80 (1998).
181. van der Heijden, J. *et al.* Phenotypic variation in IgG receptors by nonclassical FCGR2C alleles. *J. Immunol.* **188**, 1318–24 (2012).
 182. Wang, W., Erbe, A. K., Hank, J. A., Morris, Z. S. & Sondel, P. M. NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
 183. Wu, J. *et al.* A novel polymorphism of FcgammaRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J. Clin. Invest.* **100**, 1059–70 (1997).
 184. Koene, H. R. *et al.* 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* **90**, 1109–14 (1997).
 185. Meknache, N., Jönsson, F., Laurent, J., Guinépain, M.-T. & Daëron, M. Human basophils express the glycosylphosphatidylinositol-anchored low-affinity IgG receptor FcgammaRIIB (CD16B). *J. Immunol.* **182**, 2542–50 (2009).
 186. Hulett, M. D., Witort, E., Brinkworth, R. I., McKenzie, I. F. & Hogarth, P. M. Multiple regions of human Fc gamma RII (CD32) contribute to the binding of IgG. *J. Biol. Chem.* **270**, 21188–94 (1995).
 187. Maxwell, K. F. *et al.* Crystal structure of the human leukocyte Fc receptor, Fc gammaRIIa. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 437–42 (1999).
 188. Burton, D. R. & Woof, J. M. Human antibody effector function. *Adv. Immunol.* **51**, 1–84 (1992).
 189. Duncan, A. R. & Winter, G. The binding site for C1q on IgG. *Nature* **332**, 738–40 (1988).
 190. Shields, R. L. *et al.* High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J. Biol. Chem.* **276**, 6591–604 (2001).
 191. Radaev, S., Motyka, S., Fridman, W. H., Sautes-Fridman, C. & Sun, P. D. The structure

- of a human type III Fcγ receptor in complex with Fc. *J. Biol. Chem.* **276**, 16469–77 (2001).
192. Ramsland, P. a *et al.* Structural Basis for Fc{gamma}RIIa Recognition of Human IgG and Formation of Inflammatory Signaling Complexes. *J. Immunol.* **187**, 3208–3217 (2011).
 193. Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V. & Jacob, U. The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc γRIII complex. *Nature* **406**, 267–273 (2000).
 194. Mizushima, T. *et al.* Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their Fc glycans. *Genes to Cells* **16**, 1071–1080 (2011).
 195. Ferrara, C. *et al.* Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγRIII and antibodies lacking core fucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 12669–74 (2011).
 196. Lu, J. *et al.* Structure of FcγRI in complex with Fc reveals the importance of glycan recognition for high-affinity IgG binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 833–8 (2015).
 197. Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V. & Jacob, U. The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc γRIII complex. *Nature* **406**, 267–73 (2000).
 198. Ravetch, J. V & Kinet, J. P. Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 457–92 (1991).
 199. Pottier, J., Thibault, G. & Watier, H. in *Immunothérapie des cancers au troisième millénaire* (ed. EDP Sciences) 233–245 (2014).
 200. Zitvogel, L., Hannani, D. & Martin, F. *Immunothérapie des cancers au troisième millénaire*. (2014).
 201. Cartron, G. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* **99**, 754–758 (2002).
 202. Weng, W.-K. & Levy, R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **21**, 3940–7 (2003).

203. Persky, D. O. *et al.* Fc Gamma Receptor 3a Genotype Predicts Overall Survival for Follicular Lymphoma Patients Treated On Southwest Oncology Group Trials with Combined Monoclonal Antibody Plus Chemotherapy but Not Chemotherapy Alone. *ASH Annu. Meet. Abstr.* **114**, 111 (2009).
204. Persky, D. O. *et al.* Fc gamma receptor 3a genotype predicts overall survival in follicular lymphoma patients treated on SWOG trials with combined monoclonal antibody plus chemotherapy but not chemotherapy alone. *Haematologica* **97**, 937–42 (2012).
205. K. A. Pierz, S. Gu, M. E. Lewis, S. Hsu, C. Falandry, G. A. Salles, M. F. Fey, G. Martinelli, F. Hitz, M. E. G. Predictive value of FCGR3A genotype on response to rituximab induction and maintenance therapy (MT) in follicular non-Hodgkin's lymphoma (NHL). in *ASCO Meeting Abstracts* (2010). at <http://meetinglibrary.asco.org/content/53062-74>
206. Veeramani, S. *et al.* Rituximab infusion induces NK activation in lymphoma patients with the high-affinity CD16 polymorphism. *Blood* **118**, 3347–9 (2011).
207. Milan, S., Wilson, S. E., Kahn, K. D. & Giordano, H. Investigation of Fc{gamma}R Polymorphisms and Response to IL-2 (Proleukin(R)) and Rituximab Treatment in Rituximab-Resistant NHL Patients: Importance of the F/F Polymorphism at Position 158 of the Fc{gamma}. *ASH Annu. Meet. Abstr.* **104**, 4621 (2004).
208. Nishio, M. *et al.* FCGR3A-158V/F Polymorphism May Correlate with the Levels of Immunoglobulin in Patients with Non-Hodgkin's Lymphoma after Rituximab Treatment as An Adjuvant to Autologous Stem Cell Transplantation. *ASH Annu. Meet. Abstr.* **112**, 3245 (2008).
209. Kim, D. H. *et al.* FCGR3A gene polymorphisms may correlate with response to frontline R-CHOP therapy for diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **108**, 2720–5 (2006).
210. Zhang, W., Wang, X., Duan, M.-H., Li, J. & Zhou, D.-B. [Efficacy of rituximab therapy on diffuse large B-cell lymphoma with different Fcgamma RIIIA gene polymorphisms: a prospective study]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **89**, 400–2 (2009).
211. Zhang, W., Wang, X., Li, J., Duan, M. & Zhou, D. Fcgamma receptor IIIA polymorphisms and efficacy of rituximab therapy on Chinese diffuse large B-cell

- lymphoma. *Chin. Med. J. (Engl)*. **123**, 198–202 (2010).
212. Ahlgrim, M. *et al*. The impact of Fc- γ receptor polymorphisms in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP with or without rituximab. *Blood* **118**, 4657–62 (2011).
 213. Cornec, D. *et al*. Identification of patients with indolent B cell lymphoma sensitive to rituximab monotherapy. *Ann. Hematol.* **91**, 715–21 (2012).
 214. Park, S. I. *et al*. The Predictive Value of FCGR3A Polymorphism on Clinical Outcomes of Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with R-CHOP Chemotherapy. *ASH Annu. Meet. Abstr.* **118**, 89 (2011).
 215. Zhuang, Y. *et al*. [Fc γ RIII a polymorphisms and efficacy of Rituximab combined chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma in Chinese patients]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* **35**, 816–21 (2014).
 216. Ghielmini, M. *et al*. Single agent rituximab in patients with follicular or mantle cell lymphoma: clinical and biological factors that are predictive of response and event-free survival as well as the effect of rituximab on the immune system: a study of the Swiss Group for Cli. *Ann. Oncol.* **16**, 1675–82 (2005).
 217. Boettcher, S. *et al*. Evidence for Fc{gamma} Receptor IIIA-Independent Rituximab Effector Mechanisms in Patients with Follicular Lymphoma Treated with Combined Immuno-Chemotherapy. *ASH Annu. Meet. Abstr.* **104**, 590 (2004).
 218. Prochazka, V. *et al*. Fc γ RIIIA receptor genotype does not influence an outcome in patients with follicular lymphoma treated with risk-adapted immunochemotherapy. *Neoplasma* **58**, 263–70 (2011).
 219. Ghesquieres. fcgr3 polymorphism does not significantly affect response and outcome of follicular lymphoma.PDF. (2011).
 220. Ghesquière, H. *et al*. Clinical outcome of patients with follicular lymphoma receiving chemoimmunotherapy in the PRIMA study is not affected by FCGR3A and FCGR2A polymorphisms. *Blood* **120**, 2650–7 (2012).
 221. Weng, W.-K., Rosenberg, A. & Levy, R. Immunoglobulin G Fc Receptor

- Polymorphisms and Clinical Course in Follicular Lymphoma Patients. *ASH Annu. Meet. Abstr.* **104**, 3250 (2004).
222. Carlotti, E. *et al.* FcγRIIIA and FcγRIIA polymorphisms do not predict clinical outcome of follicular non-Hodgkin's lymphoma patients treated with sequential CHOP and rituximab. *Haematologica* **92**, 1127–30 (2007).
 223. Maloney, D. G. *et al.* Fc{γ} Receptor Polymorphisms Do Not Influence Progression Free Survival (PFS) of Follicular NHL Patients Treated with Chop Followed by Rituximab (SWOG 9800). *ASH Annu. Meet. Abstr.* **104**, 589 (2004).
 224. Burkhardt, B. *et al.* Prognostic Impact of Fc Gamma-Receptor Polymorphisms and Efficacy of Rituximab in Children and Adolescents with Mature Aggressive B-NHL. *ASH Annu. Meet. Abstr.* **120**, 1547 (2012).
 225. Molnar, S. *et al.* FCγRIIIa Gene Polymorphisms as Response Predictor in Patients with Non-Hodgkin Lymphoma after Treatment with Anti-CD 20 Monoclonal Antibody (Rituximab). *ASH Annu. Meet. Abstr.* **110**, 4487 (2011).
 226. Mitrovic, Z. *et al.* FC RIIIA and FC RIIA polymorphisms are not associated with response to rituximab and CHOP in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* **92**, 998–999 (2007).
 227. Fabisiewicz, A., Paszkiewicz-Kozik, E., Osowiecki, M., Walewski, J. & Siedlecki, J. a. FcγRIIA and FcγRIIIA polymorphisms do not influence survival and response to rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone immunochemotherapy in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **52**, 1604–6 (2011).
 228. Váróczy, L. *et al.* Fc-gamma-receptor IIIa polymorphism and gene expression profile do not predict the prognosis in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP protocol. *Pathol. Oncol. Res.* **18**, 43–8 (2012).
 229. Ahlgrim, M. *et al.* Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of FC{γ}RIIA and FC{γ}RIIIA in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma Have No Impact On Treatment Outcome of Elderly Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) Treated with CHOP with and without. *ASH Annu. Meet. Abstr.* **114**, 3956

(2009).

230. Kasamon, Y. L. *et al.* Nonmyeloablative Allogeneic (Allo) BMT for B-Cell Lymphoma with Posttransplant Rituximab: Donor Selection by Prioritizing FCGR3A-158 Polymorphism Over HLA Matching. *ASH Annu. Meet. Abstr.* **120**, 3107 (2012).
231. Ghesquieres, H. *et al.* Paper: FCGR3A and FCGR2A Polymorphisms Do Not Affect Response and Outcome of Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with Rituximab and Chemotherapy. A Study Based on 554 Patients Included in GELA (Groupe d'Etude des Lymphomes de. (2011). at <<http://oncology.by/uplds/ASH/MAC/webprogramcd/Paper41368.html>>
232. Liu, F. *et al.* FCGR3A 158V/F polymorphism and response to frontline R-CHOP therapy in diffuse large B-cell lymphoma. *DNA Cell Biol.* **33**, 616–23 (2014).
233. Galimberti, S. *et al.* The efficacy of rituximab plus Hyper-CVAD regimen in mantle cell lymphoma is independent of FCgammaRIIIa and FCgammaRIIa polymorphisms. *J. Chemother.* **19**, 315–21 (2007).
234. Farag, S. S. *et al.* Fc gamma RIIIa and Fc gamma RIIa polymorphisms do not predict response to rituximab in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **103**, 1472–1474 (2004).
235. Dornan, D. *et al.* Effect of FCGR2A and FCGR3A variants on CLL outcome. *Blood* **116**, 4212–22 (2010).
236. Treon, S. P. *et al.* Polymorphisms in FcgammaRIIIA (CD16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenström's macroglobulinemia. *J. Clin. Oncol.* **23**, 474–81 (2005).
237. Z. R. Hunter, G. Yang, L. I. Ioakimidis, C. A. Hanzis, R. J. Manning, C. J. Patterson, P. S. Sheehy, P. Gong, L. Xu, S. P. T. Association of CR/VGPR with progression-free survival in rituximab-naïve WM pat. in *ASCO Meeting Abstracts* (2010). at <<http://meetinglibrary.asco.org/print/579474>>
238. Treon, S. P. *et al.* Attainment of complete/very good partial response following rituximab-based therapy is an important determinant to progression-free survival, and is impacted by polymorphisms in FCGR3A in Waldenstrom macroglobulinaemia. *Br. J.*

Haematol. **154**, 223–8 (2011).

239. Zimmermann, H. *et al.* Fc γ -receptor IIIA polymorphism p.158F has no negative predictive impact on rituximab therapy with and without sequential chemotherapy in CD20-positive posttransplant lymphoproliferative disorder. *J. Immunol. Res.* **2014**, 264723 (2014).
240. Anolik, J. H. *et al.* The relationship of Fc γ RIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **48**, 455–9 (2003).
241. Robledo, G. *et al.* Association of the FCGR3A-158F/V gene polymorphism with the response to rituximab treatment in Spanish systemic autoimmune disease patients. *DNA Cell Biol.* **31**, 1671–7 (2012).
242. Kastbom, A. *et al.* Influence of FCGR3A genotype on the therapeutic response to rituximab in rheumatoid arthritis: an observational cohort study. *BMJ Open* **2**, (2012).
243. Ruysen-Witrand, a *et al.* Fc γ receptor type IIIA polymorphism influences treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 875–7 (2012).
244. Quartuccio, L. *et al.* The 158VV Fc γ receptor 3A genotype is associated with response to rituximab in rheumatoid arthritis: results of an Italian multicentre study. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 716–21 (2014).
245. Sarsour, K. *et al.* The role of the Fc γ RIIIa polymorphism in modifying the association between treatment and outcome in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab versus TNF- α antagonist therapies. *Clin. Exp. Rheumatol.* **31**, 189–94 (2013).
246. Tran, H. *et al.* Paper: A Multi-Centre, Single-Arm, Open-Label Study Evaluating the Safety and Efficacy of Fixed Dose Rituximab in Patients with Refractory, Relapsing or Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura (R-ITP1000 Study) and Exploring Rituximab Response with th. (2011). at <<https://ash.confex.com/ash/2011/webprogram/Paper40406.html>>
247. Cooper, N. *et al.* Platelet-associated antibodies, cellular immunity and FCGR3a

- genotype influence the response to rituximab in immune thrombocytopenia. *Br. J. Haematol.* **158**, 539–47 (2012).
248. Quartuccio, L. *et al.* Rituximab treatment for glomerulonephritis in HCV-associated mixed cryoglobulinaemia: efficacy and safety in the absence of steroids. *Rheumatology (Oxford)*. **45**, 842–6 (2006).
 249. Gragnani, L. *et al.* Genetic determinants in hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia: role of polymorphic variants of BAFF promoter and Fcγ receptors. *Arthritis Rheum.* **63**, 1446–51 (2011).
 250. Li, S.-C. *et al.* Rituximab-induced late-onset neutropenia in newly diagnosed B-cell lymphoma correlates with Fc receptor FcγRIIIa 158(V/F) polymorphism. *Am. J. Hematol.* **85**, 810–2 (2010).
 251. Keane, C. *et al.* Homozygous FCGR3A-158V alleles predispose to late onset neutropenia after CHOP-R for diffuse large B-cell lymphoma. *Intern. Med. J.* **42**, 1113–9 (2012).
 252. Weng, W.-K., Horning, S. J., Negrin, R. S. & Levy, R. Immunoglobulin G Fc Polymorphism Is Correlated with Rituximab-Induced Neutropenia Following Autologous Hematopoietic Cell Transplantation. *ASH Annu. Meet. Abstr.* **104**, 442 (2004).
 253. Kim, S.-H. *et al.* Treatment Outcomes With Rituximab in 100 Patients With Neuromyelitis Optica. *JAMA Neurol.* **72**, 989–995 (2015).
 254. Stork, A. C. J. *et al.* Fcγ receptor IIIA genotype is associated with rituximab response in antimyelin-associated glycoprotein neuropathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* (2014). doi:10.1136/jnnp-2013-306958
 255. Forero-Torres, A. *et al.* Results of a phase 1 study of AME-133v (LY2469298), an Fc-engineered humanized monoclonal anti-CD20 antibody, in FcγRIIIa-genotyped patients with previously treated follicular lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **18**, 1395–403 (2012).
 256. Tobinai, K. *et al.* Phase I study of LY2469298, an Fc-engineered humanized anti-CD20 antibody, in patients with relapsed or refractory follicular lymphoma. *Cancer Sci.* **102**,

432–8 (2011).

- 257. Czuczman, M. *et al.* Fc-Gamma Receptor IIIa and Interferon-Gamma SNPs Do Not Predict Responsiveness of Follicular Lymphoma to Galiximab (Anti-CD80 Antibody). *ASH Annu. Meet. Abstr.* **104**, 3292 (2004).
- 258. Lin, T. S. *et al.* FCGR3A and FCGR2A polymorphisms may not correlate with response to alemtuzumab in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **105**, 289–91 (2005).
- 259. de Vos, S. *et al.* A phase II study of dacetuzumab (SGN-40) in patients with relapsed diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and correlative analyses of patient-specific factors. *J. Hematol. Oncol.* **7**, 44 (2014).
- 260. Julià, M. *et al.* The Role of Fcγ Receptor Polymorphisms in the Response to Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy in Psoriasis: A Pharmacogenetic Study. *JAMA Dermatol.* **149**, 1033–1039 (2013).
- 261. Tutuncu, Z. *et al.* Fcγ receptor type IIIA polymorphisms influence treatment outcomes in patients with inflammatory arthritis treated with tumor necrosis factor alpha-blocking agents. *Arthritis Rheum.* **52**, 2693–6 (2005).
- 262. Tsukahara, S. *et al.* A polymorphism in the gene encoding the Fcγ receptor type IIIA is a possible genetic marker to predict the primary response to infliximab in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 1791–2 (2008).
- 263. Cañete, J. D. *et al.* Influence of variants of Fc γ receptors IIA and IIIA on the American College of Rheumatology and European League Against Rheumatism responses to anti-tumour necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 1547–52 (2009).
- 264. Kastbom, A. *et al.* Fcγ receptor type IIIA genotype and response to tumor necrosis factor alpha-blocking agents in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **56**, 448–52 (2007).
- 265. Rooryck, C. *et al.* Influence of FCGR3A-V212F and TNFRSF1B-M196R genotypes in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab therapy. *Clin. Exp. Rheumatol.* **26**, 340–2 (2008).

266. Morales-Lara, M. J. *et al.* Association between the FCGR3A V158F polymorphism and the clinical response to infliximab in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients. *Scand. J. Rheumatol.* **39**, 518–20 (2010).
267. Montes, A. *et al.* FCGR polymorphisms in the treatment of rheumatoid arthritis with Fc-containing TNF inhibitors. *Pharmacogenomics* **16**, 333–45 (2015).
268. Moroi, R. *et al.* FCGR3A-158 polymorphism influences the biological response to infliximab in Crohn's disease through affecting the ADCC activity. *Immunogenetics* **65**, 265–71 (2013).
269. Louis, E. J. *et al.* Polymorphism in IgG Fc receptor gene FCGR3A and response to infliximab in Crohn's disease: a subanalysis of the ACCENT I study. *Pharmacogenet. Genomics* **16**, 911–4 (2006).
270. Tomita, K., Chiba, T., Sugai, T. & Habano, W. Association between tumor necrosis factor-alpha and Fc-gamma receptor polymorphisms with infliximab in Crohn's disease. *Hepatogastroenterology*. **57**, 535–9 (2010).
271. Ramírez, J. *et al.* FCGR2A/CD32A and FCGR3A/CD16A variants and EULAR response to tumor necrosis factor- α blockers in psoriatic arthritis: a longitudinal study with 6 months of followup. *J. Rheumatol.* **39**, 1035–41 (2012).
272. Criswell, L. A. *et al.* The influence of genetic variation in the HLA-DRB1 and LTA-TNF regions on the response to treatment of early rheumatoid arthritis with methotrexate or etanercept. *Arthritis Rheum.* **50**, 2750–6 (2004).
273. Zhang, W. *et al.* FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3712–8 (2007).
274. Bibeau, F. Association of Fc{gamma}RIIa and Fc{gamma}RIIa polymorphisms with clinical outcome in metastatic colorectal cancer patients (mCRC) treated with cetuximab and irinotecan -- Bibeau et al. 26 (15 Supplement): 11004 -- ASCO Meeting Abstracts. at <http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/short/26/15_suppl/11004>
275. Bibeau, F. *et al.* Impact of Fc{gamma}RIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and

- KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1122–9 (2009).
276. Pander, J. *et al.* Correlation of FCGR3A and EGFR germline polymorphisms with the efficacy of cetuximab in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* **46**, 1829–34 (2010).
 277. Zhang, W. *et al.* Molecular predictors of combination targeted therapies (cetuximab, bevacizumab) in irinotecan-refractory colorectal cancer (BOND-2 study). *Anticancer Res.* **30**, 4209–17 (2010).
 278. Dahan, L. *et al.* Pharmacogenetic profiling and cetuximab outcome in patients with advanced colorectal cancer. *BMC Cancer* **11**, 496 (2011).
 279. Calemme, R. *et al.* Fc gamma receptor IIIa polymorphisms in advanced colorectal cancer patients correlated with response to anti-EGFR antibodies and clinical outcome. *J. Transl. Med.* **10**, 232 (2012).
 280. Rodríguez, J. *et al.* Fc gamma receptor polymorphisms as predictive markers of Cetuximab efficacy in epidermal growth factor receptor downstream-mutated metastatic colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* **48**, 1774–80 (2012).
 281. Etienne-Grimaldi, M.-C. *et al.* Multifactorial pharmacogenetic analysis in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil-based therapy together with cetuximab-irinotecan. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **73**, 776–85 (2012).
 282. Inoue, Y. *et al.* FcγR and EGFR Polymorphisms as Predictive Markers of Cetuximab Efficacy in Metastatic Colorectal Cancer. *Mol. Diagn. Ther.* 541–548 (2014). doi:10.1007/s40291-014-0103-6
 283. Inoue, Y. *et al.* [Relationship between Polymorphisms and the Efficacy of Cetuximab]. *Gan To Kagaku Ryoho.* **42**, 1310–2 (2015).
 284. Paez, D. *et al.* Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and KRAS mutations: are they useful biomarkers of clinical outcome in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR-based therapy? *Cancer Sci.* **101**, 2048–53 (2010).
 285. Soeda, H., Shimodaira, H. & Ishioka, C. [Predictive biomarkers of anti-EGFR

- monoclonal anti-body in colorectal cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho*. **38**, 1079–83 (2011).
286. Park, S. J. *et al.* Genetic polymorphisms of FcγRIIa and FcγRIIIa are not predictive of clinical outcomes after cetuximab plus irinotecan chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Oncology* **82**, 83–9 (2012).
287. Negri, F. V *et al.* Role of immunoglobulin G fragment C receptor polymorphism-mediated antibody-dependant cellular cytotoxicity in colorectal cancer treated with cetuximab therapy. *Pharmacogenomics J.* **14**, 14–9 (2014).
288. Geva, R. *et al.* FCGR polymorphisms and cetuximab efficacy in chemorefractory metastatic colorectal cancer: an international consortium study. *Gut* 1–8 (2014). doi:10.1136/gutjnl-2014-307234
289. Kjersem, J. B. *et al.* FCGR2A and FCGR3A polymorphisms and clinical outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line 5-fluorouracil/folinic acid and oxaliplatin +/- cetuximab. *BMC Cancer* **14**, 340 (2014).
290. Srivastava, R. M. *et al.* Cetuximab-activated natural killer and dendritic cells collaborate to trigger tumor antigen-specific T-cell immunity in head and neck cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **19**, 1858–72 (2013).
291. Han, S.-W. *et al.* Epidermal growth factor receptor intron 1 CA dinucleotide repeat polymorphism and survival of advanced gastric cancer patients treated with cetuximab plus modified FOLFOX6. *Cancer Sci.* **101**, 793–9 (2010).
292. Maubec, E. *et al.* Phase II study of cetuximab as first-line single-drug therapy in patients with unresectable squamous cell carcinoma of the skin. *J. Clin. Oncol.* **29**, 3419–26 (2011).
293. Wang, B., Kokhaei, P., Mellstedt, H. & Liljefors, M. FcγR polymorphisms and clinical outcome in colorectal cancer patients receiving passive or active antibody treatment. *Int. J. Oncol.* **37**, 1599–606 (2010).
294. Cohn, a L. *et al.* A randomized, placebo-controlled phase 2 study of ganitumab or conatumumab in combination with FOLFIRI for second-line treatment of mutant KRAS metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* **24**, 1777–85 (2013).

295. Musolino, A. *et al.* Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 1789–96 (2008).
296. Boero, S. *et al.* Analysis of in vitro ADCC and clinical response to trastuzumab: possible relevance of FcγRIIIA/FcγRIIA gene polymorphisms and HER-2 expression levels on breast cancer cell lines. *J. Transl. Med.* **13**, 324 (2015).
297. Foster, C. *et al.* FCGR3A V/F polymorphism does not predict response to herceptin therapy. in *ASCO Meeting Abstracts* Abstract 227 (2002).
298. Tamura, K. *et al.* FcγR2A and 3A polymorphisms predict clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic settings in patients with HER2-positive breast cancer. *Ann. Oncol.* **22**, 1302–7 (2011).
299. Hurvitz, S. A. *et al.* Analysis of Fcγ receptor IIIa and IIa polymorphisms: lack of correlation with outcome in trastuzumab-treated breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **18**, 3478–86 (2012).
300. Jung, M. *et al.* Overexpression of class III beta tubulin and amplified HER2 gene predict good response to paclitaxel and trastuzumab therapy. *PLoS One* **7**, e45127 (2012).
301. Kim, J.-W. *et al.* ABCB1, FCGR2A, and FCGR3A polymorphisms in patients with HER2-positive metastatic breast cancer who were treated with first-line taxane plus trastuzumab chemotherapy. *Oncology* **83**, 218–27 (2012).
302. Roca, L. *et al.* Correlation of HER2, FCGR2A, and FCGR3A gene polymorphisms with trastuzumab related cardiac toxicity and efficacy in a subgroup of patients from UNICANCER-PACS 04 trial. *Breast Cancer Res. Treat.* **139**, 789–800 (2013).
303. Norton, N. *et al.* Association Studies of Fcγ Receptor Polymorphisms with Outcome in HER2+ Breast Cancer Patients Treated with Trastuzumab in NCCTG (Alliance) Trial N9831. *Cancer Immunol. Res.* (2014). doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0059
304. Huang, L. *et al.* Efficacy and safety analysis of trastuzumab and paclitaxel based regimen plus carboplatin or epirubicin as neoadjuvant therapy for clinical stage II-III, HER2-positive breast cancer patients: a phase 2, open-label, multicenter, randomized trial.

- Oncotarget* **6**, 18683–92 (2015).
305. Miolo, G. *et al.* Anthracycline-free neoadjuvant therapy induces pathological complete responses by exploiting immune proficiency in HER2+ breast cancer patients. *BMC Cancer* **14**, 954 (2014).
 306. Y. Pan, V. Haddad, T. Sabin, N. Baker, Y. J. Hei, F. Galimi, J. Graves, C. H. and S. C. Predictive value of Fc gamma receptor IIIa genotype in response to conatumumab in three phase II studies. -- Pan et al. 29 (15): 3103 -- ASCO Meeting Abstracts. *ASCO Abstracts* (2011). at
<http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/short/29/15_suppl/3103?rss=1>
 307. Paz-Ares, L. *et al.* A randomized phase 2 study of paclitaxel and carboplatin with or without conatumumab for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **8**, 329–37 (2013).
 308. Delgado, D. C. *et al.* Genotypes of NK cell KIR receptors, their ligands, and Fcγ receptors in the response of neuroblastoma patients to Hu14.18-IL2 immunotherapy. *Cancer Res.* **70**, 9554–61 (2010).
 309. Ternant, D. *et al.* Influence of FcγRIIIA genetic polymorphism on T-lymphocyte depletion induced by rabbit antithymocyte globulins in kidney transplant patients. *Pharmacogenet. Genomics* **24**, 26–34 (2014).
 310. Kumpel, B. M., De Haas, M., Koene, H. R., Van De Winkel, J. G. J. & Goodrick, M. J. Clearance of red cells by monoclonal IgG3 anti-D in vivo is affected by the VF polymorphism of FcγRIIIa (CD16). *Clin. Exp. Immunol.* **132**, 81–6 (2003).
 311. Miescher, S. *et al.* A single recombinant anti-RhD IgG prevents RhD immunization: association of RhD-positive red blood cell clearance rate with polymorphisms in the FcγRIIA and FcγRIIIA genes. *Blood* **103**, 4028–35 (2004).
 312. Ransom, D. H. Prophylactic effect of antitoxin on the child in utero. *J. Am. Med. Assoc.* **LII**, 556 (1909).
 313. BRAMBELL, F. W., HEMMINGS, W. A. & MORRIS, I. G. A THEORETICAL MODEL OF GAMMA-GLOBULIN CATABOLISM. *Nature* **203**, 1352–4 (1964).

314. Brambell, F. W. The transmission of immune globulins from the mother to the foetal and newborn young. *Proc. Nutr. Soc.* **28**, 35–41 (1969).
315. Brambell, F. W. The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins. *Lancet* **2**, 1087–1093 (1966).
316. Rodewald, R. pH-dependent binding of immunoglobulins to intestinal cells of the neonatal rat. *J. Cell Biol.* **71**, 666–9 (1976).
317. Simister, N. E. & Mostov, K. E. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature* **337**, 184–187 (1989).
318. Challa, D. K., Velmurugan, R., Ober, R. J. & Sally Ward, E. FcRn: from molecular interactions to regulation of IgG pharmacokinetics and functions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **382**, 249–72 (2014).
319. Kuo, T. T. *et al.* N-glycan moieties in neonatal Fc receptor determine steady-state membrane distribution and directional transport of IgG. *J. Biol. Chem.* **284**, 8292–8300 (2009).
320. Anderson, C. L. *et al.* Perspective-- FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine. *Trends Immunol.* **27**, 343–8 (2006).
321. Popov, S. *et al.* The stoichiometry and affinity of the interaction of murine Fc fragments with the MHC class I-related receptor, FcRn. *Mol. Immunol.* **33**, 521–30 (1996).
322. Raghavan, M., Gastinel, L. N. & Bjorkman, P. J. The class I major histocompatibility complex related Fc receptor shows pH-dependent stability differences correlating with immunoglobulin binding and release. *Biochemistry* **32**, 8654–60 (1993).
323. Sockolosky, J. T. & Szoka, F. C. The neonatal Fc receptor, FcRn, as a target for drug delivery and therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **91**, 109–124 (2015).
324. Oganessian, V. *et al.* Structural insights into neonatal Fc receptor-based recycling mechanisms. *J. Biol. Chem.* **289**, 7812–7824 (2014).
325. Huang, X., Zheng, F. & Zhan, C.-G. Binding structures and energies of the human neonatal Fc receptor with human Fc and its mutants by molecular modeling and

- dynamics simulations. *Mol. Biosyst.* **9**, 3047–58 (2013).
326. Ober, R. J., Martinez, C., Vaccaro, C., Zhou, J. & Ward, E. S. Visualizing the site and dynamics of IgG salvage by the MHC class I-related receptor, FcRn. *J. Immunol.* **172**, 2021–2029 (2004).
 327. Ward, E. S. *et al.* From sorting endosomes to exocytosis: association of Rab4 and Rab11 GTPases with the Fc receptor, FcRn, during recycling. *Mol. Biol. Cell* **16**, 2028–38 (2005).
 328. Ober, R. J., Martinez, C., Lai, X., Zhou, J. & Ward, E. S. Exocytosis of IgG as mediated by the receptor, FcRn: an analysis at the single-molecule level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 11076–81 (2004).
 329. Vidarsson, G. *et al.* FcRn: An IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Blood* **108**, 3573–3579 (2006).
 330. Jefferis, R., Lund, J. & Pound, J. D. IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunol. Rev.* **163**, 59–76 (1998).
 331. Deisenhofer, J. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry* **20**, 2361–70 (1981).
 332. Sauer-Eriksson, A. E., Kleywegt, G. J., Uhlén, M. & Jones, T. A. Crystal structure of the C2 fragment of streptococcal protein G in complex with the Fc domain of human IgG. *Structure* **3**, 265–78 (1995).
 333. Stone, G. C. *et al.* The Fc binding site for streptococcal protein G is in the C gamma 2-C gamma 3 interface region of IgG and is related to the sites that bind staphylococcal protein A and human rheumatoid factors. *J. Immunol.* **143**, 565–70 (1989).
 334. Björck, L. & Kronvall, G. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J. Immunol.* **133**, 969–74 (1984).
 335. Van Loghem, E., Frangione, B., Recht, B. & Franklin, E. C. Staphylococcal protein A and human IgG subclasses and allotypes. *Scand. J. Immunol.* **15**, 275–8 (1982).

336. Derrick, J. P. & Wigley, D. B. The third IgG-binding domain from streptococcal protein G. An analysis by X-ray crystallography of the structure alone and in a complex with Fab. *J. Mol. Biol.* **243**, 906–18 (1994).
337. Lian, L. Y., Barsukov, I. L., Derrick, J. P. & Roberts, G. C. Mapping the interactions between streptococcal protein G and the Fab fragment of IgG in solution. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 355–7 (1994).
338. Perosa, F., Luccarelli, G. & Dammacco, F. Absence of streptococcal protein G (PG)-specific determinant in the Fab region of human IgG2. *Clin. Exp. Immunol.* **109**, 272–8 (1997).
339. Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. & Winter, G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* **332**, 323–7 (1988).
340. Isaacs, J. D. *et al.* A therapeutic human IgG4 monoclonal antibody that depletes target cells in humans. *Clin. Exp. Immunol.* **106**, 427–33 (1996).
341. Hussain, K. *et al.* Upregulation of FcγRIIb on monocytes is necessary to promote the superagonist activity of TGN1412. *Blood* **125**, 102–110 (2015).
342. Rispen, T. & Vidarsson, G. in *Antibody Fc* 159–177 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-394802-1.00009-1
343. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–7 (1975).
344. Wade, N. Hybridomas : The Making a Revolution Scientific prize committees sometimes skimp on their homework . The awards for. *Science (80-.)*. **215**, (1982).
345. Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A. & Oi, V. T. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 6851–5 (1984).
346. Oxford Centre for Innovation. Absolute Antibody. (2015). at <<http://absoluteantibody.com/>>
347. McCafferty, J., Griffiths, a D., Winter, G. & Chiswell, D. J. Phage antibodies:

- filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 552–554 (1990).
348. Skerra, a & Plückthun, a. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**, 1038–1041 (1988).
 349. Green, L. L. *et al.* Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat. Genet.* **7**, 13–21 (1994).
 350. Lonberg, N. *et al.* Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* **368**, 856–859 (1994).
 351. Organisation Mondiale de la Santé. Les dénominations communes internationales (DCI). at <<http://www.who.int/medicines/services/inn/innguidance/fr/>>
 352. OMPI. Comité permanent du droit des brevets de l'Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle. (2014).
 353. Surga E. Le rituximab: revue de son utilisation au sein des cinq centres hospitaliers universitaires du Québec, protocole du Programme de Gestion Thérapeutique des Médicaments (PGTM). (2011).
 354. WHO Drug Information. International Nonproprietary Names. **23**, 195–199 (2009).
 355. WHO. General policies for monoclonal antibodies. *INN Work. Doc. 09.251* 1–3 (2009).
 356. World Health Organization (WHO). 60th Consultation on International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances. *Exec. Summ.* 8–9 (2015). doi:10.1002/yd.20002
 357. Sally Pepper, Malan, S., Mignot, G. & Mattavelli, R. B. WHO Programme on International Nonproprietary Names (INN). *Work. Doc. 15.381* 29–34 (2015).
 358. World Health Organization (WHO). International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review). *World Heal. Organ.* 8–10 (2014). at <<http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>>
 359. Jones, T. D. *et al.* The INNs and outs of antibody nonproprietary names. *MAbs* **8**, 1–9 (2016).
 360. Koide, N., Nose, M. & Muramatsu, T. Recognition of IgG by Fc receptor and

- complement: Effects of glycosidase digestion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**, 838–844 (1977).
361. Winkelhake, J. L. & Nicolson, G. L. Aglycosylantibody. Effects of exoglycosidase treatments on autochthonous antibody survival time in the circulation. *J. Biol. Chem.* **251**, 1074–80 (1976).
 362. Williams, R. C., Osterland, C. K., Margherita, S., Tokuda, S. & Messner, R. P. Studies of biologic and serologic activities of rabbit-IgG antibody depleted of carbohydrate residues. *J. Immunol.* **111**, 1690–8 (1973).
 363. Nose, M. & Wigzell, H. Biological significance of carbohydrate chains on monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 6632–6 (1983).
 364. Leatherbarrow, R. J. *et al.* Effector functions of a monoclonal aglycosylated mouse IgG2a: binding and activation of complement component C1 and interaction with human monocyte Fc receptor. *Mol. Immunol.* **22**, 407–15 (1985).
 365. Leatherbarrow, R. J. & Dwek, R. A. The effect of aglycosylation on the binding of mouse IgG to staphylococcal protein A. *FEBS Lett.* **164**, 227–30 (1983).
 366. Frenzel, A., Hust, M. & Schirrmann, T. Expression of recombinant antibodies. *Front. Immunol.* **4**, 1–20 (2013).
 367. Houde, D., Peng, Y., Berkowitz, S. A. & Engen, J. R. Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 1716–28 (2010).
 368. Hodoniczky, J., Zheng, Y. Z. & James, D. C. Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc N-glycan remodeling in vitro. *Biotechnol. Prog.* **21**, 1644–52
 369. Scallon, B. J., Tam, S. H., McCarthy, S. G., Cai, A. N. & Raju, T. S. Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Mol. Immunol.* **44**, 1524–1534 (2007).
 370. Millward, T. A. *et al.* Effect of constant and variable domain glycosylation on pharmacokinetics of therapeutic antibodies in mice. *Biologicals* **36**, 41–7 (2008).

371. Goetze, A. M. *et al.* High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans. *Glycobiology* **21**, 949–59 (2011).
372. Zou, G. *et al.* Chemoenzymatic synthesis and Fc γ receptor binding of homogeneous glycoforms of antibody Fc domain. Presence of a bisecting sugar moiety enhances the affinity of Fc to Fc γ IIIa receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 18975–91 (2011).
373. Kanda, Y. *et al.* Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types. *Glycobiology* **17**, 104–18 (2007).
374. Shinkawa, T. *et al.* The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **278**, 3466–73 (2003).
375. Ferrara, C., Stuart, F., Sondermann, P., Br unker, P. & Uma a, P. The carbohydrate at Fc γ RIIIa Asn-162. An element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms. *J. Biol. Chem.* **281**, 5032–6 (2006).
376. Yamane-Ohnuki, N. *et al.* Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnol. Bioeng.* **87**, 614–22 (2004).
377. Uma a, P., Jean-Mairet, J., Moudry, R., Amstutz, H. & Bailey, J. E. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat. Biotechnol.* **17**, 176–80 (1999).
378. Klein, M. *et al.* Expression of biological effector functions by immunoglobulin G molecules lacking the hinge region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 524–8 (1981).
379. Rother, R. P., Rollins, S. a, Mojcik, C. F., Brodsky, R. a & Bell, L. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1256–64 (2007).
380. Duncan, a R., Woof, J. M., Partridge, L. J., Burton, D. R. & Winter, G. Localization of the binding site for the human high-affinity Fc receptor on IgG. *Nature* **332**, 563–4

- (1988).
381. Duncan, a R. & Winter, G. The binding site for C1q on IgG. *Nature* **332**, 738–740 (1988).
 382. Hezareh, M., Hessel, A. J., Jensen, R. C., van de Winkel, J. G. J. & Parren, P. W. H. I. Effector Function Activities of a Panel of Mutants of a Broadly Neutralizing Antibody against Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* **75**, 12161–12168 (2001).
 383. Moldt, B. *et al.* A panel of IgG1 b12 variants with selectively diminished or enhanced affinity for Fcγ receptors to define the role of effector functions in protection against HIV. *J. Virol.* **85**, 10572–81 (2011).
 384. Richards, J. O. *et al.* Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 2517–27 (2008).
 385. Petkova, S. B. *et al.* Enhanced half-life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease. *Int. Immunol.* **18**, 1759–69 (2006).
 386. Smith, P., DiLillo, D. J., Bournazos, S., Li, F. & Ravetch, J. V. Mouse model recapitulating human Fcγ receptor structural and functional diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 6181–6 (2012).
 387. Moore, G. L., Chen, H., Karki, S. & Lazar, G. A. Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *MAbs* **2**, 181–9
 388. Tao, M. H. & Morrison, S. L. Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region. *J. Immunol.* **143**, 2595–601 (1989).
 389. Idusogie, E. E. *et al.* Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *J. Immunol.* **166**, 2571–5 (2001).
 390. Yeung, Y. A. *et al.* Engineering human IgG1 affinity to human neonatal Fc receptor: impact of affinity improvement on pharmacokinetics in primates. *J. Immunol.* **182**, 7663–71 (2009).

391. Armour, K. L., Clark, M. R., Hadley, A. G. & Williamson, L. M. Recombinant human IgG molecules lacking Fcγ receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur. J. Immunol.* **29**, 2613–24 (1999).
392. Lazar, G. a *et al.* Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4005–10 (2006).
393. Stavenhagen, J. B. *et al.* Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating Fcγ receptors. *Cancer Res.* **67**, 8882–90 (2007).
394. Dall’Acqua, W. F. *et al.* Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor: biological consequences. *J. Immunol.* **169**, 5171–80 (2002).
395. Datta-Mannan, A. *et al.* Humanized IgG1 variants with differential binding properties to the neonatal Fc receptor: relationship to pharmacokinetics in mice and primates. *Drug Metab. Dispos.* **35**, 86–94 (2007).
396. Mimoto, F. *et al.* Engineered antibody Fc variant with selectively enhanced FcγRIIb binding over both FcγRIIa(R131) and FcγRIIa(H131). *Protein Eng. Des. Sel.* **26**, 589–98 (2013).
397. Horton, H. M. *et al.* Antibody-mediated coengagement of FcγRIIb and B cell receptor complex suppresses humoral immunity in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **186**, 4223–33 (2011).
398. Anghelescu, D. L. *et al.* Comparison of pain outcomes between two anti-GD2 antibodies in patients with neuroblastoma. *Pediatr. Blood Cancer* **21**, 193–201 (2014).
399. Tse, B. C., Navid, F., Billups, C. A., O’Donnell, T. & Hoehn, M. E. Ocular abnormalities in patients treated with a novel anti-GD2 monoclonal antibody, hu14.18K322A. *J. AAPOS* **19**, 112–5 (2015).
400. OMC. Accord sur les aspects des droits de propriété intellectuelle qui touchent au commerce (ADPIC). 349–396 (1994).
401. Py, E., Raynard, J. & Treffigny, P. *Droit de la propriété industrielle 5e édition.* (2016).

402. Michel Vivant. *Juge et loi du brevet : approche du droit de brevet*. (1977).
403. George F Takach. *Patents: A Canadian compendium of law and practice*. (1993).
404. Plasseraud, Y. & Sauvignon, F. *L'État et l'invention – Histoire des brevets*. (1986).
405. Gordon F. Henderson. *Patent Law of Canada*. (1997).
406. lintern@ute. Première loi sur les brevets. at http://www.linternaute.com/histoire/jour/evenement/7/1/1/a/47673/premiere_loi_sur_les_brevets.shtml
407. Galvez-behar, G. L'Etat et les brevets d'invention (1791-1922): une relation embarrassée. (2010).
408. Penrose, E. & Machlup, F. The Patent Controversy in XIXth Century. *J. Econ. Hist.* **10**, 1–29 (1950).
409. Dominique Margairaz. *François de Neufchâteau : biographie intellectuelle*. (Publications de la Sorbonne, Paris, 2005).
410. Joost Mertens. Technology as the science of the industrial arts : Louis-Sébastien Lenormand (1757-1837) and the popularization of technology. *Hist. Technol.* **18**, 203–231 (2002).
411. Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle. Résumé de la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle. (1883). at http://www.wipo.int/treaties/fr/ip/paris/summary_paris.html
412. Savignon, F. & Plasseraud, Y. *Genèse du droit unioniste des brevets*,. (1883).
413. Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle. Résumé de la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle. (1883).
414. Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle. Bref historique de l'OMPI. at <http://www.wipo.int/about-wipo/fr/history.html>
415. Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle. Traité de coopération en matière de brevets ('PCT'). at <http://www.wipo.int/pct/fr/treaty/about.html>

416. OEB. Historique de l'Office Européen des Brevets. at <https://www.epo.org/about-us/office/timeline_fr.html#>
417. Burst, J., Azema, J., Galloux, J. & Chavanne, A. *Droit de la propriété industrielle (7e édition)*. (2012).
418. Grosset-Fournier, C. & Dacheux, A. *Le brevet d'invention, guide pratique en 101 questions : la cause des inventeurs*. (2012).
419. Office Européen des brevets. Comment obtenir un brevet européen. (2016). at <https://www.epo.org/applying/basics_fr.html>
420. Bernard, J. Biomédicaments en France état des lieux 2014. (2014).
421. Sophie Gautier. Médicaments et médias: comment prescrire aujourd'hui ? *Pharmacologie* (2013). at <<http://slideplayer.fr/slide/520385/>>
422. İlhami GÜNEŞ. Jurisprudence récente concernant les certificats complémentaires de protection. *Journal officiel de l'OEB* (2015). at <https://www.epo.org/law-practice/legal-texts/official-journal/2015/etc/se5/p96_fr.html>
423. Le parlement européen et le Conseil de l'Union Européenne. *Règlement (CE) No 469/2009 du 6 mai 2009 concernant le certificat complémentaire de protection pour les médicaments*. 1–10 (2009).
424. Lahrtz, F. How to Successfully Patent Therapeutic Antibodies. *J. Biomol. Screen.* (2015). doi:10.1177/1087057114567457
425. van der Hoff, H. Antibody claims granted by the European Patent Office. *Nat. Biotechnol.* **32**, 1094–8 (2014).
426. Dehns, P. and T. M. A. Patenting Antibodies. at <http://www.dehns.com/site/information/information_sheets/patenting_antibodies/>
427. Storz, U. IP Issues of Therapeutic Antibodies. *Handb. Ther. Antibodies* (2012). doi:10.1002/9783527619740.ch13
428. IMS Health. Top 20 Global Products 2014. *IMS Heal. MIDAS* 3614620 (2014).

429. Udpa, N. & Million, R. P. Monoclonal antibody biosimilars. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 13–14 (2015).
430. ANSM. État Des Lieux Sur Les Médicaments Biosimilaires. (2016).
431. Site internet de la société de transfert de technologie du CNRS, Fist SA. (2016). at <<http://www.fist.fr/>>
432. Site de l'Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle. (2016). at <<http://www.wipo.int/>>
433. Scientific, T. Antibody Fragmentation. at <<https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/antibody-fragmentation.html>>
434. Berasain, P., Carmona, C., Frangione, B., Cazzulo, J. J. & Goñi, F. Specific cleavage sites on human IgG subclasses by cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **130**, 23–9 (2003).
435. Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle. Classification internationale des brevets - GUIDE D'UTILISATION. (2016). at <http://www.wipo.int/export/sites/www/classifications/ipc/fr/guide/guide_ipc.pdf>
436. Codd, E. F. A relational model of data for large shared data banks. *Commun. ACM* **13**, 377–387 (1970).
437. Pottier, J. & Watier, H. Unexplained abuses of human IgG subclass denomination in antibody patents. *BioDrugs* **28**, 327–9 (2014).
438. Dumet, C. *Analyse brevet des variants de la sous classe IgG2, modifiés dans leur portion Fc*. (2016).
439. West, A. P. & Bjorkman, P. J. Crystal structure and immunoglobulin G binding properties of the human major histocompatibility complex-related Fc receptor(.). *Biochemistry* **39**, 9698–708 (2000).
440. de Lange, G. *et al.* Immunoglobulin allotypes in a Chinese population: comparison of

- haplotype frequencies with other Asian groups. *J. Immunogenet.* **12**, 191–5 (1985).
441. de Lange, G. G. Polymorphisms of human immunoglobulins: Gm, Am, Em and Km allotypes. *Exp. Clin. Immunogenet.* **6**, 7–17 (1989).
 442. Cook, C. E. & Steinberg, A. G. An amino acid substitution in the gamma 1 chain of human immunoglobulin G associated with the Gm (2) allotype. *Mol. Immunol.* **16**, 555–8 (1979).
 443. Goetze, A. M., Zhang, Z., Liu, L., Jacobsen, F. W. & Flynn, G. C. Rapid LC-MS screening for IgG Fc modifications and allelic variants in blood. *Mol. Immunol.* **49**, 338–352 (2011).
 444. Hougs, L. *et al.* Three new alleles of IGHG2 and their prevalence in Danish Caucasians, Mozambican Blacks and Japanese. *Tissue Antigens* **61**, 231–239 (2003).
 445. Heilig, R. *et al.* The DNA sequence and analysis of human chromosome 14. *Nature* **421**, 601–607 (2003).
 446. Marie-Paule Lefranc; & Lefranc, G. *Human Gm, Km, and Am Allotypes and Their Molecular Characterization: A Remarkable Demonstration of Polymorphism.* (2012).
 447. Dard, P., Lefranc, M. P., Osipova, L. & Sanchez-Mazas, a. DNA sequence variability of IGHG3 alleles associated to the main G3m haplotypes in human populations. *Eur. J. Hum. Genet.* **9**, 765–772 (2001).
 448. Dard, P. *et al.* The IGHG3 gene shows a structural polymorphism characterized by different hinge lengths: sequence of a new 2-exon hinge gene. *Hum. Genet.* **99**, 138–41 (1997).
 449. McCafferty, D. M., Kanwar, S., Granger, D. N. & Kubes, P. An allotype-associated polymorphism in the $\gamma 3$ promoter determines the germ-line $\gamma 3$ transcriptional rate but does not influence switching and subsequent IgG3 production. *Eur. J. Immunol.* **30**, 2388–2393 (2000).
 450. Brusco, A. *et al.* Molecular characterization of immunoglobulin G4 gene isoallotypes. *Eur. J. Immunogenet.* **25**, 349–355 (1998).

451. Vulgarisation informatique. Vulgarisation-informatique.com. (2016). at <Vulgarisation-informatique.com>

Annexes

Annexe 1 : Alignement des séquences primaires d’acides aminés des CH1 des 4 sous-classes d’immunoglobulines G

Pos	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166
IgG1	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G
IgG2														C		R				E	S																												
IgG3														C		R																																	
IgG4														C		R				E	S																												
Pos	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215
IgG1	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V
IgG2																										N	F					T			D												T		
IgG3																																	T														R		
IgG4																													K				T			D											R		

Les acides aminés différents d’IgG1 sont indiqués en rouge pour IgG2, IgG3 et IgG4. Les zones grises indiquent une identité des acides aminés.

Annexe 2 : Alignement des séquences primaires d'acides aminés des charnières des 4 sous-classes d'immunoglobulines G

Pos. (Eu)	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230
IgG1	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
IgG1	GAG	CCC	AAA	TCT	TGT	GAC	AAA	ACT	CAC	ACA	TGC	CCA	CCG	TGC	CCA
IgG2	E	R	K	C	C	V*			E		C	P	P	C	P
IgG2	GAG	CGC	AAA	TGT	TGT	GTC			GAG		TGC	CCA	CCG	TGC	CCC
IgG4	E	S	K	Y*	G*				P	P	C	P	S	C	P
IgG4	GAG	TCC	AAA	TAT	GGT				CCC	CCA	TGC	CCA	TCA	TGC	CCA

Pos. (Eu)	216	217	218	-	-	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230
IgG1	E	P	K			S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
IgG3	E	L	K	T	P	L	G	D	T	T	H	T	C	P	R	C	P
Exon charnière présent de une à trois fois après la séquence décrite dans la ligne au-dessus																	
IgG3	E	P	K	S	C	D	T	P	P	P	C	P	R	C	P		

En rouge sont indiqués les acides aminés différents d'IgG1 dans les immunoglobulines 2, 3 et 4. Les zones grises indiquent une absence d'acide aminé. *La valine en position 221 pour l'IgG2 est normalement numérotée 222 en numérotation Eu, mais notre alignement nucléotidique identifie une erreur dans cette numérotation. Celle-ci aurait dû être numérotée 221. Pour IgG4, les positions 219 et 220 sont attribuées à la tyrosine et la glycine après analyse des séquences nucléotidiques. En rouge sont indiqués les bases et les acides aminés différents d'IgG1. En gras sont indiquées les cystéines.

[illegible]

Les acides aminés différents d'IgG1 sont indiqués en rouge pour IgG2, IgG3 et IgG4. Les zones grises indiquent une identité des acides aminés. *Délétion d'un acide aminé dans l'IgG2 en position 236.

Annexe 4 : Alignement des séquences primaires d’acides aminés des CH3 des 4 sous-classes d’immunoglobulines G

Pos 341342343344345346347348349350351352353354355356357358359360361362363364365366367368369370371372373374375376377378379380381382383384385386387388389390391392393394395

IgG1 G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P

IgG2 E M

IgG3 E M S N

IgG4 Q E M

Pos 396397398399400401402403404405406407408409410411412413414415416417418419420421422423424425426427428429430431432433434435436437438439440441442443444445446447

IgG1 P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

IgG2 M

IgG3 M I R F

IgG4 R E L

Les acides aminés différents d’IgG1 sont indiqués en rouge pour IgG2, IgG3 et IgG4. Les zones grises indiquent une identité des acides aminés.

Annexe 5 : Les différents allotypes des chaînes lourdes et légères d'IgG

Tableau 16 : Les différents allotypes d'IgG1

Positions acide aminés (Eu)	214	356	358	431
Allotypes				
G1m17	K			
G1m3	R			
G1m1		D	L	
G1m-1		E	M	
G1m2				G

Les principales formes alléliques d'IgG1 sont G1m 17,1, qui correspond à la présence en position 214 d'une lysine et en position 356 et 358 respectivement d'un acide aspartique et d'une leucine, G1m 3,-1, qui correspond à la présence en position 214 d'une arginine et en position 356 et 358 respectivement d'un acide glutamique et d'une méthionine et G1m 3,1, qui correspond à la présence en position 214 d'une arginine et en position 356 et 358 respectivement d'un acide aspartique et d'une leucine^{91,92,440,441}, mais d'autres comme G1m 17,1,2 ont également été décrits^{442,443}.

Tableau 17 : Les allotypes d'IgG2

Positions acide aminés (Eu)	189	282
Allotypes		
G2m23	T	M
G2m(..)	P	V

Les IgG2 expriment l'allotype G2m23, qui est corrélé à la présence d'une thréonine à la position 189 et d'une méthionine à la position 282. Les autres formes G2m(..) portent respectivement une proline et une valine à ces positions, comme les chaînes lourdes d'autres sous-classes^{444,445}, mais ne peuvent pas être caractérisé comme des allotypes puisque aucun réactif anticorps n'a été caractérisé⁹¹. Elles diffèrent entre elles par des mutations aux positions 192-193 et 378⁶⁴.

Tableau 18 : Les allotypes d'IgG3

Positions acide aminés (Eu)	291	292	379	384	397	409	419	422	435	436
Allotypes										
G3m5									R	F
G3m6				S			E			
G3m10				S					I	
G3m11				S						
G3m13				S			Q			
G3m14					M					
G3m15			M							
G3m16		W								
G3m21	L									
G3m24				S				V		
G3m26									R	
G3m27									I	
G3m28									R	Y

Selon IMGT⁴⁴⁶. Pour IgG3, de très nombreuses formes alléliques sont connues, correspondant à diverses combinaisons de ces allotypes et à une variation du nombre d'exons charnière^{64,91,446-449}. On trouve par exemple une forme avec seulement deux exons charnières et contenant l'allotype G3m5^{64,91,446}.

Tableau 19 : Les isoallotypes d'IgG4

Positions acide aminés (Eu)	309	409
Allotypes		
G4m(a)	L	R
G4m(b)	V	R
G4m(...)	L	K

Les IgG4 n'ont pas de déterminant allotypique, mais seulement des variations isoallotypiques. En effet les acides aminés présents en 309 et 409 pour les isoallotypes d'IgG4⁴⁵⁰ sont aussi exprimés dans les chaînes lourdes d'IgG1 et IgG3. On compte ainsi une forme G4m(a) où l'acide aminé à la position 309 est une leucine, et une forme G4m(b) où est retrouvée une valine à cette même position. Pour ces deux formes on retrouve classiquement une arginine en position 409. Exceptionnellement pour la forme L309, cette arginine peut devenir une lysine^{64,91}.

Tableau 20 : Les allotypes de chaîne légère kappa

Positions acide aminés (Eu)	153	191
Allotypes		
Km1	V	L
Km1,2	A	L
Km3	A	V

Les trois allotypes de chaînes légères kappa (Km1, Km2 et Km3) définissent trois allèles Km⁹¹. Km1 est corrélé à la présence d'une valine en position 153 et d'une leucine en position 191. Km1,2 porte une alanine en position 153 et une leucine en 191. Enfin Km3 porte une alanine en position 153 et une valine en 191⁹¹.

Annexe 6 : Recherche de brevets dans la base de données Orbit®

Orbit® permet de rechercher des brevets par différents critères présents sur la page dite de « Recherche avancée » (**Figure 55**). Des onglets spécifiques sont également présents pour les recherches par déposant et par numéro, pour simplifier l'interface.

The screenshot displays the 'Recherche avancée' (Advanced Search) interface of the Orbit® database. It is organized into several expandable sections:

- Mots-clés** (Keywords): Includes a dropdown menu for 'Titre, Abrégé, Revendications Indépendantes' and a text input field.
- Classifications**: Includes a dropdown menu for 'et' and a dropdown menu for 'Domaine technologique' with an associated text input field.
- Noms** (Names): Includes a dropdown menu for 'Déposant ou titulaire passé et actuel', and text input fields for 'Inventeur' and 'Mandataire'.
- Numéros, Dates et Pays** (Numbers, Dates and Countries): Includes a dropdown menu for 'Numéro de publication', a 'Date' dropdown menu set to 'Aucune Restriction', and a text input field for 'Pays de publication (Offices des brevets)'.
- Situation juridique** (Legal Situation): A section for legal status.
- Autres champs** (Other fields): Includes a dropdown menu for 'N° d'identifiant de la famille FamPat' and a text input field.
- Collections**: Includes a 'Rechercher dans' (Search in) section with three radio button options: 'Collection mondiale de brevets regroupés en familles d'inventions contenant biblio & texte intégral (FamPat)' (selected), 'Collection mondiale de brevets par office contenant l'information bibliographique (PlusPat)', and 'Collection de brevets en texte intégral'. Below this is a 'Semaine d'entrée dans la collection' (Week of entry into the collection) dropdown menu set to 'Aucune limitation'.

Figure 55 : Illustration du portail de recherche avancée d'Orbit®

Les recherches peuvent être effectuées en saisissant des **Mots-clés**, des codes de **Classification** (CIB, CPC, ECLA...), des **Noms** (de déposant, d'inventeurs, de mandataire...), des **Numéros** (de publication, de dépôt, ou de priorité de brevets, avec ou sans restriction de **Date** ou de **Pays**), la **Situation juridique** (En vigueur ou non, ayant connu une opposition, ayant été licencié...), et/ou d'**Autres champs** (Nom d'examineur de l'OEB, localisation du déposant, nombre de revendications...), sur différentes **Collections** (FamPat, PlusPat...).

A l'aide de critères définis dans la première étape, il est possible d'effectuer des requêtes pour interroger la base de données brevets Orbit®. Pour les requêtes mots-clés, de la même façon que dans PubMed et Web of Science, il est possible de les combiner avec des opérateurs booléens simples, tels « ET, OU, SAUF, ... », mais aussi avec des opérateurs plus complexes, comme par exemple les opérateurs « PHR », « CHP » ou « PRG », qui situés entre deux critères identifieront les brevets où ces deux mots sont respectivement dans la même phrase, dans le même champ ou dans le même paragraphe (**Tableau 21**). Des troncatures sont également disponibles (« + », « ? », « # »), permettant de remplacer un ou plusieurs caractères, afin de rechercher différentes variantes d'un terme (**Tableau 22**).

Tableau 21 : Opérateurs disponibles dans Orbit®

Opérateurs	Description	Exemple
OU	Retrouve les familles contenant au moins un des termes	<i>sulfur ou sulphur</i>
ET	Tous les termes	<i>plutonium et isotope</i>
SAUF	Le premier terme sans le second terme	<i>suv sauf vesicle</i>
CHP	Les termes dans le même champ	<i>sodium chp chlorine</i>
PHR	Les termes dans la même phrase	<i>sodium phr chlorine</i>
PRG	Les termes dans le même paragraphe	<i>sodium prg chlorine</i>
M	Les termes juxtaposés quel que soit l'ordre	<i>redundancy m check+</i>
nM	Les termes adjacents, quel que soit l'ordre, et pouvant être séparés par un maximum de n mots (valeur de n comprise entre 1 et 99)	<i>electric+ 2m conduct+ 2m adhesive</i>
=nM	Les termes adjacents, quel que soit l'ordre, et pouvant être séparés par exactement n mots (valeur de n comprise entre 1 et 99)	<i>electric+ =2m conduct+ =2m adhesive</i>
AV	Les termes juxtaposés dans l'ordre précisé ; traitement appliqué par défaut pour deux termes saisis sans opérateur	<i>smart av card?</i> <i>smart card?</i>
nAV	Les termes adjacents dans l'ordre précisé et pouvant être séparés par un maximum de n mots (valeur de n comprise entre 1 et 99)	<i>friction 1av pad?</i>
=nAV	Les termes adjacents dans l'ordre précisé et pouvant être séparés par exactement n mots (valeur de n comprise entre 1 et 99)	<i>friction =1av pad?</i>
–	Le joint operator permet de retrouver des termes qui peuvent s'écrire en un mot ou en deux. A utiliser également dans les recherches de formules chimiques	<i>air_bag</i> <i>+ethylen+ _+carbonate+</i>
Parenthèses	Parenthèses (mise en facteur) nécessaires lors de combinaison d'opérateurs différents	<i>((wireless av application av protocol) ou wap) sauf (dna ou transgenic) (hair 1m (dye ou dyeing)) et oxidat+</i>

Tableau 22 : Troncatures disponibles dans Orbit®

Opérateurs	Description	Exemple
+/*	Troncature remplaçant un nombre illimité de caractères	<i>bicycl+</i> <i>+inflammator</i>
?	Troncature remplaçant zéro ou un caractère – Jusqu'à neuf ? de suite dans un terme	<i>bicycle?</i> <i>alumin?um</i>
#	Troncature remplaçant exactement un caractère - Jusqu'à neuf # de suite dans un terme	<i>polymeri#atic</i>

Pour les requêtes effectuées avec des codes de classification CPC, il suffit tout simplement de sélectionner la classification CPC dans Classification > Domaine technologique, et d'indiquer le code dans la case voisine. Les brevets s'étant vu apposer ce code par les offices de brevets seront ainsi obtenus dans les résultats.

Pour les requêtes de citation de brevets à l'aide du numéro de ceux-ci, le plus simple est d'utiliser l'outil de « Recherche par numéro ». Dans cet outil, il suffit d'entrer un ou des numéros dans le champ mis à disposition pour obtenir les résultats.

Pour obtenir les citations d'un brevet, il suffit dans les résultats de cliquer sur un des icônes disponibles pour obtenir un menu déroulant nous proposant d'obtenir les brevets citants et cités par ce brevet (Figure 56). Il suffit ensuite d'analyser les résultats comme pour les autres types de requêtes pour identifier les brevets pertinents.

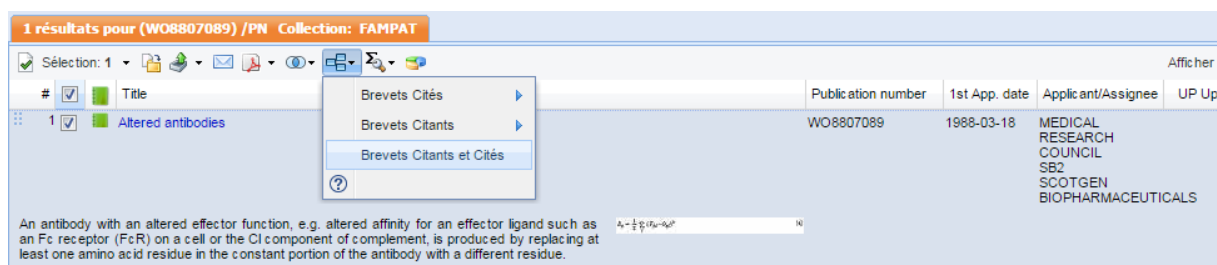


Figure 56 : Illustration de l'outil de citation de brevets

Ici pour le brevet WO8807089. En cliquant sur Brevets Citants et Cités est obtenu une nouvelle liste de résultats contenant 262 brevets citant ou cités par le brevet WO8807089.

Annexe 7 : IP Business Intelligence

Après avoir sélectionné les familles de brevets à analyser (Figure 57), l'arrivée sur la page d'accueil de cet outil nous permet d'avoir un aperçu de tout ce qu'il est possible de réaliser (Figure 58).



Figure 57 : Icône permettant d'avoir accès à l'outil d'analyse d'Orbit®

L'icône pour accéder à l'outil d'analyse est encadré en rouge.

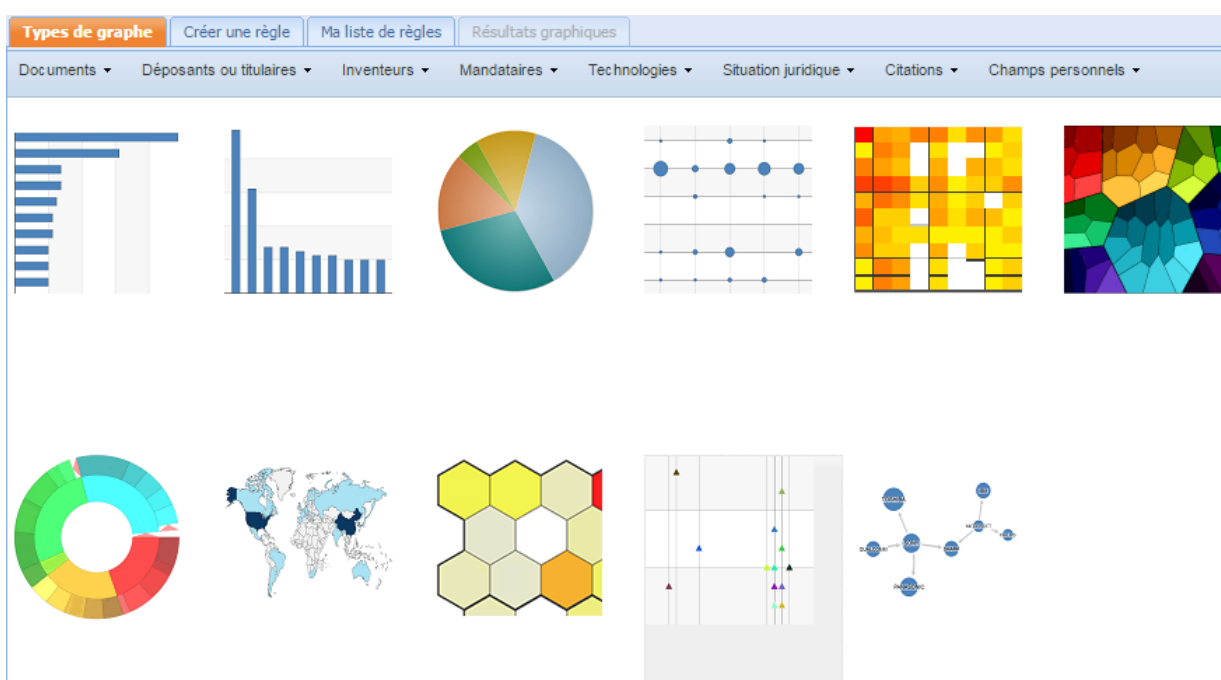


Figure 58 : Page de base du module d'analyse de brevets d'Orbit®

Sont indiqués les différents types de graphiques disponibles, dans l'ordre de gauche à droite et de haut en bas (Histogramme horizontal, Histogramme vertical, Camembert, Diagramme à bulles, Heatmap, Treemap rectangulaire, Treemap circulaire, Carte du monde, Domaines technologiques, Diagramme multi-critères, Graphe relationnel). Les menus déroulants au dessus des graphiques (Documents, Déposants ou titulaires, Inventeurs...) indiquent les types de données disponibles et permettent de réaliser un graphique. Les onglets au-dessus (Types de graphes, Créer une règle...) permettent d'accéder aux règles et aux résultats graphiques.

Les types de graphiques (Figure 58) permettent d'illustrer 9 types de données à analyser sur les familles de brevets définies précédemment et accessibles via les menus déroulants au-dessus des graphiques dans le menu de base (Figure 58) :

- Documents
 - Années de publication
 - Années de priorité
 - 1^{ère} année de priorité
 - 1^{ère} année de publication
 - 1^{ère} année de dépôt
 - Pays de publication
 - Pays de priorité
 - Carte du monde
 - Code de statut de publication
 - Toutes les années de publication / Pays de publication
 - Toutes les années de dépôt / Pays de publication
 - Toutes les années de priorité / Pays de priorité
- Déposants ou titulaires
 - Déposants ou titulaires
 - Accélération
 - Déposants ou titulaires / 1^{ère} année de priorité
 - Co-déposants
 - Age moyen des familles de brevets par déposants
- Inventeurs
 - Inventeurs
 - Accélération
 - Inventeurs / 1^{ère} année de priorité
 - Co-inventeurs
 - Age moyen des familles de brevets par inventeurs
- Mandataires
 - Mandataires
 - Mandataires / 1^{ère} année de priorité
- Technologies
 - Domaines technologiques
 - Classification CIB
 - Classification ECLA
 - Classification CPC
 - Classification US PCL
 - Classification JP FI
- Situation juridique
 - Statut juridique
 - Situation juridique
 - Litiges US
- Citations
 - Citations entre déposants
 - Brevets citant

Une fois le type de graphique désiré défini, il suffit de cliquer dans les menus déroulants décrits au-dessus pour obtenir le résultat graphique. Ces résultats sont illustrés via l'un des types de graphique précédemment définis, dont il est possible de modifier les paramètres pour adapter au mieux le graphique à ce que l'on veut montrer (Figure 59).

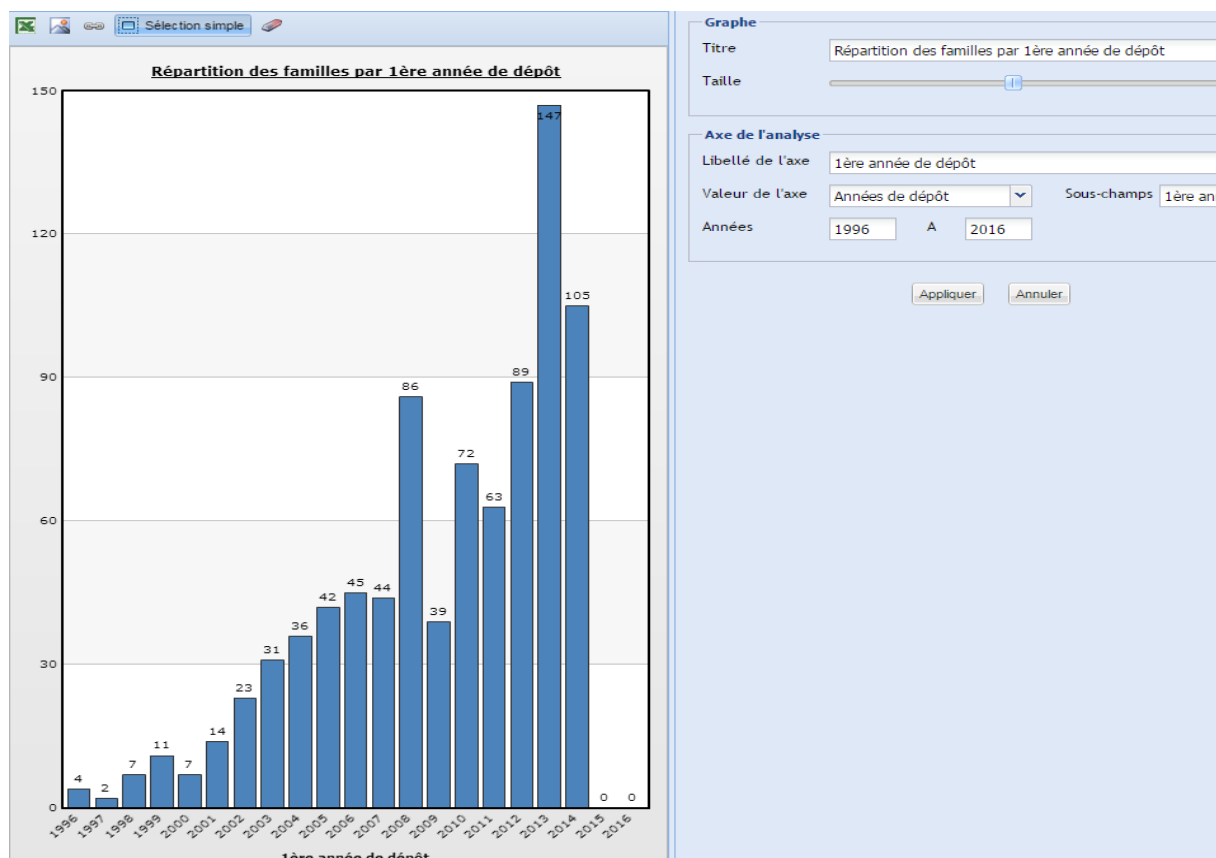


Figure 59 : Exemple d'analyse Orbit[®] portant sur la répartition des familles de brevets par première années de dépôts

Les paramètres peuvent être ajustés via le panel à droite. Les possibilités sont notamment d'agrandir l'étendue des années couvertes par le graphique, et de changer les valeurs et les valeurs de l'axe.

Une étape importante à réaliser avant de lancer les analyses, principalement quand on étudie le nombre de familles de brevets par déposants, est la mise en forme de règles consistant en réalité à un regroupement de sociétés, nécessaire en raison des différentes langues utilisées dans les brevets, des erreurs d'océrisation d'Orbit[®] (Xencor pouvait être retrouvé Xen_cor par exemple), ou pour regrouper une société et sa filiale (Figure 60). La mise en forme des règles est un passage très important puisqu'elle permet de voir le potentiel réel du portefeuille de brevets des déposants, sans redondances fortuites.

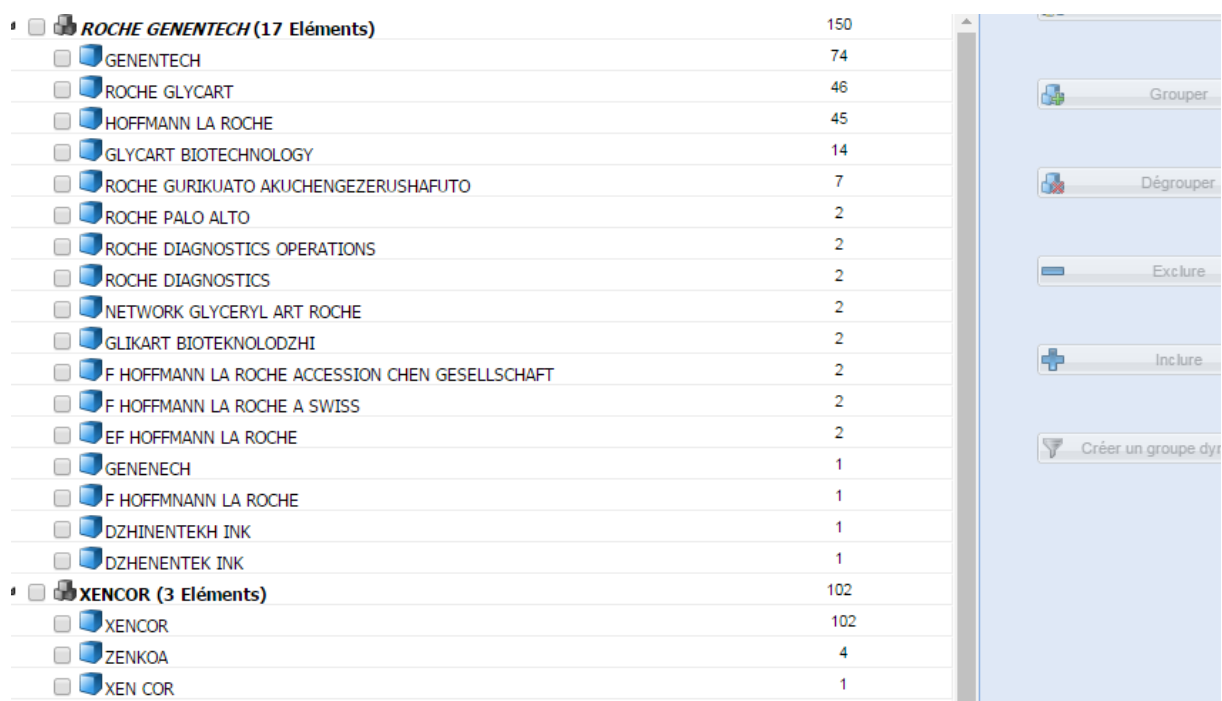


Figure 60 : Illustration de l'outil de création de règles

Cet outil est disponible via un onglet situé au-dessus des types de données (**Figure 58**) et permet de regrouper simplement les sociétés en cliquant sur celles-ci et en les groupant via l'onglet « Grouper », à droite (**Figure 60**). Ici on peut voir que la société Roche a été groupée avec ses filiales Genentech et Glycart, mais également avec des termes étrangers comme « Dzhenentek » ou « Glikart bioteknologdzh ».

Une fois ces règles définies et le graphique optimisé, celui-ci peut être utilisé après extraction (**Figure 61**) pour caractériser les tendances du corpus de brevets.

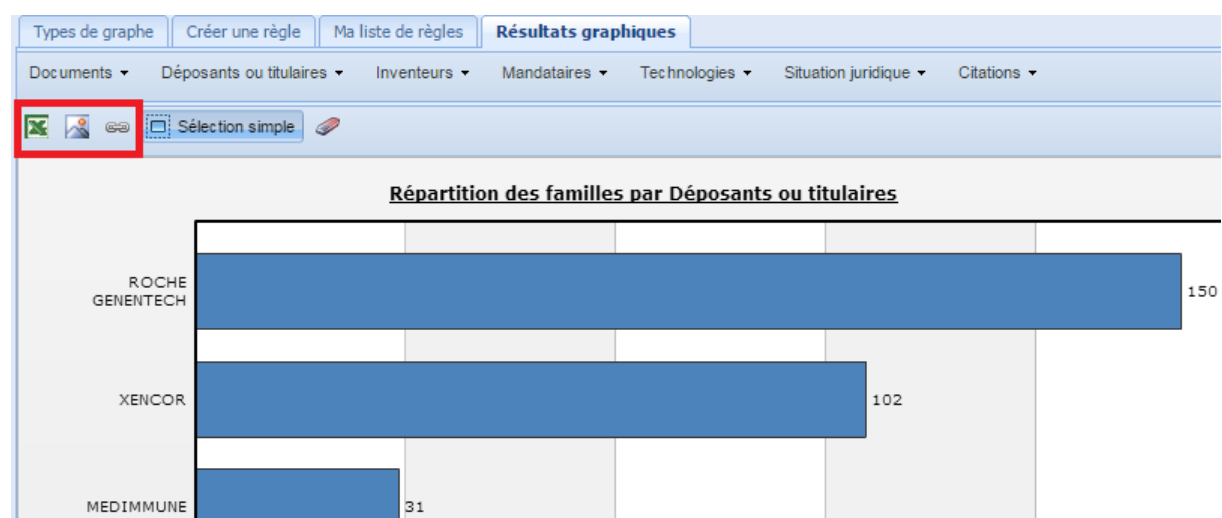


Figure 61 : Exportation des données d'analyse et la mise en place de liens web vers l'analyse hébergée par Orbit®

Tous les types de données ou de graphiques peuvent être exportés en format image *.jpeg*, en format Microsoft Excel® *.csv*, ou via un lien web disponible trois mois, disponibles via des icônes situés au-dessus du graphique, ici encadré en rouge.

Pour l'analyse macroscopique du corpus de brevets pertinents pour notre sujet, les principales études réalisées et détaillées dans les résultats sont:

- 1^{ère} année de dépôt
- 1^{ère} année de publication
- Déposants ou titulaires
- Inventeurs
- Statut juridique
- Déposants ou Titulaires par Années de dépôts

Annexe 8 : La base de données sous Microsoft Excel®

Six bases de données Excel® ont été créées :

- Une concernant les modifications acides aminés d'IgG1
(**Figure 62, Figure 63, et Figure 64**)
- Une concernant les modifications acides aminés d'IgG2
(**Figure 62, Figure 63, et Figure 64**)
- Une concernant les modifications acides aminés d'IgG3
(**Figure 62, Figure 63, et Figure 64**)
- Une concernant les modifications acide aminés d'IgG4
(**Figure 62, Figure 63, et Figure 64**)
- Une concernant les modifications de glycosylation
(**Figure 65, Figure 63, et Figure 64**)
- Une concernant les modifications de domaine
(**Figure 66, Figure 63, et Figure 64**)

Les bases de données concernant les modifications d'acides aminés sont identiques pour les quatre sous-classes (**Figure 62, Figure 63, et Figure 64**), excepté au niveau des acides aminés de type sauvage, où on retrouve des différences, et de fait également au niveau des numérotations.

La base de données concernant les modifications de glycosylation ne diffère qu'au niveau des premières colonnes, qui décrivent l'anticorps utilisé et les modifications réalisées (**Figure 65**). Ces colonnes sont suivies par les colonnes également présentes dans les bases acides-aminés, c'est-à-dire les propriétés pharmacologiques liées aux modifications appliquées aux variants, et enfin les informations sur le brevet (**Figure 63, et Figure 64**).

Enfin, la base de données des modifications de domaine est similaire à celle des modifications de glycosylation. Elle comprend tout comme celle-ci des premières colonnes qui décrivent l'anticorps utilisé et les modifications réalisées (**Figure 66**), suivies par celles présentes dans toutes les bases de données, décrivant les propriétés pharmacologiques des variants et le document brevet en lui-même (**Figure 63, et Figure 64**).

Strands, Turns and loops for C-DOMAINS	IMGT unique numbering for C-DOMAINS	Eu NUMBERING	Kabat Numbering	IMGT exon numbering	AA IGG1 NORMAL	VARIANTS simples identiques sur les deux chaînes lourdes	VARIANTS multiples identiques sur les deux chaînes lourdes	VARIANTS multiples différents sur les deux chaînes lourdes Chaîne A	VARIANTS multiples différents sur les deux chaînes lourdes Chaîne B
C-STRAND	39	379	402	39	V				
	40	380	405	40	E	A			
							A couplé à N434A		
							A couplé à N434A et T307A		
							A couplé à L309A		
	41	381	406	41	W				
	42	382	407	42	E	A			

Figure 62 : Description des différentes numérotations et des modifications d'acide aminés dans la base spécifique de ce type de mutation dans IgG1

Les boucles et feuillets sont indiqués dans la première colonne verte. Pour les bases de données traitant des modifications d'acides aminés, nous avons décidé d'indexer les différentes numérotations des acides aminés présentes dans les brevets et dans la *Scientific Chart* de l'IMGT : Eu Numbering, Kabat numbering, et deux numérotations de l'IMGT. Ce sont les quatre colonnes vertes. Ces numérotations représentent la base de fixe de la base de données, et un variant (et les informations brevets liées) devra donc être rentré plusieurs fois, au niveau de chaque position modifiée dans celui-ci. La dernière colonne verte renseigne de l'acide aminé wild type, suivie par une colonne rose traitant des modifications simples, c'est-à-dire en cas de mutation d'un seul acide aminé, on indique celui-ci dans la colonne. Les mutations simples sont suivies par une deuxième colonne rose traitant des mutations multiples, c'est-à-dire quand un variant contient plusieurs modifications d'acides aminés. Deux colonnes complémentaires furent ensuite rajoutées, pour pallier les problèmes de modifications dans le Fc différentes sur les deux chaînes lourdes, comme certains brevets de Genentech sur l'hétérodimérisation en vue de former des anticorps bispécifiques.

DESCRIPTION IMPACT PHARMACOLOGIQUE DE CETTE MUTATION	Liaison du variant au Fc gamma RI	Liaison du variant au Fc gamma RIIA 131H	Liaison du variant au Fc gamma RIIA 131R	Liaison du variant au Fc gamma RIIIB et IIC	Liaison du variant au Fc gamma RIIIA 158V	Liaison du variant au Fc gamma RIIIA 158F	Liaison du variant au Fc gamma RIIIB NAI	Liaison du variant au Fc gamma RIIIB NAI	Liaison du variant au Fc gamma RIIIB SH	Impact du variant sur l'ADCC	Liaison du variant au Clq	Impact du variant sur le complément (CDC)	Liaison du variant au FcRn	Impact du variant sur la demi-vie	REMARQUES PROPRES AUX BREVETS ET AUX MODIFICATIONS
Réduction légère liaison au Fc gamma RIIA. (1->0,84) Réduction liaison au Fc gamma RIIIB. (1->0,75) Réduction liaison au Fc gamma RIIIA. (1->0,84)	0,98	0,84	0,84	0,75	0,67	0,67							0,86		Brevet important de GENENTECH où ils mutent tout le Fc

Figure 63 : Description de l'impact pharmacologique des variants dans la base de données sous Excel

Les colonnes propres aux variants sont suivies par 15 colonnes jaunes, détaillant l'impact des modifications sur les liaisons aux récepteurs ou sur l'activité de complément ou d'ADCC, mais également pour la demi-vie. Ces variations sont quantifiées de deux façons : Par une normalisation présente dans certains brevets, ou la valeur de liaison ou d'activité est rapportée sur la donnée de type sauvage, permettant d'indiquer une augmentation de liaison ou d'activité si le nombre est supérieur à 1, et une diminution en cas de valeur inférieure à 1. Ou alors par des flèches, allant de « ↓↓↓ » pour une très forte diminution à « ↑↑↑ » pour une très forte augmentation.

NUMERO DU BREVET	TITRE	DATE DE PRIORITE	COMPAGNIE	AUTEURS	STATUT DU BREVET	Publications liées au brevet	Antériorité
US6737056 WO200042072	POLYPEPTIDE VARIANTS WITH ALTERED EFFECTOR FUNCTION	15/01/1999	GENENTECH	LEONARD PRESTA	Délivré le 18/05/2004		4,752,601 A 6/1988 Hahn 5,348,876 A 3/1994 Michaelsen et al. 5,576,164 A * 11/1996 Better et al. 435/7.23 5,624,821 A 4/1997 Winter et al.
US6737056 WO200042072	POLYPEPTIDE VARIANTS WITH ALTERED EFFECTOR FUNCTION	15/01/1999	GENENTECH	LEONARD PRESTA	Délivré le 18/05/2004		4,752,601 A 6/1988 Hahn 5,348,876 A 3/1994 Michaelsen et al. 5,576,164 A * 11/1996 Better et al. 435/7.23 5,624,821 A 4/1997 Winter et al. 5,648,260 A 7/1997 Winter et al. 5,698,449 A 12/1997 Baumann et al. 5,738,137 A 4/1998 Anderson

Figure 64 : Description des caractéristiques du document brevet

Enfin, la dernière partie de cette base, en gris, décrit le brevet en terme de document, c'est-à-dire par l'indexation du numéro de brevet, de sa date de priorité, de la société déposante, de ses auteurs, de son statut (Publié, délivré..), des publications liées et de son antériorité.

SOUS-CLASSE IGG OU MAb	DESCRIPTIONS VARIANTS	DESCRIPTIONS GLYCOFORMES
CAMPATH-1H (IgG1)	Addition enzymatique d'acides sialiques aux anticorps déjà traités par galactosyltransferases	Augmentation de forme de S2 (entre 17 et 44%) Augmentation de forme S1(46-80%) Seulement entre 3 et 10% ne sont pas sialilés (G0-G1-G2).
C2B8 anti-HER2 anti-VEGF anti-IgE	Traitement avec l'enzyme β -4 galactosyltransferase	Obtient 100% d'anticorps G2. (Wt donne 60% G0, 30% G1 et 10% G2)
C2B8 anti-HER2 anti-VEGF anti-IgE	Traitement avec l'enzyme β -galactosidase puis la N-acetyl β -D-glucosaminosidase	Obtient 100% d'anticorps G2, correspondant à un anticorps avec 0 galactose et 0 GlcNac bianténaire. (Wt donne 60% G0, 30% G1 et 10% G2)

Figure 65 : Description de la sous-classe du Fc utilisé et des modifications glycosidiques dans la base spécifique de ce type de mutation

Pour la base de données traitant des modifications de glycosylation, la mise en forme est plus simple, tout en reprenant les grandes catégories des bases acides aminées. Elle comprend pour commencer une colonne décrivant la sous classe d'IgG utilisée, ou l'anticorps qui a servi à montrer l'impact des modifications (En vert). Les deux colonnes qui suivent (en rose) servent à décrire le variant. La première indique la façon dont le variant est modifié et la deuxième rapporte l'impact de ces modifications sur les glycoformes.

Figure 66 : Description de la sous-classe du Fc utilisé et des modifications de domaine dans la base spécifique de ce type de mutation

La base de données des modifications de domaine est similaire à celle des modifications de glycosylation. Elle comprend tout comme celle-ci une première colonne décrivant la forme de l'anticorps utilisé ou la sous-classe d'immunoglobuline (En vert). Celle-ci est suivie par une seule colonne décrivant la construction du variant, qui peut être par exemple un remaniement et/ou un réarrangement des domaines (En rose).

SOUS-CLASSE IgG OU MAb	DESCRIPTIONS VARIANTS
IgG	CH1 IGG2 - HINGE IGG3 - CH2 IGG3 - CH3 IGG3
IgG	CH1 IGG3 - HINGE IGG2 - CH2 IGG2 - CH3 IGG2
IgG	CH1 IGG3 - HINGE IGG3 - CH2 IGG2 - CH3 IGG2
IgG	CH1 IGG2 - HINGE IGG2 - CH2 IGG2 - CH3 IGG3
IgG	CH1 IGG3 - HINGE IGG3 - CH2 IGG3 - CH3 IGG2

Annexe 9 : Développement et implémentation de la base de données en SQL

La première étape de la conception d'une base de données relationnelle est l'étape de modélisation de celle-ci. Par modélisation sont entendues la détermination du contenu de la base de données et la définition des relations entre les différents concepts. On parle de schéma conceptuel. Une base de données relationnelle est composée de tables, appelées « entités », elles même composées de colonnes nommées « attributs ». Nous avons donc défini les entités importantes de notre future base de données et les attributs qu'elles comportaient (Figure 67, Figure 68, Figure 69, Figure 70, Figure 71 et Figure 72).

Brevet
Id_brevet
Numéro de brevet
Titre
Date de priorité, de publication et de délivrance
Auteurs
Déposants
Publications citées
Lien PDF

Figure 67 : Représentation de la table Brevet

L'entité « Brevet » comprend les attributs sur le document brevet : Numéro de brevet, Titre, Date de priorité, de publication et de délivrance, Auteurs, Déposants, Publications citées, et un lien PDF

Figure 68 : Représentation de la table Variants

L'entité « Variants » comprend les attributs sur les variants : Nom en nomenclature, Forme de la molécule, Sous-classe du Fc, Allotype, Cible, Anticorps utilisé, Type de variant, Présence d'un glycan ou non

Variants
Id_Variants
Nom en nomenclature
Forme de la molécule
Sous-classe du Fc
Allotype
Cible
Anticorps utilisé
Type de variant
Présence d'un glycan ou non

Modifications acides aminés
Id_Modifications acides aminés
Type de modification
Acide aminé wild-type
Position de la modification
Nouvel acide-aminé
Présence de la modification sur les deux chaînes lourde ou non

Figure 69 : Représentation de la table Modifications acides aminés

L'entité « Modifications acides aminés » comprend les attributs sur les Modifications acides aminés : Type de modification, Acide aminé wild-type, Position de la modification, Nouvel acide-aminé, Présence de la modification sur les deux chaînes lourde ou non

Figure 70 : Représentation de la table Modifications de glycosylation

L'entité « Modifications de glycosylation » comprend les attributs sur les Modifications de glycosylation : Cellule de production, Pourcentage de chaque glycoforme, Description du glycanne, Enzyme utilisé/modifié

Modifications de glycosylation
Id_Modifications de glycosylation
Cellule de production
Pourcentage de chaque glycoforme
Description du glycanne
Enzyme utilisé/modifié

Modifications de domaine
Id_Modification de domaine
Sous-classe originale du Fc
Remplacement de la charnière par une d'une autre sous-classe
Remplacement du CH2 par un d'une autre sous-classe
Remplacement du CH3 par un d'une autre sous-classe
Remplacement par des domaines d'autres espèces
Domaine retiré
Domaine ajouté
Sous-classe des nouveaux domaines
Délimitations de début et de fin d'ajout de domaines en cas de domaines non entiers ou chevauchants

Figure 71 : Représentation de la table Modifications de domaine

L'entité « Modifications de domaine » comprend les attributs sur les Modifications de domaine : Sous-classe originale du Fc, Remplacement de la charnière par une d'une autre sous-classe, Remplacement du CH2 par un d'une autre sous-classe, Remplacement du CH3 par un d'une autre sous-classe , Remplacement par des domaines d'autres espèces, Domaine retiré, Domaine ajouté, Sous-classe des nouveaux domaines, Délimitations de début et de fin d'ajout de domaines en cas de domaines non entiers ou chevauchants

Figure 72 : Représentation de la table Propriétés pharmacologiques

L'entité « Propriétés pharmacologiques » comprend les attributs sur les Propriétés pharmacologiques en lien avec la molécule modifiée : Récepteur ou activité en question, caractéristique de la liaison au récepteur ou de l'activité

Propriétés pharmacologiques
Id_Propriétés pharmacologiques
Récepteur ou activité
Caractéristique de la liaison ou de l'activité

Dans chacune de ces tables est ajoutée un identifiant (Id) ou « clé primaire », permettant de caractériser chaque ligne de nos tables par un identifiant chiffré unique. La première ligne rentrée sera affublée du numéro 1, et un auto-incrément de la base permettra de continuer la numérotation de façon croissante. C'est cette clé primaire unique qui sera utilisée pour caractériser la ligne dans les relations.

Une relation, ou association, est un lien entre plusieurs entités. Il en existe trois types :

- Relations dites « (1-1) »

Ce type de relation décrit un cas où deux entités sont liées de manière univoque. C'est-à-dire qu'une entité et une autre sont forcément reliées. On les placera ainsi dans la même table. On peut prendre ici l'exemple du numéro de brevets, propre à un seul et unique brevet.

- Relations dites « (1-n) »

Ce type de relation décrit un cas où quelque chose de fixe peut avoir plusieurs données différentes d'un même type d'entité. Chaque fois que ce type de relation sera identifié, il sera nécessaire de créer une deuxième table, et indiquer à la base de données la relation, via l'identifiant de la ligne présente dans la deuxième table. Par exemple, un brevet peut avoir plusieurs variants différents (**Figure 73**).

Brevet	
Id_Brevet	Brevet
1	WO20000000
2	WO30000000
3	WO40000000

Figure 73 : Exemple de relation « (1-n) »

Les variants X (Id : 1) et Y (Id : 2) proviennent du brevet WO20000000 (Id : 1), alors que le variant Z (Id : 3) provient lui du brevet WO30000000 (Id : 2).

- Relations dites « (n-n) »

Ce type de relation décrit un cas où aucune donnée n'est fixe, et n'est ni plus ni moins qu'une double relation 1-n. La donnée d'une table peut être reliée à plusieurs données de l'autre table, et vice-versa. Il sera ici nécessaire de créer une table intermédiaire pour relier les lignes présentes dans deux tables différentes, en utilisant leurs clés primaires. Ces clés primaires associées dans une nouvelle table (intermédiaire) sont ici appelées « clés étrangères » (**Figure 74**). Dans notre cas on peut par exemple prendre le fait qu'un variant peut avoir plusieurs modifications acide aminés, mais que ces modifications acides aminés puissent être présentes dans plusieurs variants.

Variant		Modifications acides aminés	
Id_variant	Variant	Id_Modification AA	Modification
1	X	1	N297A
2	Y	2	L235E
3	Z	3	L234A

Table intermédiaire	
Id_variant	Id_Modification AA
1	1
1	3
2	3

Figure 74 : Exemple de relation « (n-n) »

Ici le variant X (Id_variant: 1) a les modifications N297A (Id_Modification AA : 1) et L234A (Id_Modification AA : 3), et la modification L234A (Id_Modification AA : 3) est aussi présente dans le variant Y (Id_variant: 2)

A partir de ces trois types de relations, nous avons pu identifier que nous n'avons ici que des relations de type n-n puisque chacune des tables a des attributs qui sont en lien avec des lignes d'autres tables. De plus, de nouvelles tables ont dû être rajoutées après analyse de nos types de données, portant sur des données caractéristiques du document brevet : Les auteurs, les déposants, et les publications citées par les brevets. En effet, chacun de ces types de données peut être caractéristique de plusieurs brevets différents, et pour un même brevet il peut y avoir plusieurs auteurs, plusieurs déposants, et évidemment plusieurs publications citées. Trois nouvelles tables sont donc ajoutées (Figure 75).

Auteurs	Société	Publication citées
Id_Auteurs	Id_Société	Id_Publication citées
Nom de l'auteur	Société	Publication PMID

Figure 75 : Représentation des trois nouvelles tables

Le schéma conceptuel contenant les tables et les relations décrites précédemment est ainsi complet (Figure 76).

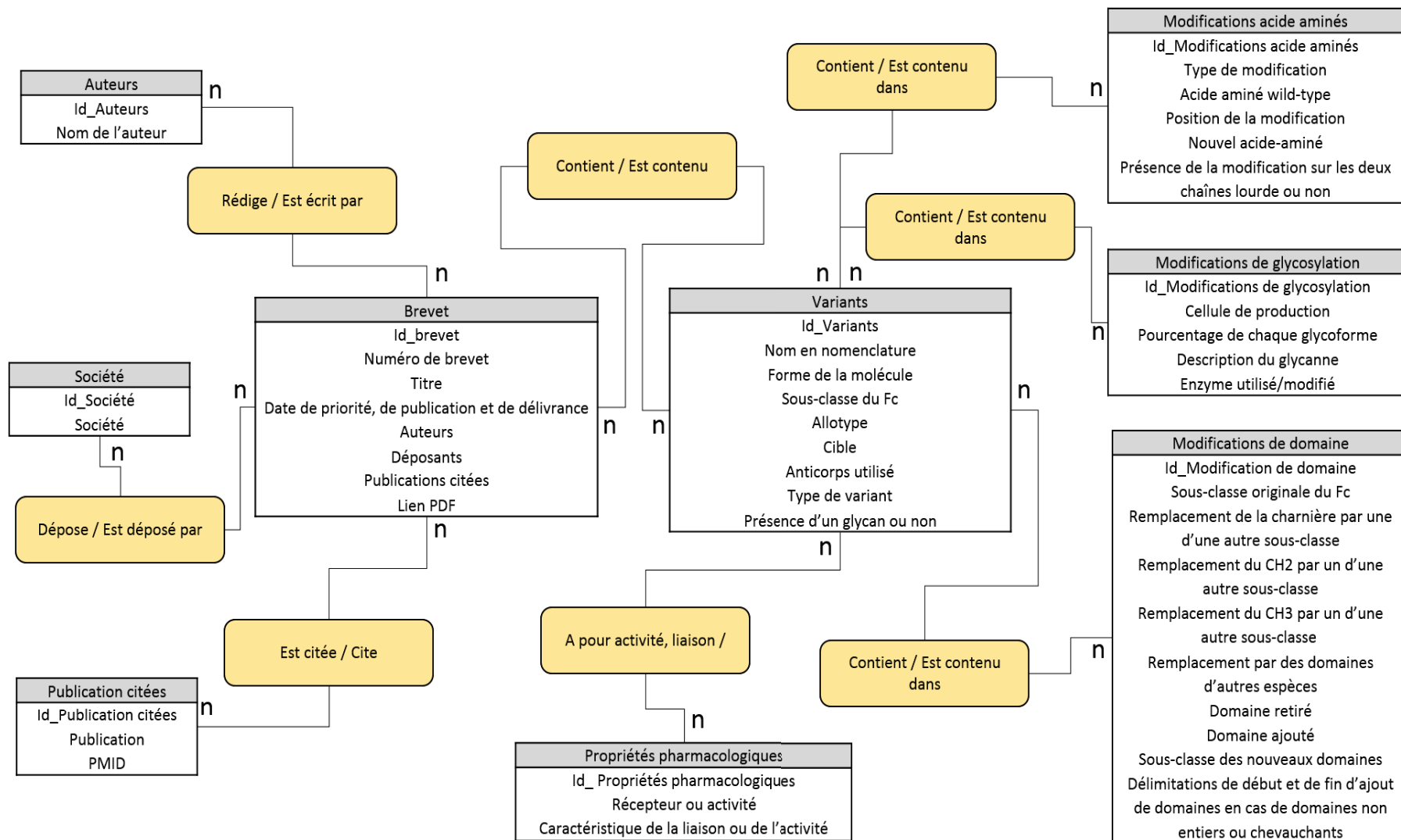


Figure 76 : Schéma conceptuel de la base de données

Après cette première étape de réalisation du schéma conceptuel de la base de données, la deuxième étape est la conception du schéma relationnel, traitant comme son nom l'indique des relations entre les tables, et réalisé avec MySQL Workbench[®]. Ce schéma dit relationnel indique les tables comme définies dans le schéma conceptuel, mais dans notre cas où toutes les relations sont de types « (n-n) », également les tables intermédiaires. De plus, il est nécessaire d'indiquer la nature des données présentes pour chaque attribut, suivant ce qui est disponible dans le langage SQL.

Le langage SQL reconnaît trois types de données :

- Les valeurs numériques
- Les dates et les heures
- Les chaînes de caractères

Ce langage permet l'utilisation de différentes formules dans ces trois types. Ici, nous avons utilisé pour nos attributs seulement 6 types de données différents :

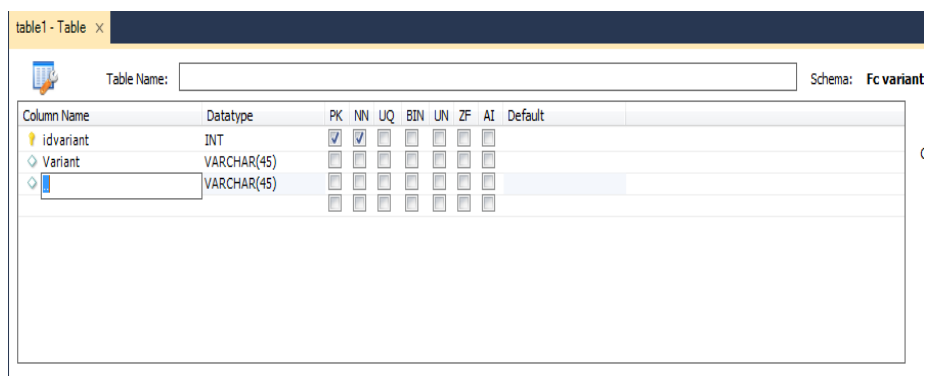
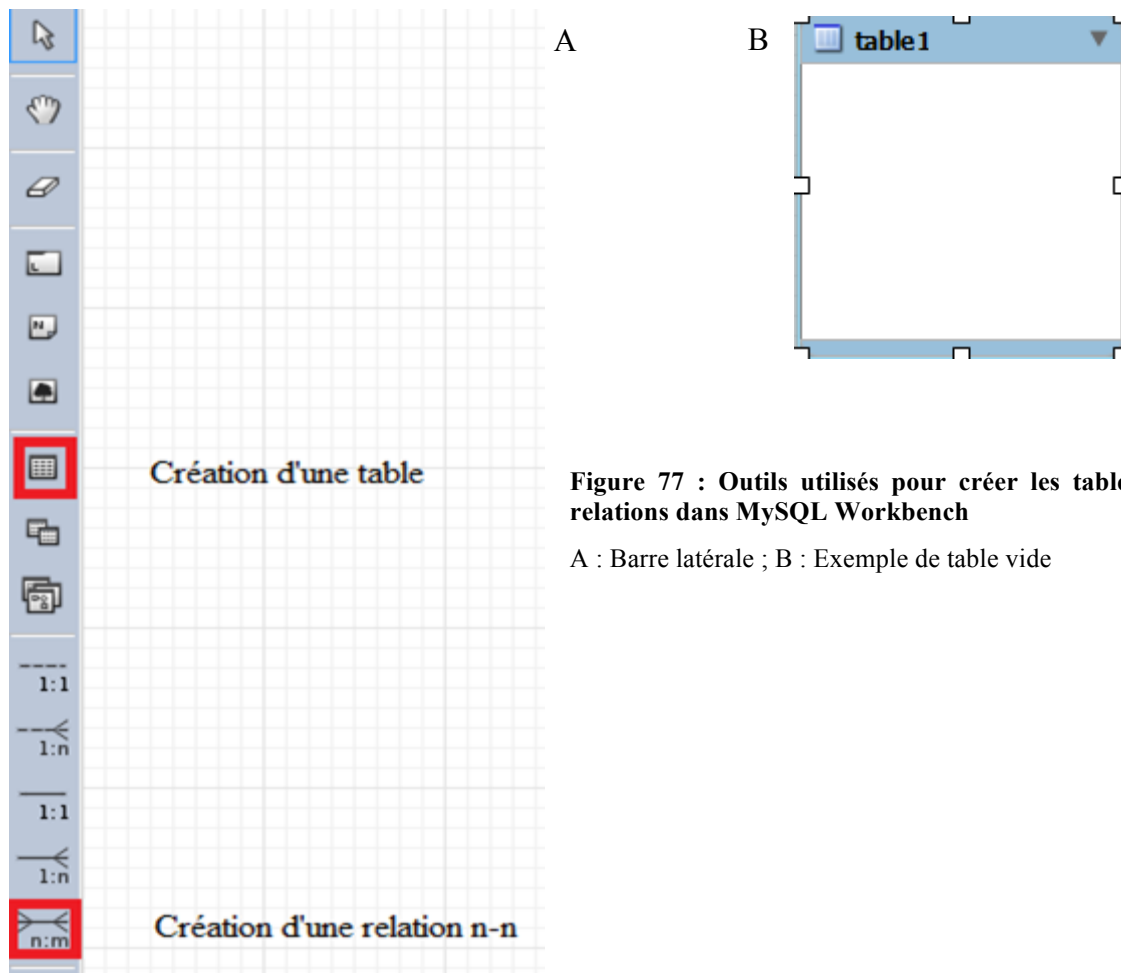
Tableau 23 : Description des types de données utilisés dans notre base de données

Formule	Description	Formule	Description
INT	Stocke des nombres entiers de – 2147483648 à 2147483647	ENUM(('valeur_possible1', 'valeur_possible2', 'valeur_possible3',...))	Stocke une chaîne de caractères dont les valeurs possibles sont prédéfinies par l'utilisateur. Un seul choix est possible.
VARCHAR ()	Ce type de données stocke des chaînes de 255 caractères maximum	SET('valeur_possible1', 'valeur_possible2',...)	Stocke une chaîne de caractères dont les valeurs possibles sont prédéfinies par l'utilisateur. La différence avec ENUM, c'est qu'on peut stocker dans la colonne entre 0 et x valeur(s), x étant le nombre de valeurs autorisées
DATE	Stocke une date au format 'AAAA-MM-JJ' allant de '1000-01-01' à '9999-12-31'	TEXT	Stocke des chaînes de 65535 caractères maximum.

Selon Vulgarisation informatique⁴⁵¹.

Pour construire nos tables comme nous les avons imaginées dans le schéma conceptuel, MySQL Workbench fournit via une barre d'outils située à gauche du diagramme la possibilité d'ajouter des tables et de créer les relations « (n-n) ». Une fois la table créée avec l'icône de création de table (**Figure 77**), et une fois celle-ci placée sur le diagramme, il faut maintenant

ajouter les attributs qui la caractérisent. On commence par indiquer le nom de l'identifiant de la table, puis ensuite les autres attributs, pour lesquels il faut renseigner des caractéristiques, comme le type de données, en choisissant l'une des possibilités illustrées précédemment (Tableau 23), ou s'il peut être nul, automatiquement incrémenté... (Figure 78).



pour l'attribut en question. La suite des cases à cocher indique la caractéristique de l'attribut : « PK » signifie que l'attribut est la clé primaire de la table ; « NN » signifie si coché que l'attribut ne peut être nul ; « UQ » signifie un index unique ; « BIN » signifie que l'attribut est binaire ; « UN » signifie que le type de données ne peut être renseigné ; « ZF » quand la valeur est numérique, indique 0 ; « AI » signifie que l'attribut va s'auto incrémenter

Le schéma relationnel est ainsi réalisé dans MySQL Workbench (**Figure 79**). En plus des attributs définis dans le schéma conceptuel, des attributs « Remarques » ont été ajoutés pour les tables Brevet, Variant, Modifications_AA, Modifications_Gly, Modifications_Dom, avec des champs libres en nombre de caractère, permettant de noter tout ce qui pourrait être intéressant à la compréhension d'un brevet et de ses variants.

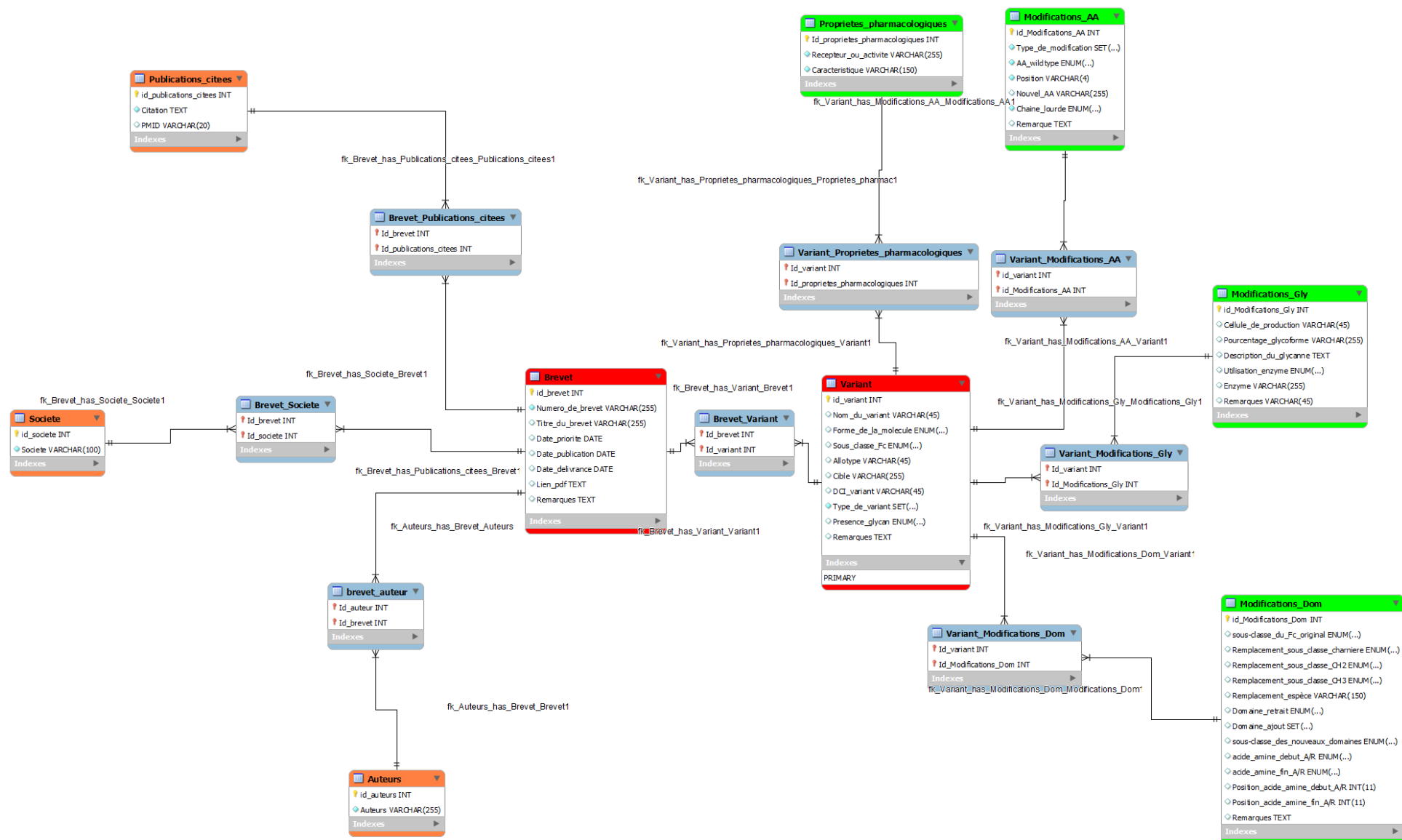
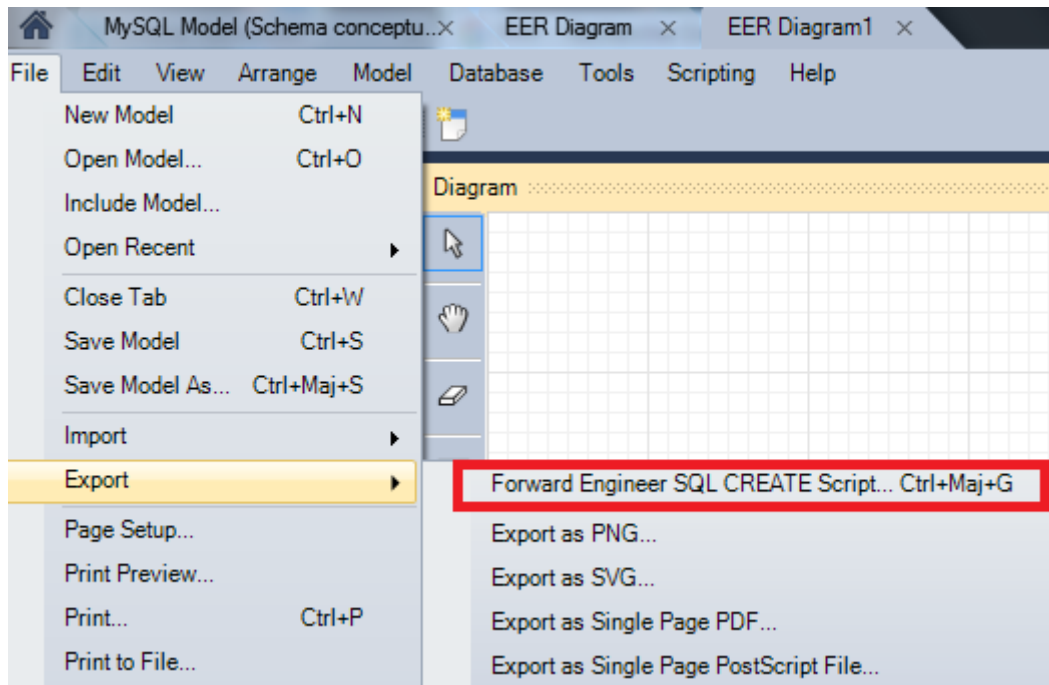


Figure 79 : Schéma relationnel de la base de données

A partir de ce schéma et via l'outil d'exportation de MySQL Workbench, il est possible d'extraire le code SQL de la base de données (**Figure 80**), et de l'importer dans PhpMyAdmin.

Figure 80 : Outil d'exportation de script SQL de MySQL Workbench



Après avoir lancé EasyPHP, et donc lancé nos serveurs, il suffit d'accéder à PhpMyAdmin via le panel d'administration disponible après avoir lancé EasyPHP, et d'ouvrir le module PhpMyAdmin. Une fois dans PhpMyAdmin, il suffit de créer une base de données vierge et d'importer le code SQL extrait dans MySQL Workbench. Pour ce faire, il suffit après avoir créé une base de données (**Figure 81**) d'importer le fichier contenant le code SQL de la base (**Figure 82**). Les tables configurées apparaissent ainsi dans notre base de données (**Figure 83**).

Bases de données

[Créer une base de données](#)

⚠ Note: L'activation des statistiques peut causer un trafic important entre le serveur web et le serveur M

Base de données	Interclassement	Réplication maître	
☐ fc variants	latin1_swedish_ci	✓ Répliqué	Vérifier les privilèges
☐ fc variant v2	latin1_swedish_ci	✓ Répliqué	Vérifier les privilèges
☐ fc variant v3	latin1_swedish_ci	✓ Répliqué	Vérifier les privilèges
☐ fc variant v4	utf8_general_ci	✓ Répliqué	Vérifier les privilèges
Total: 4	latin1_swedish_ci		

↑ ☐ Tout cocher Pour la sélection : [Supprimer](#)

Figure 81 : Création d'une base de données dans PhpMyAdmin

Pour créer la base de données il suffit de lui donner un nom dans le cadre dédié et d'appuyer sur « Créer ».

Figure 82 : Page d'importation du fichier SQL conçue grâce à MySQL Workbench

Nos tables sont ainsi importées directement et la base de données est prête à être utilisée.

Importation dans la base de données «thèse»

Fichier à importer :

Le fichier peut être compressé (gzip, bzip2, zip) ou non.
Le nom du fichier compressé doit se terminer par `.[format].[compression]`. Exemple: `.sql.zip`

☐ Parcourir : Aucun fichier choisi (Taille maximum: 2 048Kio)

☐ Choisissez depuis le répertoire de téléchargement du serveur web `../data/databases/` :

Jeu de caractères du fichier :

Importation partielle :

☒ Permettre l'interruption de l'importation si la limite de temps configurée dans PHP est sur le point d'être atteinte.
 (Ceci pourrait aider à importer des fichiers volumineux, au détriment du respect des transactions.)
 Ignorer ce nombre de requêtes (pour SQL) ou de lignes (autres formats), à partir du début :

Format :

Options spécifiques au format :

Mode de compatibilité SQL :

☒ Ne pas utiliser AUTO_INCREMENT pour la valeur zéro

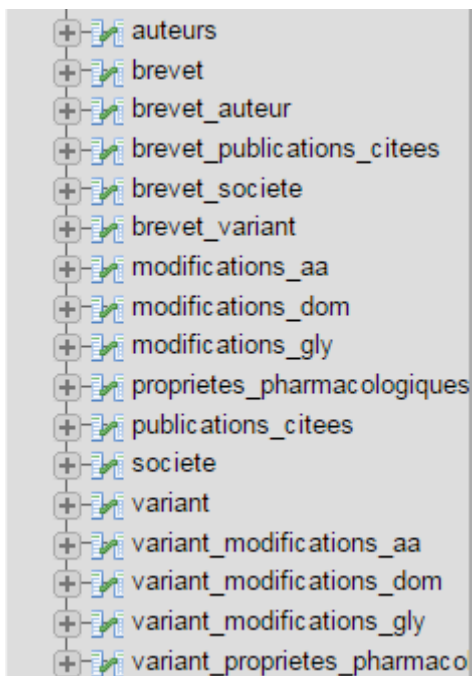


Figure 83 : Tables importées après création de la base de données

La base est ainsi disponible pour rentrer les informations identifiées durant l'analyse microscopique du corpus de brevets. Dans un intérêt de gain de temps, nous avons réalisé une extraction dans Orbit[®] en format Excel de tous les Auteurs et Sociétés des brevets de notre corpus de brevets. A partir de ces fichiers Excel, en utilisant les outils disponibles permettant d'éliminer les doublons et en réalisant une recherche des termes correspondants aux mêmes Auteurs ou Société, nous

avons pu établir une liste pertinente de ces deux attributs. L'idée avec cette liste est donc de rentrer ces informations dans les tables correspondantes, afin qu'ensuite nous n'ayons plus qu'à indiquer l'ID de chacun de ces attributs dans la table intermédiaire entre ces deux tables et la table brevet, sans avoir à passer par l'implémentation d'un nouvel auteur ou société à chaque fois. Si l'auteur ou la société ne sont pas présent dans ces tables, il restera toujours la possibilité de les rajouter.

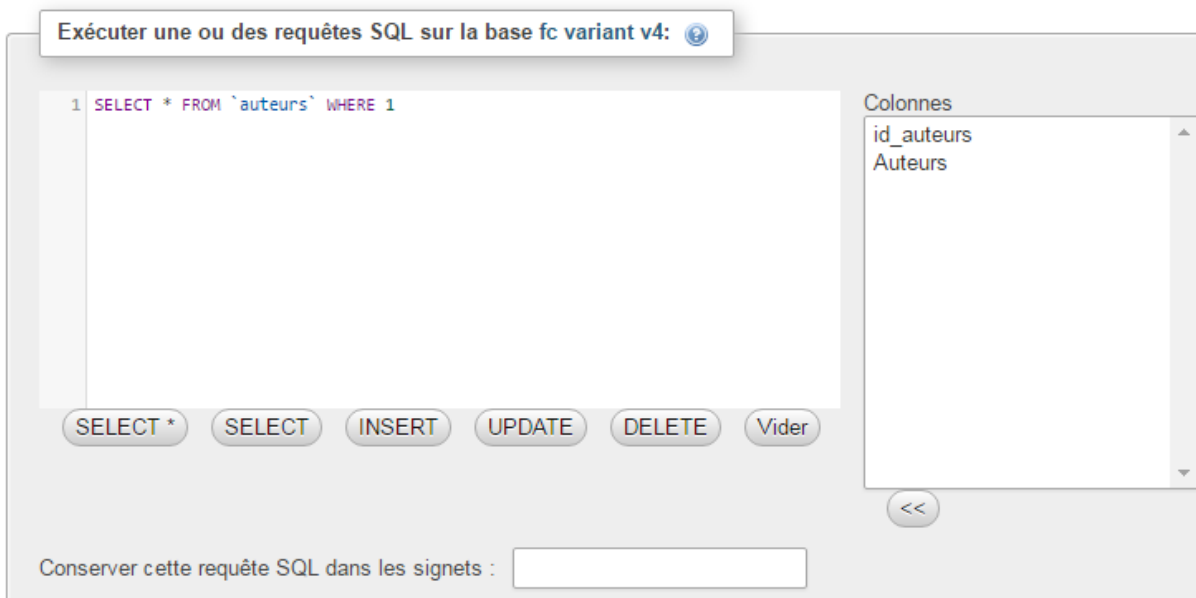


Figure 84 : Outil d'importation de code SQL dans phpMyAdmin

Pour réaliser l'importation de ces quantités de données, un outil de rentrée de requêtes SQL est disponible dans PhpMyAdmin (**Figure 84**), et permet donc d'importer une grande quantité d'informations dans la base via une formule :

« *INSERT INTO 'Nom de la table'('noms des attributs', '...' ...) Values(((('";value1;"),('";value2;") ...));")* ».

Pour formater le code SQL en fonction de la table visée et des données possible à importer dans la base, ici des noms d'auteurs et de société, on utilise dans Excel la formule « CONCATENER ». Cette formule permet d'accoler plusieurs données en une seule expression. Ainsi après avoir assigné une colonne Excel par attribut de la table en question (**Figure 85**), et y avoir indiqué les données que l'on veut rentrer dans chacun de ces attributs, il suffit de rentrer une formule du type (Ici pour la table variant) :

=CONCATENER("INSERT INTO `variant`(`id\_variant`, `Nom\_du\_variant`, `Forme\_de\_la\_molecule`, `Sous\_classe\_Fc`, `Allotype`, `Cible`, `DCI\_variant`, `Type\_de\_variant`, `Presence\_glycan`, `Remarques`)VALUES(((('";A2;"),('";B2;"),('";C2;"),('";D2;"),('";E2;"),('";F2;"),('";G2;"),('";H2;"),('";I2;"),('";J2;")));")

Les termes A2, B2, C2, etc... correspondent aux colonnes du tableau Excel en rapport avec les données (**Figure 85**). Après validation de la ligne, nous obtenons la chaîne de caractère concaténées suivante :

INSERT INTO `variant`(`id\_variant`, `Nom\_du\_variant`, `Forme\_de\_la\_molecule`, `Sous\_classe\_Fc`, `Allotype`, `Cible`, `DCI\_variant`, `Type\_de\_variant`, `Presence\_glycan`, `Remarques`) VALUES (('6162'),(''),('Autre (Voir remarques)'),('IgG1'),(''),(''),('Peptidique, Domaine'),('Oui'),('Formation hexamère composé dun polypeptide suivi de charnière-CH2-CH3 puis une queue IgM et une modif L359C pour créer des ponts disulfures'));

Cette chaîne de caractère sera copiée dans l'outil de rentrée de code SQL de la base de données (**Figure 84**), et permettra de rentrer une ligne complète de la table correspondante. A l'aide de ce genre de manipulation, il est beaucoup plus facile de rentrer un grand nombre d'informations.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Id variant	Nom du variant	Forme de la molécule	Sous classe Fc	Allo	Cibl	DCI	Type de variant	Présence glycan	Remarques				
6162		Autre (Voir remarques)	IgG1				Peptidique, Domaine	Oui	Formation hexamère composé d'un polypeptide suivi de charnière-CH2-CH3 puis une queue IgM et une modif L359C pour créer des ponts disulfures				INSERT INTO 'variant'('id_va
6163		Autre (Voir remarques)	IgG1				Peptidique, Domaine	Oui	Formation hexamère composé d'un polypeptide suivi de charnière-CH2-CH3 puis une queue IgM et une modif L359C pour créer des ponts disulfures				INSERT INTO 'variant'('id_va
6164		Autre (Voir remarques)	IgG1				Peptidique, Domaine	Oui	Formation hexamère composé d'un polypeptide suivi de charnière-CH2-CH3 puis une queue IgM et une modif L359C pour créer des ponts disulfures				INSERT INTO 'variant'('id_va

Figure 85 : Exemple de tableur Excel permettant l'importation de grandes quantités de données dans la base de données

Cette technique a été appliquée pour rentrer les auteurs et sociétés présents dans notre corpus de brevets avant de commencer à rentrer les brevets analysés durant l'analyse microscopique. Nous avons également utilisé cette technique pour les propriétés pharmacologiques, puisque certaines étaient facilement prédictibles, notamment la liaison à tous les récepteurs Fcγ, au FcRn, et des activités telle l'ADCC ou la CDC. Des nouvelles propriétés pharmacologiques seront également ajoutées au fur et à mesure du parcours des brevets. Pour chaque récepteur ou activité, des indices de valeur sont ajoutés : Augmentation, Réduction, Identique, et Abolition. Cette technique a été également très utile pour rentrer les informations des brevets déjà analysés et qui avaient été rentrés dans les bases de données Excel développées auparavant. Enfin, cette technique a été régulièrement employée pour rentrer les brevets ayant une grande quantité de variants, permettant de gagner un temps précieux.

La rentrée des informations intéressantes identifiées dans les brevets s'opère toujours de la même manière, même dans le cas des brevets ayant beaucoup de variant et dont un travail avec la formule CONCATENER est nécessaire:

1. Rentrer les informations de la table **BREVET**
2. Puisque les sociétés et les auteurs sont déjà rentrés, il est juste nécessaire de faire le lien entre ceux qui correspondent au brevet rentré. Pour se faire, il suffit d'implémenter les tables intermédiaires **BREVET_SOCIETE** et **BREVET_AUTEUR**, en faisant correspondre l'ID des sociétés et des auteurs identifié dans les tables **AUTEURS** et **BREVETS** avec l'ID du brevet relié.

La suite des étapes sera à répéter pour chaque variant présent dans un brevet

3. Rentrer les informations de la table **VARIANT**
4. Relier l'ID du variant de l'étape 3 avec l'ID du brevet correspondant dans la table intermédiaire **BREVET_VARIANT**
5. Pour les modifications, deux cas se présentent : Soit la modification est nouvelle, et dans ce cas il faut rentrer les informations sur les modifications dans les tables

MODIFICATIONS_AA, **MODIFICATIONS_GLY** **ou**
MODIFICATIONS_DOM, soit la modification (de quel type qu'elle soit) est déjà
rentrée dans les tables, et dans ce cas passer à l'étape 6. Cette étape est à répéter suivant
le nombre de modifications présentes dans le variant.

6. Relier l'ID du variant de l'étape 3 avec le ou les ID des modifications dans les tables
correspondant au type de modification : **VARIANT_MODIFICATIONS_AA**,
VARIANT_MODIFICATIONS_GLY ou **VARIANT_MODIFICATIONS_DOM**
7. Pour les propriétés pharmacologiques, deux cas se présentent : Soit la propriété est
nouvelle, et dans ce cas il faut rentrer les informations sur celle-ci dans la table
PROPRIETES_PHARMACOLOGIQUES, soit la propriété est déjà rentrée dans les
tables, et dans ce cas passer à l'étape 8. Cette étape est à répéter suivant le nombre de
propriétés pharmacologiques décrites pour le variant.
8. Relier l'ID du variant de l'étape 3 avec le ou les ID des propriétés pharmacologiques
dans la table **VARIANT_PROPRIETES_PHARMACOLOGIQUES**

Bien sûr, ces étapes sont soumises à l'existence de données à rentrer. Il est tout à fait concevable
de ne pas rentrer de propriétés pharmacologiques pour un variant, si celles-ci ne sont pas
renseignées. La rentrée des publications citées par les brevets a finalement été abandonnée,
puisque le nombre de publications citées par brevet augmentait grandement, et le temps alloué
y devenait trop important.

Newsletter 049 31/2015



- MAbWatch, Newsletter de la veille organisée par MAbImprove 31/2015 -

ESSAIS CLINIQUES

La société américaine FibroGen annonce avoir obtenu l'autorisation de la FDA pour le lancement d'études cliniques pour le **FG-3019** (IgG1 anti-CTGF) dans le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne.

En savoir plus : [Communiqué de FibroGen - 27/07/2015](#)

La société belge UCB annonce des résultats négatifs pour l'**epratuzumab** (IgG1 anti-CD22) dans une étude de phase III dans le traitement du lupus érythémateux disséminé.

En savoir plus : [Communiqué d'UCB - 28/07/2015](#)

La société suisse HUMABS BioMed annonce des résultats précliniques positifs pour le **LCA60** (anticorps anti-Coronavirus) dans la prévention et le traitement de l'infection par le coronavirus MERS.

En savoir plus : [Communiqué d'Humabs - 28/07/2015](#)

VIE DES PRODUITS

Sanofi et Regeneron annoncent avoir obtenu un avis favorable du CHMP (Comité européen des médicaments à usage humain) pour la commercialisation de l'**alirocumab/Praluent®** (IgG1 anti-PCSK9) dans le traitement de l'hypercholestérolémie.

En savoir plus : [Communiqué de Sanofi - 24/07/2015](#)

Sanofi et Regeneron annoncent également l'obtention d'une AMM de la FDA pour l'**alirocumab/Praluent®** (IgG1 anti-PCSK9) dans le traitement de l'hypercholestérolémie.

En savoir plus : [Communiqué de Sanofi - 24/07/2015](#)

BMS et AbbVie vont disposer d'une procédure accélérée de l'EMA pour l'étude du dossier d'AMM de l'**élotuzumab** (IgG1 anti-SLAMF7) dans le traitement du myélome multiple en 2ème ligne.

En savoir plus : [Communiqué de BMS - 27/07/2015](#)

La société israélienne Teva Pharmaceutical annonce l'obtention d'une AMM de l'EMA pour le **reslizumab** (IgG4 anti-IL-5) dans le traitement de l'asthme éosinophilique chez l'adulte.

En savoir plus : [Communiqué de Teva - 28/07/2015](#)

AbbVie annonce avoir obtenu une AMM de l'EMA pour l'**adalimumab/Humira**® (IgG1 anti-TNFα) dans le traitement de l'hidradénite suppurée modérée à sévère.

En savoir plus : [Communiqué de AbbVie - 30/07/2015](#)

Roche annonce avoir obtenu une AMM de l'EMA pour le **pertuzumab/Perjeta**® (IgG1 anti-HER-2) en tant que traitement néoadjuvant (avant chirurgie) du cancer du sein HER2+.

En savoir plus : [Communiqué de Roche - 31/07/2015](#)

ACCORDS - COLLABORATIONS - LEVEE DE FONDS

AbbVie annonce des revenus en hausse de 19% (à 5,5 milliards de dollars) pour le 2^{ème} trimestre par rapport à 2014.

En savoir plus : [Communiqué de AbbVie - 24/07/2015](#)

Biogen annonce des revenus en hausse de 7% (à 2,6 milliards de dollars) pour le 2^{ème} trimestre par rapport à 2014.

En savoir plus : [Communiqué de Biogen - 24/07/2015](#)

La société allemande MorphoSys annonce des revenus en hausse de 170% (à 83 millions d'euros) pour le 2^{ème} trimestre par rapport à 2014.

En savoir plus : [Communiqué de MorphoSys - 27/07/2015](#)

Pfizer annonce des revenus en baisse de 7% (à 11,8 milliards de dollars) pour le 2^{ème} trimestre par rapport à 2014.

En savoir plus : [Communiqué de Pfizer - 28/07/2015](#)

Merck annonce une diminution de ses ventes de 11% (à 9,8 milliards de dollars) pour le 2^{ème} trimestre par rapport à 2014.

En savoir plus : [Communiqué de Merck - 28/07/2015](#)

Hospira annonce une augmentation de ses ventes de 4% (à 1,2 milliards de dollars) pour le 2^{ème} trimestre par rapport à 2014.

En savoir plus : [Communiqué d'Hospira - 29/07/2015](#)

Sanofi annonce un chiffre d'affaire en hausse de 5% (à 9,4 milliards de dollars) pour le 2^{ème} trimestre par rapport à 2014.

En savoir plus : [Communiqué de Sanofi - 30/07/2015](#)

AstraZeneca annonce des revenus en hausse de 2% (à 6,3 milliards de dollars) pour le 2^{ème} trimestre par rapport à 2014.

En savoir plus : [Communiqué de AstraZeneca - 30/07/2015](#)

GSK annonce des revenus en hausse de 7% (à 5,9 milliards de dollars) pour le 2^{ème} trimestre par rapport à 2014.

En savoir plus : [Communiqué de GSK - 29/07/2015](#)

Alexion annonce des revenus en hausse de 24% (à 636 000 dollars) pour le 2^{ème} trimestre par rapport à 2014.

En savoir plus : [Communiqué d'Alexion - 30/07/2015](#)

UCB annonce des revenus en hausse de 21% (à 1,9 milliards de dollars) pour le 2^{ème} trimestre par rapport à 2014.

En savoir plus : [Communiqué d'UCB - 31/07/2015](#)

Amgen annonce des revenus en hausse de 4% (à 5,4 milliards de dollars) pour le 2^{ème} trimestre par rapport à 2014.

En savoir plus : [Communiqué d'Amgen - 30/07/2015](#)

Sanofi et Regeneron annoncent une nouvelle collaboration majeure en oncologie pour continuer le développement d'un anticorps anti-PD-1 actuellement en phase I.

En savoir plus : [Communiqué de Sanofi - 28/07/2015](#)

Merck annonce l'acquisition de la société israélienne cCAM Biotherapeutics, propriétaire du **CM-24** (anticorps anti-CEACAM1).

En savoir plus : [Communiqué de Merck - 28/07/2015](#)

BMS annonce sa collaboration avec Kyowa Hakko Kirin pour réaliser des études cliniques sur l'association du **mogamulizumab** (IgG1 afucosylée anti-CCR4) et du **nivolumab/Opdivo®** (IgG4 anti-PD-1) dans le traitement de tumeurs solides.

En savoir plus : [Communiqué d'BMS - 29/07/2015](#)

La société danoise CMC Biologics annonce sa collaboration avec la société américaine River Vision Development Corporation pour le développement du **teprotumumab/RV001** (anticorps anti-IGF-1R) dans le traitement de l'orbitopathie endocrinienne.

En savoir plus : [Communiqué de CMC Biologics - 29/07/2015](#)

La société allemande MorphoSys et la société anglaise Heptare Biotherapeutics annoncent le lancement d'un programme de développement d'anticorps dirigés contre des GPCR.

En savoir plus : [Communiqué d'Heptare Biotherapeutics - 30/07/2015](#)

BIOSIMILAIRES

La société américaine Oncobiologics annonce l'obtention d'un financement de 31 millions de dollars pour poursuivre le développement de ses biosimilaires.

En savoir plus : [Communiqué d'Oncobiologics - 27/07/2015](#)

AstraZeneca annonce sa collaboration avec la société japonaise Fujifilm Kyowa Kirin Biologics pour développer le **FKB238**, biosimilaire du **bévacizumab/Avastin®** (IgG1 anti-VEGFa).

En savoir plus : [Reuters](#) - 24/07/2015

REVUES - ARTICLES

AUTRES

APPELS D'OFFRE D'INTÉRÊT - BOURSES

CONGRÈS À VENIR

Antibody Engineering & Therapeutics Asia - Call for Speakers Proposals

En savoir plus : [IBC Life Science](#) - 12/08/2015 - 13/08/2015

The European Cancer Congress 2015

En savoir plus : [ECCO](#) - 25/09/2015 - 29/09/2015

6th Annual Biosimilars and Biobetters Conference

En savoir plus : [SMI](#) - 30/09/2015 - 01/10/2015

BioProduction 2015

En savoir plus : [Informa](#) - 14/10/2015 - 15/10/2015

European Antibody Congress

En savoir plus : [Terrapinn](#) - 09/11/2015 - 11/11/2015 [Programme](#)

World Biosimilar Congress (Europe)

En savoir plus : [Terrapinn](#) - 09/11/2015 - 10/11/2015

5th International Workshop on Humanized Mice

En savoir plus : [IWHM](#) - 28/01/2016 - 30/01/2016

Si vous souhaitez vous désabonner, veuillez nous le notifier à labex_mabimprove@univ-tours.fr.

Newsletter 086 21/2016 :



- **MABWatch, Newsletter de la veille organisée par MABImprove 21/2016** -

ESSAIS CLINIQUES

La société Irlandaise Prothena va présenter à l'*International Symposium on Amyloidosis* des résultats sur le **NEOD001** (IgG1 anti-agrégat de chaînes légères) dans une étude de phase I/II dans le traitement des formes multiples d'amylose.

En savoir plus : [Communiqué de Prothena - 23/05/2016](#)

Immunomedics va présenter au congrès annuel de l'*American Society of Clinical Oncology* (ASCO) des nouveaux résultats d'essais cliniques portant sur le **sacituzumab govitecan** (ADC conjugué au SN-38 ciblant le récepteur Trop 2) dans le traitement du cancer du sein et du cancer du poumon non à petites cellules.

En savoir plus : [Erreur ! Référence de lien hypertexte non valide.](#)

Abbvie annonce des résultats positifs pour le **risankizumab** (IgG1 anti-IL-23 modifié sur L234A et L235A pour réduire les fonctions effectrices) dans une étude de phase II dans le traitement de la maladie de Crohn modérée à sévère.

En savoir plus : [Communiqué de Abbvie - 24/05/2016](#)

La société québécoise Theratechnologies annonce des résultats positifs pour l'**ibalizumab** (IgG4 anti-CD4) dans une étude de phase III dans le traitement du VIH-1 multirésistant aux traitements.

En savoir plus : [Communiqué de Theratechnologies - 24/05/2016](#)

Seattle Genetics annonce le lancement d'une étude de phase III pour le **vadastuximab talirine/SGN-CD33A** (ADC ciblant le CD33) dans le traitement de la leucémie myéloïde aiguë nouvellement diagnostiquée.

En savoir plus : [Communiqué de Seattle Genetics - 25/05/2016](#)

XBiotech va présenter des résultats positifs à l'*American Academy of Neurology* pour le **Xilonix™** (IgG1 anti-IL-1a) dans une étude de phase III dans le traitement du cancer colorectal.

En savoir plus : [Communiqué de XBiotech - 24/05/2016](#)

Albynix va présenter au congrès de l'*European Hematology Association* des résultats positifs pour le **caplacizumab** (nanobody (VHH) anti-facteur de von Willebrand) dans une étude de phase II dans le traitement du purpura thrombotique thrombocytopénique.

En savoir plus : [Communiqué de Albynix - 26/05/2016](#)

Roche annonce des résultats positifs pour l'**obinutuzumab/Gazyvaro®/Gazyva®** (IgG1 anti-CD20) dans une étude de phase III en comparaison avec le **rituximab/Rituxan®** (IgG1 anti-CD20) dans le traitement du lymphome folliculaire précédemment non traité.

En savoir plus : [Communiqué de Roche - 27/05/2016](#)

Amgen Astellas annonce des résultats positifs pour l'**évolocumab/Repatha®** (IgG2 anti-PCSK9) dans une étude de phase III dans le traitement de l'hypercholestérolémie chez l'adulte japonais souffrant d'un diabète de type II.

En savoir plus : [Communiqué d'Amgen Astellas - 23/05/2016](#)

VIE DES PRODUITS

Chugai annonce l'obtention d'une extension d'indication au Japon pour le **bévacizumab/Avastin®** (IgG1 anti-VEGFa) dans le traitement du cancer cervical avancé ou en rechute.

En savoir plus : [Communiqué de Chugai Pharmaceutical - 23/05/2016](#)

Genmab annonce avoir obtenu une AMM européenne pour le **daratumumab/Darzalex®** (IgG1 anti-CD38) dans le traitement des myélomes multiples.

En savoir plus : [Communiqué de Genmab - 23/05/2016](#)

Regeneron apporte des clarifications précises sur la prescription d'**aflibercept/Eylea®** (protéine de fusion anti-VEGFA) aux Etats-Unis.

En savoir plus : [Communiqué de Regeneron - 25/05/2016](#)

ACCORDS - COLLABORATIONS - LEVEE DE FONDS

Chugai Pharmaceutical et l'Université d'Osaka annoncent leur accord de collaboration dans la recherche de traitement en immunologie.

En savoir plus : [Communiqué de Chugai Pharmaceutical - 19/05/2016](#)

La société japonaise Ono Pharmaceuticals annonce avoir conclu un accord de licence exclusif avec ses compatriotes d'IDAC Theranostics pour le développement de l'**IT1208** (IgG1 anti-CD4 à ADCC augmenté) dans le traitement des tumeurs solides.

En savoir plus : [Communiqué de Ono Pharmaceutical - 17/05/2016](#)

La société américaine Tetragenetics et la startup française Theranyx annoncent leur collaboration pour la recherche et le développement d'anticorps monoclonaux thérapeutiques.

En savoir plus : [Business Wire - 25/05/2016](#)

BIOSIMILAIRES

Merck annonce que la FDA a donné un avis favorable à Samsung Bioepis pour la revue de la demande d'AMM du **SB2**, biosimilaire de l'**infliximab/Remicade®** (IgG1 anti-TNFα).

En savoir plus : [Communiqué de Merck - 23/05/2016](#)

Sandoz annonce que l'EMA a accepté d'examiner la demande d'AMM européenne pour son biosimilaire du **rituximab/Rituxan®** (IgG1 anti-CD20).

En savoir plus : [Communiqué de Novartis - 24/05/2016](#)

REVUES - ARTICLES

AUTRES

APPELS D'OFFRES D'INTÉRÊTS - BOURSES

CONGRÈS À VENIR

Targeting Membrane Protein

En savoir plus : [World Preclinical Congress - 16-17/06/2016](#)

Congrès annuel de l'American Society of Clinical Oncology

En savoir plus : [ASCO - 03-07/06/2016](#)

Colloque Polepharma Bioproduction - De la chimie vers la bioproduction, les bonnes pratiques de la diversification

En savoir plus : [PolePharma - 30/06/2016](#)

4èmes Assises Industrielles du LabEx MAbImprove - Current and Next Antibody Formats

En savoir plus : [MAbDesign - 04-05/07/2016](#)

12th International Congress of Cell Biology

En savoir plus : [ICCB - 21-25/07/2016](#)

Si vous souhaitez vous désabonner, veuillez nous le notifier à labex_mabimprove@univ-tours.fr.

Variants de la portion Fc des IgG

Résumé

Plus de 40 ans après la découverte de la technologie des hybridomes, une soixantaine d'anticorps monoclonaux thérapeutiques IgG ou assimilés sont aujourd'hui commercialisés. Leur succès découle de leur humanisation, en particulier celle de la portion Fc qui dérive de différents variants humains naturels, isotypes et allotypes. Depuis quelques années, apparaissent sur le marché de nombreux anticorps comportant des portions Fc artificiellement modifiées dans le but de moduler diverses propriétés pharmacologiques (propriétés cytolytiques, demi-vie, stabilité, etc.), dont certaines ont été particulièrement étudiées suite aux travaux de notre équipe. Les variants Fc sont protégés par des technologies brevetées dont on connaît mal l'étendue, qui ne font pas nécessairement l'objet de publications scientifiques, et dont la raison d'être reste méconnue des chercheurs et plus encore des professionnels de santé. Nous avons donc entrepris de réaliser une cartographie et une analyse fine des brevets traitant des modifications dans la portion Fc des IgG. Cette analyse a été menée de front avec une étude bibliographique détaillée, car les données scientifiques décrites dans les brevets sont toujours à considérer avec prudence, les demandes de brevets n'étant pas revues par des pairs. Nous avons eu l'occasion d'ailleurs d'épingler certaines dérives, comme celle de considérer qu'il pourrait y avoir plus de 4 sous-classes d'IgG dans l'espèce humaine (jusqu'à 19 dans certaines revendications...).

Nous avons rassemblé un corpus de 998 brevets décrivant des variants Fc, dont l'analyse macroscopique fait apparaître une répartition croissante depuis 1988, avec une accélération des dépôts ces 3 dernières années, confirmant l'intérêt grandissant de l'industrie pharmaceutique pour ce sujet. L'analyse microscopique a été réalisée sur les 317 premiers brevets du corpus, permettant d'indexer 5038 variants Fc dans la base IgVarImprove que nous avons développée et qui permet de lier chaque variant moléculaire aux propriétés biologiques décrites dans la partie « Exemples » des brevets. La majorité des variants concerne la sous-classe IgG1, avec des variations peptidiques du domaine CH2 destinées à moduler les propriétés effectrices des anticorps, que l'on retrouve aujourd'hui dans des molécules commercialisées comme le vedolizumab. L'analyse d'un sous-ensemble de 103 brevets du corpus entier, tous ceux qui décrivent des variants Fc d'IgG4, a été réalisée de façon exhaustive, et nous a permis d'indexer 537 variants moléculaires. Contrairement au corpus entier, ces variants moléculaires visent davantage à moduler la stabilité de la molécule, en lien avec le phénomène d'échange d'hémi-IgG propre aux IgG4. La cartographie de ces modifications peptidiques fait ainsi apparaître des hot-spots plus volontiers mutés, essentiellement dans la charnière ou dans le CH3, les deux régions contribuant à ce phénomène. Les technologies les plus anciennement décrites sont dorénavant tombées dans le domaine public, ce qui explique l'augmentation de la proportion d'anticorps à Fc muté parmi les IgG4 commercialisées depuis 2014 (6 sur 8).

Le recensement de tous ces variants moléculaires nous a également amené à nous poser la question d'une nomenclature simple, qui permettrait d'identifier plus facilement les anticorps ayant les mêmes modifications, dans l'hypothèse où ils produiraient des effets secondaires similaires. Nous proposons au final une nomenclature inspirée de celle des allotypes d'IgG, que nous proposons d'adopter à la dénomination commune internationale des anticorps, qui nécessite elle aussi d'être revue afin de mieux distinguer les anticorps qui possèdent une portion Fc de ceux qui n'en ont pas.

Anticorps thérapeutiques – Fc – Variants moléculaires – Analyse brevet – Cartographie – Immunoglobuline – Base de données – Nomenclature – DCI

Résumé en anglais

More than 40 years after the discovery of the hybridoma technology, around sixty therapeutic monoclonal antibodies based on IgG or assimilated are marketed today. Their success comes from their humanization, especially of the Fc portion derived from various natural human variants, isotypes and allotypes. For some years, many antibodies artificially modified in their Fc portions have emerged, in order to alter various pharmacological properties (cytolytic properties, half-life, stability, etc.), some of them having been particularly studied following the works of our team. Fc variants are covered by patented technologies of which little is known about the extent, which are not necessarily the subject of scientific publications, and whose purpose remains unknown for researchers and even more for health professionals. We therefore undertook to realize a landscape and a detailed analysis of patents dealing with modifications in the Fc portion of IgG. This analysis has been conducted in front with a detailed literature survey, since the scientific data described in patents must be treated with caution, as patent application are not peer reviewed. We actually point certain abuses, such as to consider that there might be more than four human IgG subclasses (up to 19 in some claims...).

We collected a pool of 998 patents describing Fc variants, for which the macroscopic analysis reveals an increasing filing of patents since 1988, with an acceleration during the last three years, confirming the growing interest for the subject of the pharmaceutical industry. The microscopic analysis performed on the older 317 patents allowed us to index 5038 Fc variants in the IgVarImprove database that we developed, and which permits to link every molecular variants with their biological properties described in the "Examples" section of patents. The majority of the variants relates to IgG1 subclass, with peptide variations of the CH2 domain in order to modulate the effector properties, presently found in marketed molecules like vedolizumab. The analysis of a subset of 103 patents, describing IgG4 Fc variants, was exhaustively carried out, and enabled us to index 537 molecular variants. Contrary to the whole pool, these molecular variants are mostly intended to modulate the stability of the molecule, linked to the hemi-IgG4 interchange phenomenon peculiar to IgG4. Mapping these peptide modifications shows hotspots mostly located in hinge or CH3, the two regions contributing to this phenomenon. The oldest described technologies are now free to use, explaining the increase of Fc mutated IgG4 marketed since 2014 (6 of 8).

The census of all these molecular variants has also led us to ask ourselves about a simple nomenclature, which would permit to readily identify antibodies having the same modifications, in case of similar side effects. We finally propose a nomenclature inspired on that of IgG allotypes that we suggest to add to international nonproprietary names of antibodies, which also requires to be reviewed to better distinguish antibodies having a Fc portion of those who do not..

Therapeutic antibodies – Fc – Molecular variants – Patent analysis – Mapping – Immunoglobulin – Database – Nomenclature - INN