

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

UMR CNRS 7292 Génétique Immunothérapie, Chimie et Cancer

THÈSE

présentée par :

Guillaume BRACHET

soutenue le : 4 décembre 2017

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

Discipline/ Spécialité : Immunologie

Déterminants moléculaires de la pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques

THÈSE dirigée par :

Mme GOUILLEUX-GRUART Valérie

Maître de conférences HDR-Praticien Hospitalier,
Université François Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

Mme VALSESIA-WITTMANN Sandrine

Chercheur HDR,
Centre de Recherche en cancérologie de Lyon
Professeur des Universités

Mr BILLIALD Philippe

Museum National d'Histoire Naturelle, Paris

JURY :

Mr. Philippe BILLIALD

Professeur, Université Paris Sud

Mme Valérie GOUILLEUX-GRUART

Maître de conférences HDR – Praticien Hospitalier,
Université François Rabelais de Tours

Mme Marie-Alix POUL

Professeur, IRC de Montpellier

Mr. Renaud RESPAUD

Maître de conférences – Praticien Hospitalier,
Université François Rabelais de Tours

Mme Sandrine VALSESIA-WITTMANN,

Chercheur HDR,

Mr. Hervé WATIER

Centre de Recherche en cancérologie de Lyon

Professeur, Université François Rabelais de Tours

À ma fille Émilie, pour les soirs où compter les moutons ne suffit pas.

Remerciements

Merci aux gnathostomes, les véritables inventeurs des anticorps.

(Sans vouloir manquer de respect à Kohler et Milstein)

Merci aux membres du jury,

Tout particulièrement à Philippe et Hervé, pour avoir accepté de juger « toutes » mes thèses.

Merci à Sandrine et Marie-Alix, de faire tout ce trajet juste pour ce travail.

Merci à Valérie et Renaud pour l'encadrement, les relectures et toute l'aide.

Merci à Mie Bot,

De me supporter au quotidien, de me ramener un peu sur Terre, me rappeler de me poser de temps en temps, merci pour cette petite poupette qui est (très) objectivement le plus-beau-bébé-du-monde, pour ton humour (si si !), en particulier avoir assuré ma diversification alimentaire (ça te dit une fondue de courgettes ?), depuis bientôt dix ans.

Merci aux copains,

Côme, merci pour ton aide, ton regard scientifique, les analyses de matrices, les réunions pour discuter de ce projet alors que tu avais ta propre thèse en route, et pour les réanalyses de vérification. Merci pour tes idées révolutionnaires mais surtout pour être resté toi, avoir –largement– fait perdurer ton côté (bon-) enfant, et pour ta curiosité infinie.

La bande de toujours, les Psys, les Bouchons, les Communistes, les Profs, Judith, Alex, ainsi qu'au Roux de secours, pour les soirées, les goûters, les barbecues, les délires, les vacances, les événements en tout genre, votre humour, pour vos passions, pour avoir partagé notre vie et traversé les époques avec nous. Mention particulière à mon Toinou, membre du Troupe, témoin de mariage, camarade de course à pied, de vélo, de moto, de squash, d'escalade, de karting, de ski, de soirées, de Curlys, de noix-de-pécan, de binouzes, de pif, de whisky, et j'en passe... Je te souhaite tout le meilleur, et en particulier de terminer ta maison. Un jour. Peut-être. Ça serait bien, non ?

Justine, pour être restée toi-même depuis tout ce temps. Pour les soirées sushi, uno, pour avoir partagé avec moi tes histoires ex-cep-tion-nelles de colocation, pour nous avoir fait voyager (par procuration aussi !) pour la découverte de Lyon à vélo, et pour m'avoir rasé la tête quand j'en ai eu besoin ! J'oublierai pas !

Flotte, pour les délires et les soirées depuis le lycée, les révisions du bac, pour nos petits cafés de Noël, les soirées en boîte, et pour avoir été un super témoin de mariage !

À Gégé et Philou, les copains du 22, ne vous traitez surtout pas. Vous êtes fous, restez-y.

Merci à la famille,

Mes parents, pour m'avoir transmis votre humour. Désolé pour les multiples bêtises de 1988 à nos jours...

La tribu Maret, pour les dîners en famille avec tous les fous rires que ça a engendré.

Les Schaeverbeke, pour les cousinades à Bordeaux, à Saint Chély, les souvenirs de gosse et d'adulte !

Mamie Janine, pour ta présence, ton aide et ton accueil lors de tous ces séjours pour les vacances, les études ou le boulot depuis mon plus jeune âge, pour m'avoir fait parcourir Paris et ses musées en long, en large et en travers, pour avoir accueilli Marie dans la famille comme ta petite fille.

Mes petites sœurs :

Gaëlle, pour tous les bons souvenirs d'enfance, et ceux de notre âge, les petits footings, les petits verres sur Paris. Encore une fois tous mes vœux de bonheur pour ta vie avec Crème d'Amour.

Mo, pour toutes les pitreries, toutes les bêtises plus ou moins dangereuses, sauf la luge. Je ne referais plus jamais de luge avec toi. Si je refais de la luge un jour.

Mes belles-sœurs, Morse et Lulu et leurs tendres, pour tous ces bons moments en famille, les WE à Saint Malo, Tours ou Poissy, les karaoké-imitations (Doudou Chryss au micro, « Stéphane François », etc...) à la désormais traditionnelle soirée cocktail annuelle.

Annie et Pierrot, tout simplement parce que je ne pouvais pas rêver mieux comme beaux-parents.

Monique, notre grand-mère d'adoption, depuis une décennie, pour m'avoir secouru quand j'étais coincé hors de mon appart', sale, avec un seau et une éponge, pour avoir partagé les anniversaires, les restos pour les petites occasions ou sans occasion particulière...

Merci aux bénévoles des associations,

Stéphane C, pour ton accueil, ta gentillesse, ta simplicité, pour nos petits restos en ville. D'ailleurs, faut qu'on remette ça rapidement ! Stéphane L. pour les dégustations de vin, partout, tout le temps et par tous les temps ! Dolorès, pour ta générosité sans bornes et ton sens de l'hospitalité, mais aussi Martine, Claudie, Claudine, Liliane, et tous les autres sans exception, pour votre accueil, votre bienveillance, pour cette ambiance unique où je me sens à ma place.

Aux bénévoles, titulaires et toutous de la SPA de Luynes, pour cet accueil éternellement enjoué.

Et aux bureaux du BIBIPHT et de l'ATAGIP (en voiture Simonne !), pour m'avoir supporté ces quelques années, pour ces Molkkys-rosés au parc de Strasbourg, pour cette AG fantastique portée par Tours, qui restera indubitablement dans les annales, pour les réunions-BBQ, réunions-pizzas, réunions-dégustations... et pour votre imagination, avec des idées brillantes et toujours surprenantes.

Merci aux collègues,

Valérie, pour m'avoir encadré depuis le M2, m'avoir permis d'aller en congrès un peu partout, pour ton aide à l'organisation au recentrage des manips, pour ta franchise, les multiples relectures, pour ta confiance, l'hébergement des soirées et barbecues, les cerises, les chocolats... en espérant pouvoir continuer comme ça après la thèse !

Renaud, merci de m'avoir pris dans ton équipe de bras cassés, d'avoir supporté mon humour, mes angoisses, de m'avoir fait remarquer que j'avais une sale gueule. Merci pour les soirées, les binouzes, les restos, merci de ne pas avoir pris le melon, de garder les pieds sur Terre et un sens des priorités sain.

M'ame Mychak, pour m'avoir véhiculé dans toutes tes voitures, pour ta gentillesse, ta bienveillance, ton aide, ta disponibilité et les bonbons ! Et merci de m'avoir débarrassé de l'hortensia.

M'ame Yvon, la maman de tous les doctorants. Merci d'avoir pensé pour nous en toutes circonstances, pour les OM en urgence (c'était le bon vieux temps !), l'aide aux commandes, et les bonbons !

Laurie, pour ta constance, ta bonne humeur et ta bonne volonté en toutes circonstances. Beaucoup de bonheur dans votre nouveau chez vous !

Chitine et tout le bureau des doctorants, passés et présents : Mira, Claire, Diana, Sajida, Maxou, Calou, Aurélien, Petite Tête, et puis je vais faire 2 minutes de social en remerciant Alexis-Kevin-Jean-Kevin-Jean-Mouloud-Corentin-Quentin,

Les membres du GICC : Plaket, David, William, Marc, Laetitia, Véro, Marine, Nico, Gilles, Fabrice, Jérôme, Idéfix, Farah, Nicola, Elfi, Sophie, Nathalie, Camille & Ludo, Marie-Claude, Stéphanie, Nicolas, Gildas et les autres.

Mon Gaëlus, (como takiiii ? Bukeela ?) pour tous les weekends-dégustations, soirées-dégustations, après-midi-dégustations, déjeuners-dégustations, petits-déjeuners-dégustations. En espérant enfin arriver à se faire le grand tasting ensemble.

L'immuno et en particulier Marie-Noëlle pour votre accueil et votre bonne humeur,

Merci aux anciens co-internes, et co-pharmaciens

Bobby, Elsa, pour votre folie, et votre aptitude à ne jamais me louper. Vaut mieux en rire. Ma Vieille Mèche, on l'aura, ton cheveu blanc. Prends conscience de ton bonheur, déjà t'es pas rousse. Imagine un peu... Cécile, merci d'avoir supporté ça. Tu es une Sainte. Et puis t'es pas vraiment rousse... Plutôt un genre de blond vénitien cuivré...

Tonton Claude, pour les papotes sérieuses -ou pas-, les cafés, et autres verres. Beaucoup de bonheur pour toi et Raphaël.

Mais aussi Grand Machin, Hélène Dewaele, Cuicuite d'amour, Ionion, toutes ces personnes de bonne volonté qui ont fait de l'internat un super moment de convivialité.

Résumé

La pharmacocinétique (PK) des anticorps monoclonaux (mAbs) est sujette à d'importantes variations interindividuelles. Le récepteur néonatal au Fc des IgG (FcRn) et le statut immunitaire à l'encontre de ces mAbs sont des déterminants de cette PK. La bioconjugaison des mAbs à des cytotoxiques entraîne une altération de leur PK. Nous montrons que le taux de couplage modifie l'affinité de ces espèces pour le FcRn à pH6. La proportion d'agrégats au sein des solutions d'anticorps armés augmente avec le taux de couplage et pourrait entraîner une altération de leur PK. Par ailleurs, cette agrégation est impliquée dans l'immunogénicité des mAbs, et nous avons donc cherché à identifier des acides aminés impliqués dans l'agrégation de mAbs indiqués en clinique. Il apparaît que la nature biochimique de résidus des paratopes pourrait augmenter cette agrégation. Les anti-TNF- α présentent très peu d'agrégats et figurent pourtant parmi les plus immunogènes chez l'Homme. Nous avons donc exploré le rôle des complexes immuns dans leur immunogénicité chez la souris. Il apparaît que la présence du FcRn n'est pas à l'origine de l'immunisation contre ces mAbs, contrairement à celle des complexes immuns.

Ces résultats donnent des pistes pour la production de mAbs plus efficaces et mieux tolérés.

Mots-clés : Pharmacocinétique ; anticorps monoclonaux thérapeutiques ; anticorps armés ; récepteur néonatal au Fc des IgG ; agrégats ; complexes immuns

Résumé en anglais

The pharmacokinetic (PK) profile of monoclonal antibodies (mAbs) shows interindividual variability. The neonatal Fc receptor (FcRn) and the immunogenicity of these mAbs are determinative factors of mAb PK. Generation of antibody-drug-conjugates alters their PK profile. We show that the affinity for FcRn at pH6 increases with the drug-to-mAb ratio, as does the amount of aggregates inside the mAb-drug-conjugate. The amount of aggregates could be responsible for an avidity effect towards FcRn. These aggregates are known to cause immunogenicity, so we studied biochemical determinants inside the aminoacid sequence of marketed mAbs. We show that the biochemical nature of some aminoacids inside the paratope has an impact on the amount of aggregation. Anti-TNF- α mAbs show very little aggregation but are very immunogenic in humans. We studied the role of the formation of immune complexes in the immunization against anti-TNF- α mAbs in mice, and showed that immune complexes, but not FcRn are essential in the immunization process against anti-TNF- α mAbs. These results give leads towards the generation of more efficient, better tolerated mAbs.

Keywords: pharmacokinetics ; therapeutic monoclonal antibodies ; antibody-drug-conjugates ; neonatal Fc receptor ; aggregates ; immune complexes.

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	5
Résumé en anglais	6
Table des matières	7
Liste des tableaux	9
Liste des figures	10
Liste des annexes	11
Abréviations	12
A. Introduction-contexte	14
1) Généralités sur les anticorps thérapeutiques	14
2) Relation structure-fonction	16
3) Pharmacologie des anticorps thérapeutiques	23
3.1) Notions de pharmacologie	23
3.2) Pharmacodynamie : comment agit un anticorps ?	24
4) Pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques	46
4.1) Définitions	46
4.2) Déterminants de la pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques	48
4.3) Pourquoi et comment augmenter la demi-vie de l'anticorps ?	60
B. Objectifs de la thèse	62
C. Première partie Impact du taux de couplage d'un anticorps armé sur la liaison au FcRn	64
1) Objectifs	65
2) Principaux résultats	68
D. Seconde partie Agrégation et immunogénicité des anticorps thérapeutiques	69
1) Objectifs	70
2) Matériel et méthodes	71
3) Résultats	73
3.1) Analyse physicochimique	73
3.2) Analyse structurale	75

3.3) Analyse bibliographique des autres facteurs d'immunogénicité	78
E. Troisième partie Rôle des complexes immuns dans l'immunisation contre un anticorps anti-TNF- α	82
1) Objectifs	83
2) Principaux résultats	85
F. Discussion	86
G. Conclusion et perspectives	95
H. Bibliographie	97
I. Annexes	116
Résumé	127
Résumé en anglais	127

Liste des tableaux

Tableau 1	27
Tableau 2	36
Tableau 3	37
Tableau 4	74
Tableau 5	77
Tableau 6	79

Liste des figures

Figure 1	15
Figure 2	15
Figure 3	17
Figure 4	18
Figure 5	19
Figure 6	20
Figure 7	32
Figure 8	34
Figure 9	41
Figure 10	43
Figure 11	50
Figure 12	51
Figure 13	52
Figure 14	59
Figure 15	81

Liste des annexes

Annexe 1: Eculizumab epitope on complement C5: Progress towards a better understanding of the mechanism of action	117
Annexe 2: Séquences d'anticorps thérapeutiques	118
Annexe 3: Résultats de chromatographie d'exclusion stérique	123
Annexe 4: Alignements de séquences protéiques	124
Annexe 5: Matrices d'analyse physicochimique.....	125
Annexe 6: <i>curriculum vitae</i>	126

Abréviations

A

ADA : anti-drug-antibody ; Ab : antibody ; ADC : antibody-drug-conjugate ; ADCC : antibody dependent cell cytotoxicity ; ADCP : antibody dependent cell phagocytosis ; AMM : autorisation de mise sur le marché ;

C

CDR : complementarity determining regions ; CDC : complement dependent cytotoxicity ; CDCC : complement dependent cell cytotoxicity ; CDCP : complement dependent cell phagocytosis ; CNV : copy number variation;

D

DAR : drug-to-antibody-ratio ;

E

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay ;

F

FcRn : neonatal IgG Fc receptor ; Fc γ R : Fc gamma receptor ;

H

HBSS : Hank's Balanced Salt Saline ; HIC : hydrophobic interaction chromatography ; HPLC : high performance liquid chromatography ;

I

IC : Immune complexe ; ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif ; ITIM : immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

M

MMR : macrophage mannose receptor

P

PBS : phosphate buffer saline ; PD : pharmacodynamics ; PK : pharmacokinetics ;

S

SEC : size exclusion chromatography ; SPR : surface plasmon resonance ;

T

TMDD : target-mediated drug disposition ;

V

VNTR : variable number tandem repeat

A.Introduction-contexte

1) Généralités sur les anticorps thérapeutiques

Les anticorps constituent une classe de protéines apparues tardivement dans l'évolution, avec les gnathostomes ou poissons à mâchoires (Klein and Nikolaidis, 2005). Il s'agit de glycoprotéines hétéromultimériques impliquées dans la réponse immunitaire. Chez l'Homme, la classe d'immunoglobulines la plus représentée est l'IgG, dont la structure de base comprend quatre chaînes, dont deux dites lourdes (environ 50kDa) et deux légères (25kDa), pour un total d'environ 150kDa (figure 1). Ces chaînes sont liées entre elles à la fois par des liaisons covalentes (des ponts disulfures), ainsi que des liaisons non covalentes (interfaces hydrophobes). Une chaîne légère est liée de façon covalente à une chaîne lourde, tandis que chaque chaîne lourde est liée à une chaîne légère et à l'autre chaîne lourde.

Chez l'Homme, les IgG sont synthétisées par des cellules lymphoïdes matures issues de la différenciation de lymphocytes B activés, les plasmocytes. Les IgG peuvent être de sous-classe IgG1, 2, 3 ou 4 (figure 2) même si certains ont breveté à tort et à travers des sous-classes d'IgG allant jusqu'à IgG17 (Pottier and Watier, 2014)!

En thérapeutique, seules les IgG sont employées à l'heure actuelle et nous ne parlerons plus que de cette classe d'immunoglobulines dans la suite de ce manuscrit, sauf mention contraire.

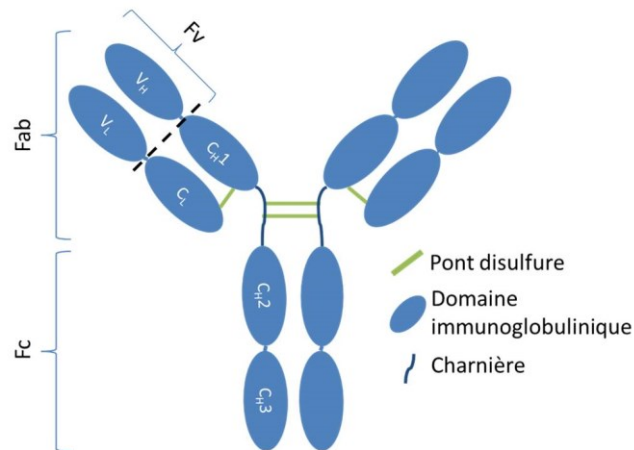


Figure 1

Schéma d'un anticorps de type IgG1. Il est composé de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères, assemblées entre elles par des ponts disulfures. La chaîne lourde se compose de quatre domaines immunoglobuliniques, V_H (variable heavy), C_{H1} (constant heavy 1), C_{H2} et C_{H3} . La chaîne légère est composée de deux domaines, V_L et C_L . Les domaines V_H et V_L forment le F_v , responsable de la liaison à l'antigène. Le F_v et les domaines C_L et C_{H1} forment le fragment Fab , qui peut être libéré sous l'action de la papaine tandis qu'un clivage par la pepsine libère les deux Fab liés par la charnière, soit un $F(ab')_2$. Les domaines C_{H2} et C_{H3} forment le fragment cristallisable ou Fc , séparé du Fab par la charnière.

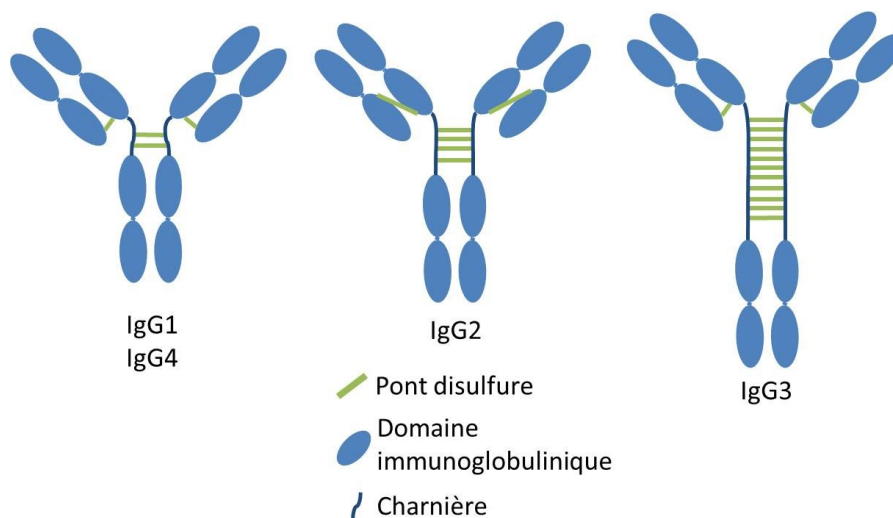


Figure 2

Structure schématisée des principales sous-classes d'IgG. Parmi elles, Les IgG1 sont les plus utilisées en thérapeutique. Ces sous-types se différencient par leur structure, notamment au niveau de leurs charnières, mais aussi en termes de propriétés biologiques.

2) Relation structure-fonction

Quelle que soit la classe d'immunoglobuline considérée, elle possède deux parties distinctes assurant des fonctions distinctes également. C'est le concept de dualité structure-fonction. Le Fab, composé des domaines V_L et C_L de la chaîne légère ainsi que des domaines V_H et C_{H1} de la chaîne lourde, assure la liaison de l'anticorps à son antigène par le biais des paratopes portés par les F_V (figure 1). Quant au F_c , composé des autres domaines de la chaîne lourde, il assure le recrutement d'une multitude de systèmes cellulaires et moléculaires dont la finalité peut être : la cytotoxicité cellulaire, la phagocytose d'une cellule exogène ou d'un antigène soluble, la transcytose voire la distribution ou le recyclage de l'anticorps concerné. Cette distinction historique entre le Fab et le F_c vient de la biochimie, qui avait permis une description structurale de ces fragments à la suite de clivages d'anticorps humains par la papaïne (Petermann, 1946). Le Fab libéré retenait la spécificité antigénique. Parallèlement, les différents récepteurs et ligands recrutables par le F_c permettent à l'anticorps de jouer un rôle d'adaptateur entre une cible et une fonction immunologique. La liaison entre le F_c et les Fab est assurée par une partie appelée « charnière », qui articule ces deux parties en laissant un degré de liberté entre ces deux portions de l'anticorps, variable en fonction des classes et sous-classes considérées. Cette charnière porte plusieurs ponts disulfures, au nombre de deux pour les IgG1 (figure 1, 2). Ces ponts constituent les seules liaisons covalentes entre les chaînes lourdes mais ne sont pas indispensables à l'intégrité de la structure quaternaire, ce qui leur vaut d'être utilisés comme support pour la bioconjugaison dans le cas des anticorps armés ou Antibody-Drug-Conjugates (ADC).

Les interactions entre le F_c et les effecteurs s'appuient sur la structure et la séquence du F_c . En effet, pour recruter les effecteurs, une IgG doit posséder la capacité de se lier à certains récepteurs, tels que la protéine C1q du complément (figure 3) ou les récepteurs aux chaînes lourdes de type gamma, ou Fc gamma récepteurs ($Fc\gamma Rs$, figures 4 et 5). Certains résidus d'acides aminés et zones d'interactions, doivent être conservés pour permettre la liaison à ces récepteurs, et sont donc d'une importance cruciale pour les fonctions effectrices qu'ils portent, comme la phagocytose ou la cytotoxicité cellulaire (Figure 4, 5).

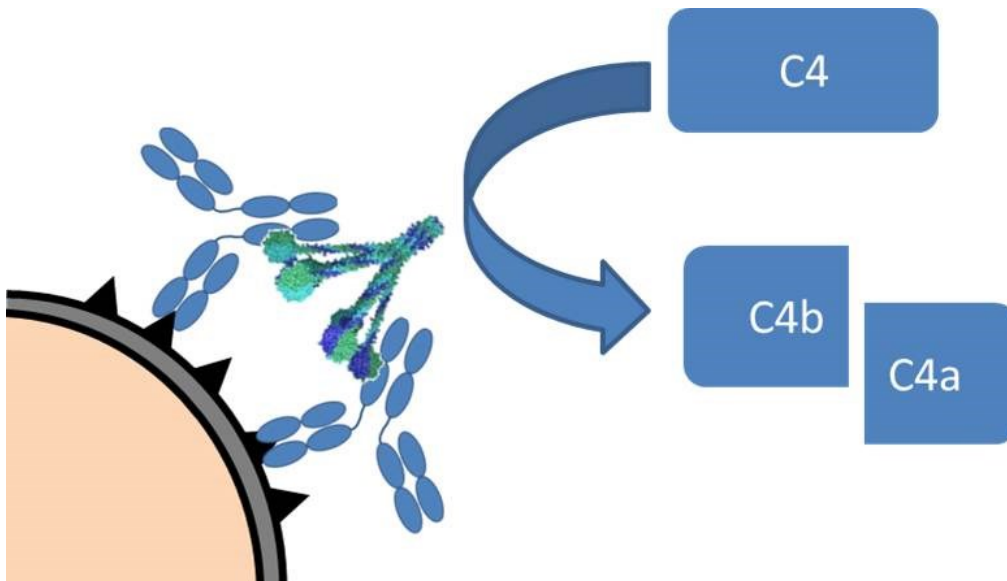


Figure 3

Cytotoxicité dépendante du complément. Lorsque les anticorps sont liés à leur antigène (triangles noirs) sur la cellule-cible, la protéine C1q s'associe aux domaines C_H2. Cette liaison induit une activation de la protéine C1q qui va ainsi pouvoir cliver C4 en C4a et C4b. C'est la première étape de la voie classique du complément.

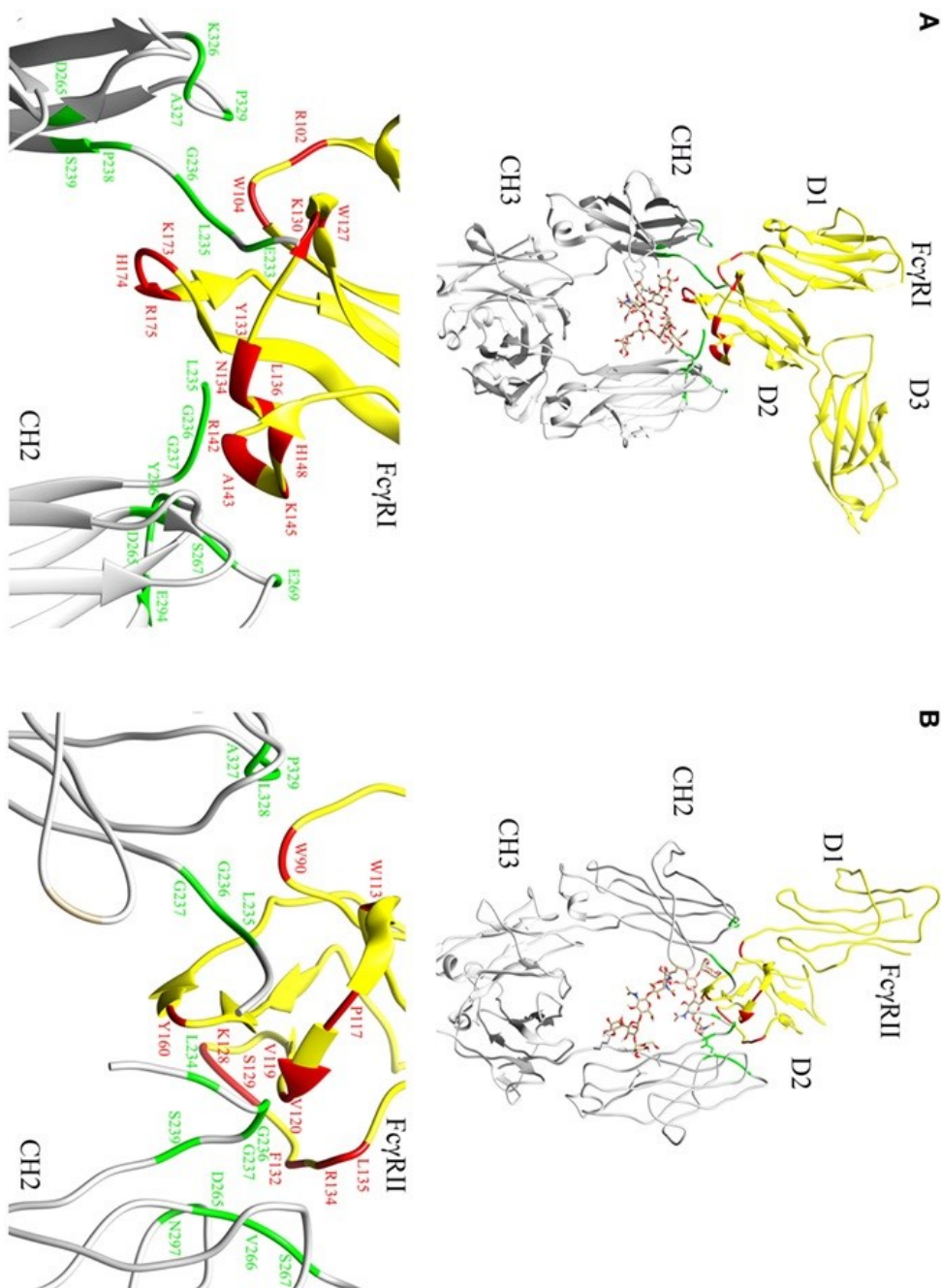


Figure 4

Schéma présentant les sites d'interaction entre les IgG et certains récepteurs au Fc gamma. Les FcγRI (A), et IIA (B) interagissent tous via leur domaine D2 au niveau du bas de la charnière et du domaine C_H2 des IgG. Les principaux résidus d'acides aminés participant aux sites de liaison sont présentés en rouge sur les récepteurs et en vert sur les anticorps. Le N-glycane se trouve au cœur de ce site d'interaction, illustrant son importance dans le recrutement de ces récepteurs. Issu de Saxena and Wu, 2016.

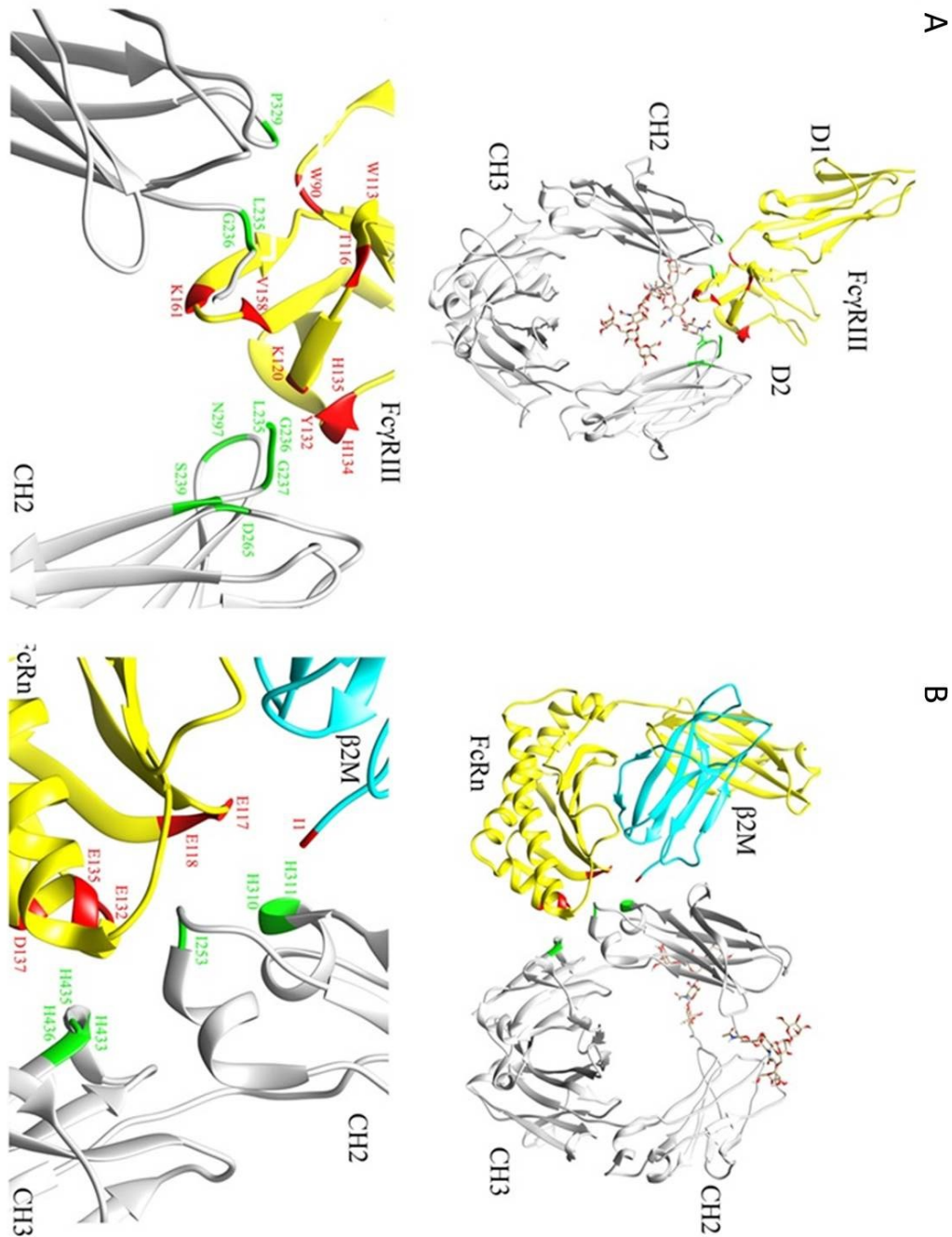


Figure 5

Schéma présentant les sites d'interaction entre les IgG et certains récepteurs au Fc gamma. Le FcγRIIIB (A) interagit via son domaine D2 au niveau du bas de la charnière et du domaine CH_2 des IgG. Le récepteur néonatal au Fc (B) possède un site distinct, à cheval entre les domaines CH_2 et CH_3 , et n'impliquant pas l'oligosaccharide porté par l'Asn297. Les principaux résidus d'acides aminés participant aux sites de liaison sont présentés en rouge sur les récepteurs et en vert sur les anticorps. Issu de (Saxena and Wu, 2016).

La partie basse de la charnière des IgG1 ainsi que le domaine C_H2 comportent plusieurs résidus d'acides aminés cruciaux pour la liaison à différents FcγRs, comme la Leu235 et la Pro329 qui sont des résidus impliqués à la fois dans la liaison à FcγRI, IIA, et IIIB (Kiyoshi et al., 2015; Radaev et al., 2001; Ramsland et al., 2011). La Pro329, est impliquée également dans le site de liaison au C1q (Idusogie et al., 2000; Saxena and Wu, 2016). Cette propriété a d'ailleurs été utilisée pour générer des formats d'anticorps incapables de recruter les effecteurs, tout en minimisant le nombre de mutations effectuées. En mutant les deux leucines terminales de la région charnière en alanines (L234A/L235A ou « LALA ») en plus d'une mutation P329G, Schlothauer *et al.* montrent qu'il est possible d'abolir à la fois la liaison au C1q ainsi qu'aux FcγRIA, IIA et IIIA (Schlothauer et al., 2016). En plus de ces résidus, l'interaction avec les effecteurs implique le sucre porté par l'Asn297 (figure 4, 5A et 6).

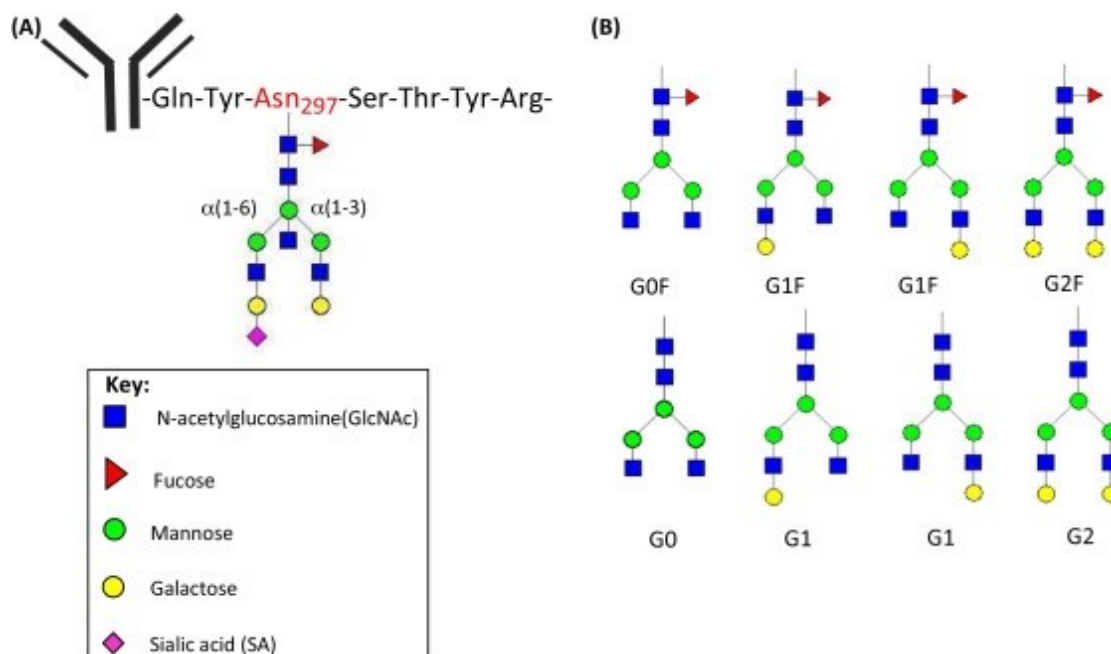


Figure 6

Schéma représentant le motif N-glycanne porté sur l'asparagine 297 de la chaîne lourde des IgG1. A. La séquence Asn-X-Ser/Thr (avec X tout résidu sauf une proline) située dans le C_H2 de l'IgG est le substrat d'une glycosyl transférase qui vient greffer un des résidus majoritaires présentés en (B). B. Glycoformes fréquemment retrouvés sur l'asparagine 297. Ils peuvent être fucosylés (haut) ou non (bas) et présenter de 0 à 2 résidus galactose terminaux. D'autres glycoformes comme les formes high-mannose, complexes ou hybrides se retrouvent parfois de façon minoritaire.

Il a été décrit que la présence de ce glycanne conditionnait le recrutement des FcγRs ainsi que du C1q (Mimura et al., 2000). Ainsi, la composition du glycanne porté par cette asparagine varie (figure 6) et a une influence sur la nature et le degré de recrutement des fonctions effectrices (Jefferis and Lund, 2002). Les voies de biosynthèse des N-glycannes par des cellules mammifères sont complexes, et aboutissent à des mélanges d'anticorps présentant différentes glycoformes, certaines étant majoritaires par rapport aux autres. Dans un effort de compréhension de l'influence de ces différentes glycoformes sur l'efficacité thérapeutique, il a été identifié que certaines augmentaient le recrutement de certaines fonctions effectrices, et qu'en modifiant les conditions de culture cellulaire, il était possible d'améliorer l'efficacité d'un anticorps thérapeutique (Hamilton et al., 2003; Umaña et al., 1999). C'est le cas de la déplétion en fucose au sein du « core » de l'oligosaccharide, qui augmente la liaison au FcγRIIIA (Okazaki et al., 2004), augmentant ainsi l'ADCC, dont il a été montré qu'elle était souhaitable dans le cas d'anticorps anticancéreux (Hodoniczky et al., 2005). Cette découverte a été appliquée en clinique, sur l'obinutuzumab (un anti-CD20 indiqué dans la leucémie lymphoïde chronique et le lymphome folliculaire), revendiquant une meilleure ADCC sur les cellules CD20+ (Gagez and Cartron, 2014). La présence de N-acétylGlucosamine dans le core de l'oligosaccharide permet également une augmentation de l'ADCC (Umaña et al., 1999). Cette modification aurait toutefois un effet moindre que l'afucosylation sur l'ADCC (Shinkawa et al., 2003). Plus récemment, une équipe a généré vingt glycoformes différentes de deux anticorps monoclonaux afin d'étudier l'effet sur le recrutement des effecteurs liés au Fc et des fonctions effectrices. Parmi les résultats marquants, les auteurs mettent en évidence une absence d'effet de la présence d'un sucre bissecteur dans le core du glycanne sur le recrutement des FcγR et de C1q. Ils notent également que dans leur modèle, la sialylation n'a pas d'effet sur le recrutement des FcγR. Ils montrent une multiplication par 17 du recrutement de FcγRIIA et B lorsque le glycanne est hypofucosylé, ce chiffre passant à 40 lorsqu'une hypergalactosylation est surajoutée, ce qui s'accompagne d'une augmentation de l'ADCC NK *in vitro*. Enfin, ils mettent en évidence une augmentation du recrutement de C1q accompagnée d'une augmentation de la CDC *in vitro* pour les glycoformes simultanément hypergalactosylées et hypersialylées (Dekkers et al., 2017).

En raison de la complexité des systèmes de glycosylation, certains auteurs se tournent vers l'ingénierie moléculaire afin de produire des anticorps aglycosylés en cellules procaryotes, mais capables de recruter des fonctions effectrices (Jung et al., 2010; Sazinsky et al., 2008). Par exemple, le couple de mutation S298G/T299A permet de recruter FcγRIIA *in vitro* et *in*

vivo (Sazinsky et al., 2008). Les mutations E382V et E382V/M428I permettant quant à elles de restaurer l'affinité pour le FcγRI, sont situées dans le C_H3 et agissent en stabilisant la conformation du haut du domaine C_H2, crucial pour l'interaction avec FcγRI (Ju et al., 2015).

L'absence de glycosylation modifie certes la capacité à recruter les FcγRs et le C1q, mais n'empêche pas l'anticorps de se lier au récepteur néonatal au Fc des IgG ou FcRn (Saxena and Wu, 2016). Ce récepteur est responsable de la longue demi-vie des anticorps endogènes et des anticorps thérapeutiques et joue un rôle dans la présentation d'antigène et l'élimination des complexes immuns (Baker et al., 2014; Roopenian and Akilesh, 2007). La liaison entre l'anticorps et le FcRn est pH-dépendante, et portée par des résidus à cheval entre le C_H2 et le C_H3, notamment les histidines 310 et 435, ainsi que l'isoleucine 253 (figure 5B et Shields et al., 2001). Le développement d'un anticorps thérapeutique comprend notamment des étapes obligatoires de caractérisation de la liaison au FcRn, ce qui va conférer au médicament des caractéristiques pharmacologiques précieuses.

3) Pharmacologie des anticorps thérapeutiques

3.1) Notions de pharmacologie

La pharmacologie est étymologiquement « l'étude des poisons » (φάρμακον : le poison). Plus spécifiquement, la pharmacologie s'intéresse à l'action de poisons sur des organismes vivants. L'utilisation de la racine du mot « poison », intègre la notion que tout médicament (à part l'homéopathie et les placebos qui ne possèdent pas de principe actif), possède un pouvoir intrinsèque nocif, et que la limite entre soin et nocivité est une question de dose. La dose n'est pas universelle, et s'adapte en fonction de multiples paramètres liés à la pathologie et au patient. Une dose trop faible ne sera pas ou insuffisamment active, et un surdosage provoquera des effets indésirables. Entre la plus petite dose efficace et la plus grande dose tolérée se trouve la marge thérapeutique. Cette gamme de doses, présentant un bon rapport efficacité-tolérance est à cibler pour obtenir le meilleur bénéfice, au moindre risque pour le patient. Si une marge thérapeutique est déterminée lors des essais cliniques pour une population, elle n'a qu'une pertinence relative à l'échelle individuelle. En effet, un individu donné présentera une meilleure ou une moins bonne tolérance qu'un autre, à des concentrations comprises dans cet intervalle thérapeutique. Le même individu, en fonction de son état physiopathologique, pourra même répondre différemment à une même dose administrée à deux moments distincts. Ces notions de variabilité sont importantes, car elles posent les bases de l'intérêt du suivi thérapeutique, action qui consiste à doser le médicament dans le sang du patient pour moduler les doses administrées. La pharmacologie se décompose en pharmacodynamie et pharmacocinétique.

La première est l'étude de « ce que le médicament fait au corps », autrement dit son mécanisme d'action. Les mécanismes liés aux effets indésirables, telles que les toxicités « off-target » peuvent être comptés dans cette catégorie. La pharmacodynamie des anticorps est le résultat conjoint de la spécificité antigénique, de la capacité du Fc à recruter des effecteurs ou non, ainsi que de la présence éventuelle d'adduits possédant un effet thérapeutique comme c'est le cas pour les anticorps armés.

La seconde est souvent décrite comme « ce que le corps fait au médicament », soit le devenir de ce dernier une fois qu'il a été administré : sa distribution, les transformations éventuelles qu'il peut subir et enfin ses modes d'élimination.

3.2) Pharmacodynamie : comment agit un anticorps ?

3.2.1) Mécanismes d'action des anticorps

La pharmacodynamie des anticorps est conditionnée par divers facteurs, parmi lesquels certains sont liés à la nature de l'antigène ciblé, ainsi qu'au recrutement de divers effecteurs. Wang *et al.* décrivent quatre types d'effets pharmacodynamiques des anticorps (tableau 2).

L'effet appelé « immunotoxicothérapie » se rapporte aux anticorps à but purement neutralisant à l'encontre d'un antigène soluble. Les exemples cités sont ceux du bévacizumab, du ranibizumab (tous deux anti-VEGF indiqués notamment dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge), de l'omalizumab (anti-IgE indiqué dans l'asthme à IgE), de l'adalimumab et de l'infliximab (tous deux anti-TNF- α indiqués dans certaines pathologies inflammatoires chroniques).

Le second effet possible, intitulé cytotoxicité, est médié par la portion Fc de l'anticorps, dont sont dépourvus les Fab thérapeutiques comme le ranibizumab susnommé. Dans cette catégorie, les anticorps tels que le rituximab (anti-CD20 indiqué initialement dans les lymphomes non-hodgkiniens CD20+), le cétuximab (anti-EGFR indiqué dans le cancer colorectal et certaines tumeurs de la tête et du cou) ou le trastuzumab (anti-HER2 indiqué dans les cancers du sein et certains cancers gastriques métastatiques) reconnaissent un antigène surexprimé à la membrane des cellules ciblées. La fixation de l'anticorps à sa cible se solde par le recrutement d'effecteurs cellulaires, tels que les macrophages, les lymphocytes T et les cellules NK, ainsi que moléculaires, tels que le C1q, ce qui concourt à la lyse ou à la phagocytose de la cellule ciblée.

L'altération des fonctions cellulaires est un mécanisme utilisant la neutralisation ou la modulation d'une voie de signalisation. L'anticorps, en se liant à un antigène impliqué dans une voie de signalisation, va provoquer une modulation du signal et aboutir à des effets à distance de la cible. C'est le cas, notamment de l'abciximab (Fab anti-GPIIb/IIIa indiqué dans la prévention des complications ischémiques lors des interventions sur les artères coronariennes), qui prévient l'agrégation plaquettaire en se liant à des protéines d'adhésion à la surface des plaquettes activées, du basiliximab et du daclizumab (tous deux anti-CD25, le premier indiqué dans la prévention du rejet aigu au cours de l'allogreffe rénale, le second dans certaines formes de sclérose en plaques), qui inhibent la fixation de cytokines à la surface des

récepteurs utilisant la chaîne CD25, et de l'éfalizumab (anti-LFA-1 ayant perdu son indication dans le psoriasis sévère), qui empêche la liaison entre LFA-1 et ICAM-1, couple moléculaire important dans les interactions entre lymphocytes T et autres leucocytes.

Enfin, le ciblage de drogue est le concept de base du développement des anticorps armés. Il s'appuie sur la spécificité du Fab pour transporter une molécule cytotoxique jusqu'à une cellule présentant un antigène de surface donné. C'est le cas du brentuximab-vedotin (anti-CD30 indiqué dans certains lymphomes), de l'ado-trastuzumab emtansine (anti-HER2 couplé à la maytansine et indiqué dans certains cancers du sein métastatiques), ou de l'inotuzumab ozogamicine (anti-CD22 indiqué dans les leucémies aiguës lymphoblastiques B réfractaires ou récidivantes CD22-positives).

Ces différents types d'effets ne sont pas mutuellement exclusifs et il en faut souvent plusieurs pour expliquer le mécanisme d'action et/ou les effets indésirables d'un anticorps thérapeutique. Par exemple, le rituximab présente majoritairement un effet de type cytotoxique, mais il a été décrit que sa liaison au CD20 modifiait des voies de signalisation intracellulaires, notamment la voie Fas liée à l'apoptose, cet effet permettant notamment de restaurer la sensibilité de certains lymphomes B à la chimiothérapie (Vega et al., 2009). Les effets cytotoxiques peuvent également différer, même pour des anticorps ciblant le même antigène. Pour reprendre le cas du rituximab, il s'agit d'un anti-CD20 dit de « type I », c'est-à-dire qu'il recrute efficacement le complément en faisant transloquer le complexe antigène-anticorps vers les radeaux lipidiques, ce que ne fait pas l'obinutuzumab, dont le Fc muté était censé améliorer ses fonctions effectrices en augmentant l'affinité au FcγRIIIA^{158F} (Cragg and Glennie, 2004; Gagez and Cartron, 2014). La différence d'épitope couplée à la modification du Fc aboutit à des mécanismes d'action totalement différents, ce qui rend impossible la prévision des effets cliniques de l'obinutuzumab par rapport au rituximab (Cartron and Watier, 2017).

De même, les anti-TNF- α peuvent utiliser trois mécanismes différents. La fixation de l'infliximab ou de l'adalimumab sur le TNF- α trimérique soluble empêche sa fixation sur ses récepteurs, et neutralise la cytokine. De plus, cette cytokine est pro-inflammatoire, et sa neutralisation va altérer le signal et l'environnement cytokinique au voisinage, en réduisant l'inflammation. Dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, il a également été décrit une diminution de l'inflammation par cytotoxicité des anticorps sur le TNF- α membranaire des cellules notamment mononuclées infiltrant la *lamina propria* (Baert et al.,

1999; Geboes et al., 2001), ce qui constitue le troisième élément de pharmacodynamie de ces anticorps. Pour certains anticorps inhibiteurs des checkpoint immunologiques, dont le mécanisme d'action présumé était d'empêcher l'interaction entre deux partenaires moléculaires, il a été montré que le recrutement de fonctions effectrices était indispensable pour l'activité (Bruhns and Teillaud, 2016). Cette classe d'anticorps, en plein essor actuellement (Storz, 2016), est basée sur l'inhibition d'interactions entre des récepteurs inhibiteurs de cellules effectrices du système adaptatif et leurs ligands, comme les couples CD80-CTLA4 ou PD1-PDL1. Le mécanisme d'action présumé implique donc en théorie l'encombrement stérique du site d'interaction entre le récepteur et son ligand donc une altération des fonctions cellulaires. Or, dans le cas d'anti-CTLA-4 comme l'ipilimumab (indiqué dans certains carcinomes métastatiques), le F(ab')₂ seul perd son activité, ce qui rend son efficacité paradoxalement dépendante de fonctions effectrices portées par son Fc (ici en particulier du FcγRIIB), tout du moins dans un modèle murin (White et al., 2014b).

Cette cumulation d'effets se retrouve aussi pour les anticorps armés. S'ils utilisent le ciblage de drogue comme principal mécanisme d'action, il a également été décrit que le recrutement d'effecteurs par le Fc gamma participait également à l'activité, notamment dans le cas de tumeurs exprimant l'antigène ciblé de façon hétérogène. Dans un modèle murin de lymphome de Hodgkin CD30+, il a été montré qu'un anticorps non spécifique de CD30 se montrait aussi efficace que le brentuximab védotine. Cette efficacité dépendait de la liaison aux FcγR et était médiée par les macrophages associés à la tumeur (Li et al., 2017).

Tableau 1

	Effet pharmacodynamique	Rôle de l'anticorps	Antigène ciblé	Finalité
1	Immuno-toxicothérapie	Inhibiteur compétitif	ligand soluble	neutralisation
2	Cytotoxicité	Recrutement d'effecteurs	antigène de surface	toxicité
3	Altération des fonctions cellulaires	Inhibiteur compétitif/agoniste /antagoniste	antigène de surface/ ligand soluble	Modulation de signal
4	Ciblage de drogue	vecteur de petites molécules	antigène de surface	toxicité

Effets pharmacodynamiques des anticorps thérapeutiques (selon Wang et al., 2008).

Importance de l'épitope ciblé

Le Fab est le support de la spécificité antigénique (figure 1). Au sein du Fab, seuls les domaines variables (V_L et C_L) participent à la reconnaissance antigénique. Ils sont eux-mêmes constitués de régions charpentes, au rôle structurant comme leur nom l'indique, et des régions déterminant la complémentarité (complementarity determining regions ou CDR). Au sein de ces régions, tous les résidus d'acides aminés ne participent pas directement au paratope. Certains résidus, dits de la « seconde sphère », sont importants pour la conformation du paratope, mais n'engagent pas de liaisons avec l'épitope. Une protéine cible peut présenter une multitude d'épitopes. Par exemple, le TNF- α trimérique soluble peut être reconnu par plusieurs anticorps thérapeutiques, chacun spécifique d'un épitope différent (Hu et al., 2013). La liaison à un même antigène mais au niveau d'épitopes différents peut complètement transformer la réaction engendrée par la fixation de l'anticorps. Dans le cas des anti-TNF- α , l'infliximab, l'adalimumab et l'éta nercept sont capables d'inhiber l'échange spontané de monomères de TNF- α au sein du TNF- α trimérique soluble, contrairement au golimumab et au certolizumab-pégol (van Schie et al., 2016), ce qui selon les auteurs pourrait expliquer notamment l'activité résiduelle du TNF- α lors d'un traitement par adalimumab. Pour les anti-HER2, le mécanisme d'action du trastuzumab est d'empêcher l'hétérodimérisation des récepteurs HER2/HER3 ligand-indépendante, cette dernière menant à une transduction de signal prolifératif impliqué dans le développement de tumeurs mammaires entre autres (Junttila et al., 2009). A l'inverse, les anti-HER2 n'entravant pas cette liaison peuvent permettre l'internalisation de l'anticorps, ce qui est souhaitable par exemple dans le cas des anticorps armés ou ADCs (de Goeij et al., 2014). En effet, pour cette classe particulière de médicaments, un relargage spécifique d'une molécule cytotoxique puissante peut être obtenu par clivage lysosomal d'un linker substrat d'enzymes comme certaines cathepsines. Un anticorps ciblant un antigène lui conférant une internalisation spécifique et rapide rend alors le relargage de la molécule cytotoxique plus efficace, augmentant la toxicité de l'ADC sur les lignées HER-2 positives (de Goeij et al., 2014).

Dans le cas d'un anticorps à but neutralisant, la seule action de liaison du Fab à l'antigène suffit à l'efficacité du médicament, et par mesure de précaution, certaines sous-classes ou Fc modifiés sont utilisés préférentiellement pour limiter le risque d'effets indésirables liés au recrutement d'effecteurs. Dans l'optique d'une élimination de cellule porteuse d'antigène, quelle que soit la nature de celle-ci, la liaison à l'antigène seule est insuffisante pour obtenir

l'action thérapeutique. Il est cependant décrit dans certains cas que la liaison à certains récepteurs peut induire de la transduction de signal menant la cellule-cible à l'apoptose. C'est le cas notamment du rituximab (Vega et al., 2009). Mais même dans ce cas, la liaison à l'antigène n'est pas suffisante pour obtenir une activité significative, et les fonctions portées par le Fc sont donc primordiales pour expliquer l'efficacité. L'impact du polymorphisme de certains récepteurs du Fc sur la survie de patients atteints de lymphomes malins non-Hodgkiniens traités par rituximab en est la preuve (Dall'Ozzo et al., 2004).

Dans d'autres cas, ce n'est pas directement la liaison à l'antigène qui va provoquer un effet pharmacologique, mais le rapprochement de ces antigènes. Dans le cas de récepteurs membranaires présentant des fonctions de transduction de signal, le rapprochement physique de deux antigènes pontés par le même anticorps peut provoquer l'activation des récepteurs (Wang et al., 2009). Cet effet peut participer au mécanisme d'action de l'anticorps, mais il pourrait tout aussi bien constituer une source d'effet indésirable. OX-40L est une molécule de costimulation exprimée par les lymphocytes T. L'interaction entre OX-40 et OX-40L est nécessaire pour obtenir une réponse humorale vis-à-vis d'un antigène T-dépendant (Stüber and Strober, 1996). Un anticorps dirigé contre OX-40L peut donc potentiellement inhiber l'interaction avec son récepteur, OX-40, lui conférant des propriétés immunomodulatrices. Or, en ciblant un épitope permettant un cross-linking artificiel d'OX-40L, phénomène survenant physiologiquement lors de l'interaction OX-40/OX-40L Wang *et al.* montrent un potentiel immunostimulateur, prouvant que des anticorps dirigés contre une même molécule peuvent avoir des effets totalement opposés en fonction de l'épitope reconnu, et donc uniquement en fonction de la spécificité du Fab.

L'épitope ciblé par un anticorps à la surface de l'antigène peut donc avoir un impact important sur la pharmacodynamie de l'anticorps. Les essais de phase préclinique comportent une caractérisation des effets pharmacodynamiques du candidat-médicament chez l'animal, qui peut s'avérer complexe en termes d'interprétation. En effet, il faut s'assurer que l'antigène ciblé est bien présent, qu'il possède une séquence, une structure et une distribution tissulaire suffisamment proches de celles de son orthologue humain, et que l'interprétation de ces résultats n'est pas biaisée par une immunisation de l'animal à l'encontre du médicament, des différences de biodistribution importantes ou une interférence de l'anticorps avec les fonctions immunitaires de l'animal (Loisel et al., 2007). La cross-réactivité, ou capacité de l'anticorps dirigé contre la cible humaine à reconnaître l'orthologue animal, est souvent un

frein important. La cross-réactivité diminue avec la distance phylogénique, et une différence d'un seul acide aminé peut abolir la capacité de l'anticorps à exercer son activité. C'est le cas pour l'éculizumab (anti-protéine C5 du complément indiqué dans l'hémoglobinurie paroxystique nocturne et les syndromes hémolytiques et urémiques atypiques), qui n'inhibe pas l'activité du complément du chimpanzé malgré une différence d'un seul acide aminé dans l'épitope ciblé (Brachet et al., 2016 et annexe 1). Ces différences d'épitope et de distribution entraînent potentiellement à la fois des erreurs dans l'étude de la pharmacodynamie, mais aussi dans l'évaluation du risque de toxicité. Des études de toxicité chez le cynomolgus n'avaient par exemple pas prédit les risques d'hypertension ou de saignement observés chez l'Homme avec le bévacizumab (Giantonio et al., 2007; Ryan et al., 1999). L'exemple du TGN1412 est le plus flagrant exemple de la faible transposabilité des résultats de préclinique, y compris du primate non humain, en clinique. Ce superagoniste anti-CD28 dont les études chez le macaque laissaient craindre une efficacité médiocre a en effet causé de violents orages cytokiniques chez les volontaires de la phase I, faisant du même coup avorter le développement du candidat-médicament et revoir les protocoles de première administration d'un médicament en phase clinique précoce (Suntharalingam et al., 2006).

3.2.2) Fonctions effectrices portées par le Fc

Les anticorps servent d'adaptateurs entre une cible spécifique et des cellules effectrices, par le biais de récepteurs du Fc. La présence de ces derniers sur les diverses cellules effectrices provoque, notamment en fonction du type de récepteur engagé, des réponses cellulaires différentes. Les fonctions portées par le Fc de l'anticorps sont multiples. Cette portion, constituée pour les IgG par les domaines CH₂ et CH₃, en deçà de la région charnière, porte également le site de glycosylation commun aux IgG, sur un résidu asparagine. Ce site participe également aux fonctions effectrices de la portion Fc. Ces fonctions comprennent la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (antibody-dependent cell phagocytosis ou ADCP) ; la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (antibody dependent cell cytotoxicity ou ADCC) ; la cytotoxicité dépendante du complément (complement dependent cytotoxicity ou CDC), à laquelle viennent s'ajouter deux fonctions dérivées décrites plus récemment : la cytotoxicité cellulaire dépendante du complément (complement dependent cell cytotoxicity ou CDCC) et la phagocytose cellulaire dépendante du complément (complement dependent cell phagocytosis ou CDCP)(Lee et al., 2017).

Sauf dans le cas des anticorps thérapeutiques purement neutralisants, la liaison aux récepteurs de la portion Fc est souhaitable et participe au mécanisme d'action. L'administration d'anticorps thérapeutiques est un moyen de rediriger la réponse immunitaire en activant ces récepteurs contre une cible impliquée dans la physiopathologie d'une maladie donnée. Ces fonctions sont portées par des effecteurs, dont les récepteurs à la portion Fc de type γ ou Fc γ Rs, et la protéine C1q du complément.

Les effecteurs moléculaires

Ces récepteurs sont exprimés sur les leucocytes et les plaquettes. Ils sont chargés d'assurer l'interface entre la cellule et l'anticorps, qu'il soit libre ou lié à un antigène. Il existe trois classes de Fc γ Rs, que sont Fc γ RI, Fc γ RII et Fc γ RIII (figure 7). Ces récepteurs sont similaires par leur structure faite de domaines immunoglobuliniques, mais singuliers par leur profil d'expression cellulaire, leur affinité pour les différentes sous-classes d'IgG, ainsi qu'en termes de fonctionnalité et de structure fine.

Chez l'homme, il existe des Fc γ R activateurs et inhibiteurs. Parmi les Fc γ R activateurs, se trouve le Fc γ RI, ou récepteur de haute affinité, ainsi que des récepteurs de plus faible affinité que sont le Fc γ RIIA, le Fc γ RIIIA et le Fc γ RIIIB. L'unique Fc γ R inhibiteur est le Fc γ RIIB. Ces récepteurs sont la base de la transduction de signal qui s'opère lorsqu'un anticorps, ayant lié une ou plusieurs cibles, est capturé. Dans le cas du récepteur de haute affinité, même l'anticorps monomérique n'ayant pas rencontré son antigène peut se fixer, « armant » ainsi la cellule portant le récepteur. La liaison à l'antigène déclenche alors un pontage entre plusieurs récepteurs de haute affinité, ce qui provoque la transduction du signal activateur et donc une cascade de kinases et *in fine* une activation de la cellule concernée. Dans le cas des récepteurs de faible affinité, seuls des complexes immuns préformés peuvent se lier et provoquer l'activation de kinases (dans le cas des motifs activateurs) ou de phosphatases (récepteurs inhibiteurs), qui sont les intermédiaires de cette cascade. Ces récepteurs ont chacun une chaîne alpha distincte, et se différencient également par la présence ou l'absence de chaînes accessoires. Si les récepteurs activateurs présentent tous un ITAM et favorisent tous une cascade de phosphorylations ayant pour but l'activation cellulaire, leur engagement aboutit néanmoins à des fonctions différentes (Van den Herik-Oudijk et al., 1995).

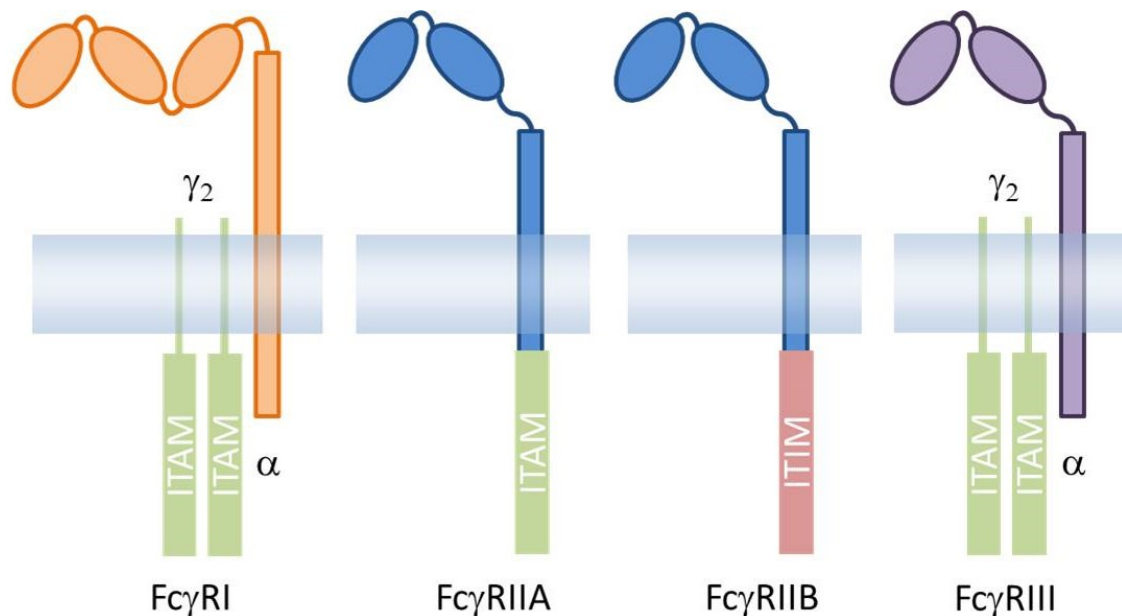


Figure 7

Représentation schématique des principaux FcγR. Tous ces récepteurs lient les IgG à cheval entre la partie basse de la charnière et le domaine C_H2. Le domaine supplémentaire que contient FcγRI pourrait être à l'origine de sa haute affinité pour les IgG monomériques, en stabilisant l'interaction avec le Fc. Même si deux isoformes de CD16 existent, seul FcγRIIA est représenté, FcγRIIB ne dispose ni de chaînes accessoires « γ », ni d'un domaine transmembranaire, et s'ancre à la membrane par liaison covalente à un glycosylphosphatidylinositol. FcγRIIC n'est pas représenté non plus, les fonctions de ce récepteur étant méconnues à ce jour.

Le FcγRI est exprimé sur les cellules de la lignée monocyttaire, les cellules dendritiques et les polynucléaires neutrophiles activés (tableau 2 et Ghirlando et al., 1995; Jefferis et al., 1998; Ravetch and Bolland, 2001). Il possède une chaîne alpha, qui est transmembranaire et composée de trois domaines immunoglobulines, tandis que les deux chaînes accessoires γ contiennent chacune un motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Il se lie au Fc des IgG avec une affinité importante, avec une préférence pour les IgG1 et les IgG3 (tableau 3). Il est impliqué dans l'ADCC et nécessite pour être recruté la présence du N-glycane sur le C_H2 de l'immunoglobuline (Lu et al., 2015). Ce récepteur est fortement impliqué dans l'induction de l'immunité contre l'antigène, en facilitant sa présentation *via* le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II (van der Pol and van de Winkel, 1998).

Le FcγRII est un récepteur de moyenne affinité et possède deux principales isoformes, que sont FcγRIIA et FcγRIIB. Ces isoformes se distinguent par la nature du motif intracytoplasmique de leur chaîne alpha. FcγRIIA possède en effet une chaîne intracytoplasmique de type activatrice (immunoreceptor tyrosine activation motive ou ITAM) tandis que FcγRIIB possède un motif ITIM inhibiteur. Dans le cas où l'activation de FcγRIIA est très faible, il a été décrit que l'hypophosphorylation rendrait ce récepteur inhibiteur, conférant à son motif intracytoplasmique le rôle d' « ITAMi » pour ITAM inhibiteur (Ben Mkaddem et al., 2014). Ce récepteur est exprimé sur toutes les cellules myéloïdes, y compris les plaquettes (tableau 2). FcγRIIA est impliqué dans les fonctions de dégranulation (notamment plaquettaire) et de phagocytose. Il existe un polymorphisme de ce récepteur au niveau de la position 131, sur laquelle peut se localiser un résidu soit histidine (H131) soit arginine (R131) (Warmerdam et al., 1990), l'isoforme contenant une arginine ayant une affinité plus faible, notamment pour les IgG1 et les IgG2 (tableau 3) (Bruhns et al., 2009; Reilly et al., 1994). Ce polymorphisme a un impact en clinique, l'isoforme R131 étant associée à un pronostic moins favorable au décours du traitement par cétuximab (Bibeau et al., 2009; Zhang et al., 2007), par trastuzumab (Tamura et al., 2011), et dans le traitement du lymphome B diffus par rituximab (Ziakas et al., 2016). Curieusement, dans d'autres utilisations du rituximab, cet effet du polymorphisme n'est pas retrouvé (Ghesquières et al., 2012; Kenkre et al., 2016), ni au décours du traitement de la leucémie lymphoïde chronique par alemtzumab (anti-CD52) (Lin et al., 2005).

FcγRIIB est un récepteur inhibiteur, possédant directement dans sa queue intracytoplasmique un motif ITIM. Il ne possède pas de chaîne accessoire. Il agit en inhibant l'activation induite par les motifs ITAM portés par les autres récepteurs (figure 8). Il est exprimé sur les polynucléaires éosinophiles, neutrophiles et basophiles, sur les cellules dendritiques et les lymphocytes B, les monocytes et les macrophages (tableau 2). Sur les lymphocytes B, il est capable d'inhiber la signalisation induite par le récepteur au complément (Karsten et al., 2012). Possédant des capacités inhibitrices, il est décrit dans plusieurs situations comme un frein à l'efficacité des anticorps thérapeutiques, ce qui a mené certaines équipes à imaginer des anticorps anti- FcγRIIB pour restaurer l'efficacité d'anticorps anticancéreux (Roghianian et al., 2015). Il est également décrit des situations où la présence et l'activation de ce récepteur participent ou sont nécessaires à l'efficacité du traitement par anticorps, et plusieurs auteurs s'accordent sur la nécessité d'étudier au cas par cas l'intérêt du maintien de cette fonction effectrice (Stopforth et al., 2016; White et al., 2014a).

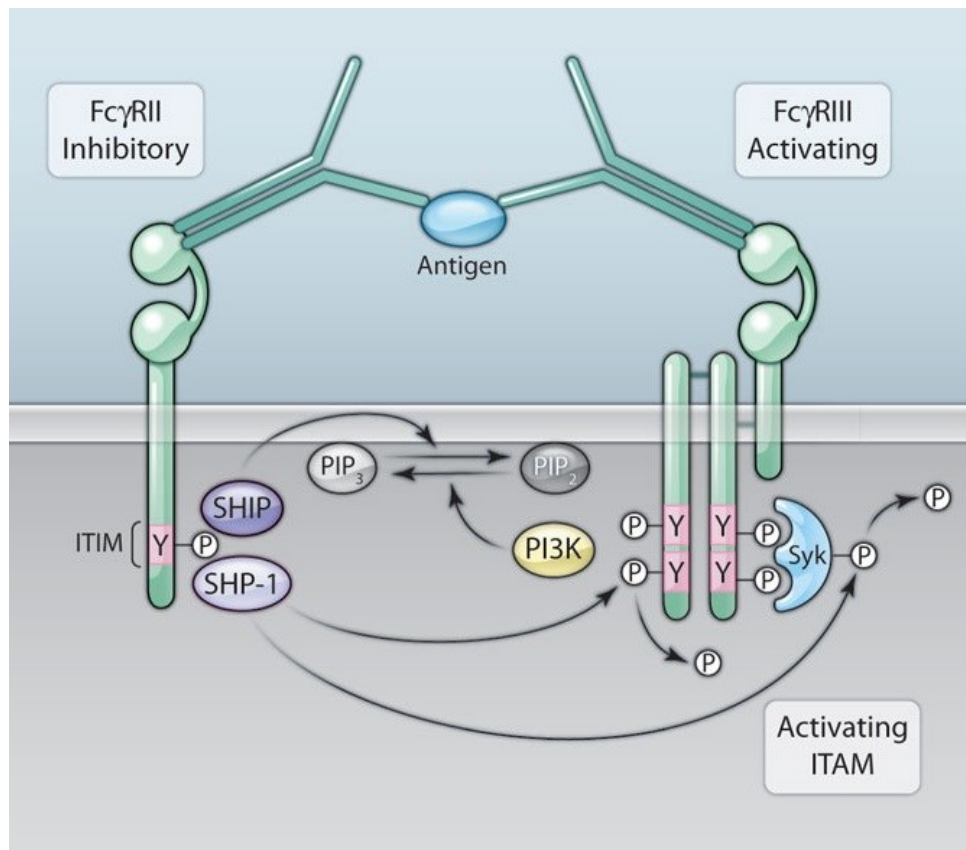


Figure 8

Mécanismes de signalisation par des motifs ITAM et ITIM. Légende : PIP₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; P, phosphate; Y, tyrosine. (A) Modèle d'inhibition ITIM-dépendant. Le récepteur FcγRIIb contenant un motif ITIM, et le récepteur FcγRIIIb contenant un ITAM se trouvent pontés par la liaison d'un complexe immun. L'ITIM phosphorylé suite à cette liaison recrute SHIP et des récepteurs contenant également des ITIM, SHP-1 et SHP-2. Ces cofacteurs inhibent le signal en déphosphorylant les récepteurs activateurs et les partenaires moléculaires en aval de la cascade. D'après Ivashkiv et al.

Il existe également un FcγRIIC chez l'homme, exprimé chez certains sujets, et dont le rôle est méconnu, notamment par absence de modèle murin transfecté (Bruhns and Jönsson, 2015).

Le récepteur FcγRIII, dit de faible affinité, possède également deux isoformes, FcγRIIIA et FcγRIIIB. FcγRIIIB est ancré à la membrane par une ancre glycosylphosphatidylinositol et n'est exprimé que sur les polynucléaires neutrophiles et basophiles (tableau 2 et Ghirlando et al., 1995; Jefferis et al., 1998). Il permettrait d'augmenter le recrutement des autres FcγR en

se comportant comme un point d'ancrage supplémentaire des immuns complexes sur la membrane (Unkeless et al., 1995), et jouerait un rôle dans la phagocytose dépendante des anticorps (Niwa and Satoh, 2015). Seul FcγRIIIA est transmembranaire et possède intrinsèquement la capacité de transduction de signal, grâce à ses chaînes accessoires gamma. Ce récepteur est exprimé sur les macrophages, cellules NK, certains sous-types lymphocytaires et est impliqué dans l'ADCC et l'activation des cellules NK (Ghirlando et al., 1995; Jefferis et al., 1998; Lazar et al., 2006). Exprimé à la surface des macrophages, il y joue un rôle dans l'élimination des complexes immuns circulants (Clarkson et al., 1986). Il est le principal FcγR dans l'ADCC, même si la participation de FcγRI et II à cette fonction a été également décrite (Clynes et al., 2000; Minard-Colin et al., 2008; Tudor and Bomsel, 2011). L'ectodomaine de FcγRIIIA peut être clivé par des métalloprotéases telles qu'ADAM17 après activation des cellules NK qui l'expriment (Lajoie et al., 2014). Ce récepteur est polymorphique sur sa position 158, sur laquelle peut exister une valine ou une phénylalanine. Le FcγRIIIA V158 est un récepteur de plus haute affinité que le F158, notamment pour les IgG1, avec des conséquences notamment en termes d'ADCC (Dall'Ozzo et al., 2004). Ce polymorphisme a un impact sur la réponse clinique dans le traitement du lymphome folliculaire par rituximab et celui de la leucémie lymphoïde chronique (Cartron et al., 2002; Tout et al., 2017a), ainsi que dans le traitement par cétuximab (Bibeau et al., 2009; Zhang et al., 2007), trastuzumab (Musolino et al., 2008; Tamura et al., 2011) et infliximab (Louis et al., 2004).

La protéine C1q constitue la première étape du recrutement de la voie classique par le complément. C1q n'a que peu d'affinité pour le domaine CH₂ du Fc des IgG monomériques (Kishore and Reid, 2000). Lorsque C1q se lie simultanément au Fc de plusieurs anticorps, la protéine subit un changement conformationnel qui active le domaine catalytique C1r, qui va cliver C4 et C2 pour former une C3-convertase. La voie classique du complément se trouve activée, aboutissant à la formation du complexe d'attaque membranaire et à la destruction de la cellule porteuse de l'antigène, phénomène également appelé CDC. D'autres auteurs ont décrit un mécanisme d'opsonisation médié par les récepteurs au complément, et médié par l'arrimage de C3b activé à la surface de la cellule-cible de l'anticorps. La liaison de ce C3b aux récepteurs CR1 (CD35) et CR2 (CD21) à la surface de cellules phagocytaires ou cytotoxiques entraînerait l'opsonisation de ces dernières ou la dégranulation, provoquant respectivement de la CDCP ou une CDCC (Lee et al., 2017). Le recrutement de la voie classique du complément peut constituer un risque d'effets indésirables, et certaines stratégies

telles que l'aglycosylation ou la mutation ponctuelle de certains résidus peuvent être entreprises pour s'affranchir de ces risques (voir chapitre 2).

Enfin, de par les fonctions décrites récemment, le FcRn peut s'envisager comme un effecteur moléculaire de la réponse aux anticorps thérapeutiques (Baker et al., 2014). Sa participation à l'élimination des complexes immuns et à la présentation de l'antigène est détaillée au paragraphe 4.2.2.

Tableau 2

Recepteur	Monocytes macrophages	Mastocytes	Polynucléaires neutrophiles	Polynucléaires éosinophiles	Polynucléaires basophiles	Cellules dendritiques	Plaquettes	Cellules NK	Lymphocytes B
FcγRI	C	I	I			C			
FcγRIIa	C	C	C	C	C	C	C		
FcγRIIb	+/-		+/-	C	C	C			C
FcγRIIc	C		C					C	
FcγRIIIa	C							C	
FcγRIIIb			C		+/-				

C : expression constitutive

I : expression inducible

+/- : expression dans certaines sous-populations uniquement

Expression des principaux FcγR chez l'Homme. Adapté de Bruhns and Jönsson, 2015.

Tableau 3

	FcγRI	FcγRIIA		FcγRIIB	FcγRIIIA		FcγRIIIB	FcRn
		H ₁₃₁	R ₁₃₁		V ₁₅₈	F ₁₅₈		
IgG1	6×10^7	5×10^6	3×10^6	1×10^5	2×10^5	1×10^5	2×10^5	8×10^7
IgG2	-	4×10^5	1×10^5	2×10^4	7×10^4	3×10^4	-	5×10^7
IgG3	6×10^7	9×10^5	9×10^5	2×10^5	1×10^7	8×10^6	1×10^6	3×10^7
IgG4	3×10^7	2×10^5	2×10^5	2×10^5	2×10^5	2×10^5	-	2×10^7

Affinités (K_A en M^{-1}) des différentes sous-classes d'IgG humaines pour les principaux FcγR humains. Les variants du FcγRIIA et du FcγRIIIA sont identifiés par le nom et l'emplacement dans la séquence du résidu polymorphique. Adapté de Bruhns and Jönsson, 2015.

3.2.3) Concentration-réponse

Relation pharmacocinétique-pharmacodynamie

La PK décrit les lois qui régissent la relation entre une dose, soit une quantité de médicament administré à un patient donné, et l'évolution de la concentration plasmatique ou tissulaire en médicament au cours du temps après cette administration. Ainsi, pour un patient donné, il existe une corrélation entre la dose administrée et la concentration plasmatique en un temps donné. De même, pour la relation pharmacocinétique-pharmacodynamie ou PK-PD, il existe une corrélation entre concentration plasmatique (ou tissulaire en fonction des cas) en médicament et réponse clinique. Ce paramètre s'estime en cherchant à mettre en évidence une corrélation entre une concentration plasmatique, mesurée en résiduel, soit juste avant l'administration « n+1 », et une mesure d'efficacité clinique, comme un score clinique pertinent d'activité de la maladie, ou éventuellement un biomarqueur de celle-ci. Ce paramètre permet aussi de catégoriser les patients en fonction de la qualité de leur réponse au médicament, et éventuellement de standardiser des critères de changement de ligne de traitement lorsque c'est possible. Ainsi, les bons répondeurs peuvent continuer à la même dose puisqu'il est mesuré chez eux une bonne réponse, il est possible dans certains cas d'envisager une augmentation de posologie chez les moyens répondeurs, et les mauvais répondeurs peuvent être orientés vers une autre ligne de traitement, lorsqu'elle existe.

La relation concentration-effet n'est pas utilisée systématiquement pour le suivi thérapeutique de façon personnalisée. Le suivi thérapeutique est une démarche qui nécessite en effet de posséder une méthode de dosage fiable et validée, et engendre des coûts supplémentaires. Pour une majorité d'anticorps, la dose est donc calculée sur les paramètres estimés à partir des essais cliniques, et la réévaluation du traitement se fait uniquement sur des critères d'activité de la maladie.

Une corrélation dose-réponse a été mise en évidence dans le cas des tumeurs ORL par cétuximab (Pointreau et al., 2016). Pour ce même anticorps, la résiduelle à J14 dans les cancers colorectaux métastatiques avait une influence sur la survie sans progression (Azzopardi et al., 2011). Dans la maladie de Rendu-Osler, c'est une relation entre dose administrée et survenue de complications hémorragiques qui a été révélée, avec pour perspective une modification du protocole d'administration de l'anticorps dans cette indication (Azzopardi et al., 2015). La corrélation entre la dose, la concentration et la réponse

au rituximab a été objectivée dans un modèle murin (Daydé et al., 2009). Cette étude a également montré l'impact de la masse antigénique sur la relation PK-PD, ce qui a été confirmé chez l'homme (Tout et al., 2017a), ouvrant la porte à des études prospectives d'ajustement de la dose sur des paramètres de masse tumorale au bilan d'extension. Dans le cas de l'adalimumab, cette relation concentration-effet a également été démontrée, ainsi que l'intérêt d'un bolus à l'instauration du traitement lors du traitement d'une polyarthrite rhumatoïde (Ternant et al., 2015). A cause de l'importante variabilité interindividuelle de cette relation, certains auteurs vont jusqu'à préconiser l'individualisation des concentrations-cible et donc l'adaptation posologique personnalisée dans cette indication (Ducourau et al., 2014).

Comme présenté dans la figure 9, les facteurs de variabilité de la réponse au traitement par anticorps thérapeutique comprennent le statut inflammatoire, les médicaments associés et le statut immun à l'égard du médicament. Ces trois facteurs peuvent être interdépendants dans certains cas. Le cas des anti-TNF étant le plus flagrant. Dans les pathologies inflammatoires chroniques où ils sont utilisés, la cible est une cytokine proinflammatoire. Les marqueurs biologiques de l'inflammation tels que la concentration sérique en CRP ou la vitesse de sédimentation érythrocytaire sont aussi utilisés comme biomarqueurs pour le suivi biologique de la maladie, l'activité de la maladie et le statut inflammatoire sont donc connectés (Sengul et al., 2015). Les maladies inflammatoires chroniques sont celles pour lesquelles il est observé le plus fort taux d'immunisations. Dans ce contexte, il a été décrit que les médicaments anti-inflammatoires réduisaient le taux d'immunisation à l'encontre de la maladie (Jani et al., 2014a; Schaeffer et al., 2015). Ces anti-inflammatoires étant utilisés initialement en monothérapie dans cette indication, leur mode d'action potentiel dans la réduction de l'immunogénicité des anticorps est double : en limitant l'inflammation, ils peuvent limiter les réponses immunologiques à l'encontre du biomédicament d'une part ; et d'autre part, ils limitent l'abondance de la cible qui est synthétisée dans ce contexte inflammatoire. L'impact de l'abondance de la cible sur l'immunisation n'est pas démontré à ce jour, mais il a été formulé l'hypothèse qu'une forte quantité d'anticorps thérapeutiques non complexés engendrerait la tolérogénicité à l'égard de l'anticorps (Chaigne and Watier, 2015). Cette théorie est appuyée par la plus grande prévalence d'immunisations parmi les patients présentant des résiduelles en anticorps thérapeutique très faibles (Barlow et al., 2016; Detrez et al., 2016; Mulleman et al., 2010). Enfin, l'hypothèse que cette immunogénicité serait liée à la cible elle-même est nuancée par la forte prévalence d'anticorps anti-rituximab dans les

pathologies inflammatoires chroniques. Dans ses indications oncologiques, le rituximab induit une réponse anticorps anti-médicament (anti-drug antibodies ou ADA cf. paragraphe « Immunogénicité des anticorps thérapeutiques » p. 42) dans moins de 1% des cas (McLaughlin et al., 1998). Ce taux passe à plus de 18% dans le pemphigus (Schmidt et al., 2009), et entre 8,6 et 10,6% dans la polyarthrite rhumatoïde (Denoel et al., 2015; Thurlings et al., 2009), ce qui montre bien le lien entre statut inflammatoire et immunogénicité.

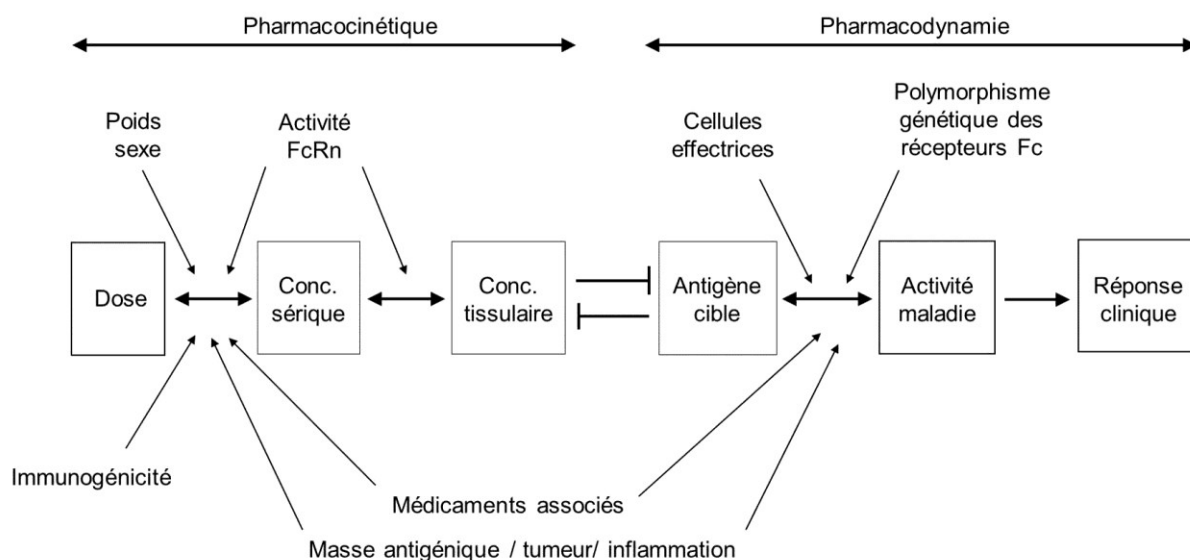


Figure 9

Schéma explicatif de la pharmacocinétique (PK) et relation pharmacocinétique-pharmacodynamie des anticorps thérapeutiques. La dose administrée par voie parentérale aboutit à une concentration sérique. La distribution se fait dans les tissus extracellulaires, et en particulier dans le compartiment malade. Là, l'anticorps interagit avec sa cible, les deux se neutralisant mutuellement. La neutralisation ou la destruction de la cible liée à l'anticorps, provoque une diminution de l'activité de la maladie, et donc une réponse clinique. La PK des anticorps thérapeutiques est sujet à variations interindividuelles. Certaines s'expliquent, comme les différences de sexe, de surface corporelle, certains polymorphismes moléculaires, et une partie, la variabilité résiduelle, est inexpliquée.

Immunogénicité des anticorps thérapeutiques

Dans certains cas, le patient développe une immunité à l'encontre du médicament. Apparaissent alors des anticorps-anti-médicament (anti-drug antibodies ou ADA), qui peuvent être neutralisants, et donc empêcher le médicament de se lier à sa cible. Cette réaction peut être la source d'une augmentation de l'élimination du médicament, d'une baisse d'efficacité, voire de réactions à la perfusion (Ducourau et al., 2011). Néanmoins, tous les anticorps ne provoquent pas nécessairement une immunisation. Il existe trois grands types de déterminants impliqués dans l'immunogénicité d'un anticorps. Parmi eux, des facteurs liés à la structure même de l'anticorps, des facteurs liés à la pathologie, et des facteurs liés au patient (Schellekens, 2005).

Les déterminants liés au patient : la pathologie et la génétique.

Si l'influence de la génétique et en particulier des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité est réfuté, l'influence de la pathologie est indéniable. En particulier, l'immunisation est plus fréquente lors du traitement de pathologies inflammatoires chroniques. Dans ces pathologies, la coadministration de médicaments anti-inflammatoires limite l'apparition d'ADA démontrant l'influence de l'inflammation dans l'immunogénicité des anti-TNF- α (Krieckaert et al., 2012).

Les déterminants liés au protocole d'administration

Parmi les biomédicaments, en plus des anticorps thérapeutiques, se trouve la classe des vaccins. La principale différence entre ces deux classes thérapeutiques réside dans le fait que l'immunogénicité est recherchée pour les vaccins. De ce fait, tous les paramètres de formulation et d'administration sont pensés de façon à maximiser la réponse et à la rendre durable dans le temps. Pour les anticorps thérapeutiques, il est donc indispensable de s'éloigner le plus possible de paramètres qui seraient souhaitables dans le contexte d'une vaccination. Pour la voie d'administration, les résultats sont discordants. En effet, certains essais comparant l'administration intraveineuse vs. sous-cutanée du trastuzumab et du tocilizumab (anti-IL-6R indiqué dans certaines pathologies inflammatoires chroniques) (Jackisch et al., 2015; Ogata et al., 2014) mettaient en évidence une apparition d'ADA plus fréquente pour la première voie par rapport à la seconde, tandis que d'autres études ne trouvaient pas de différence entre ces voies (Iwahashi et al., 2014; Plavina et al., 2016).

Les schémas posologiques vaccinaux sont souvent construits sur le principe d'une primo-injection suivie à distance par un ou plusieurs rappels. Pour éviter l'immunisation, il faut à l'inverse à conserver une concentration suffisante d'anticorps pour induire la tolérance. Dans les pathologies inflammatoires chroniques où le taux d'immunisation est important, il est décrit que les patients ayant des concentrations résiduelles d'anticorps trop faibles développent plus d'ADA que les autres (Mulleman et al., 2010). Ce concept implique que la maintenance d'une concentration d'anticorps libre tout au long du traitement préviendrait l'apparition d'ADA, incitant à ne pas arrêter un traitement par anticorps anti-TNF- α dans des pathologies chroniques sous prétexte d'une amélioration clinique transitoire (Chaigne and Watier, 2015).

Facteurs liés au médicament

Parmi les sources d'immunogénicité d'un anticorps thérapeutique se trouvent les séquences qui sont issues d'autres espèces, et qui peuvent donc constituer des xénoantigènes. Ces séquences sont prépondérantes dans les anticorps murins, et inexistantes chez les anticorps « fully human ». Les anticorps monoclonaux produits aujourd'hui pour la clinique sont issus de la technologie d'ADN recombinant, qui a permis de passer d'anticorps murins à des anticorps chimériques, puis humanisés et enfin humains (Figure 10 et Carter and Presta, 1992; Kucherlapati et al., 2000; Neuberger and Rabbits, 1993; Winter, 1987).

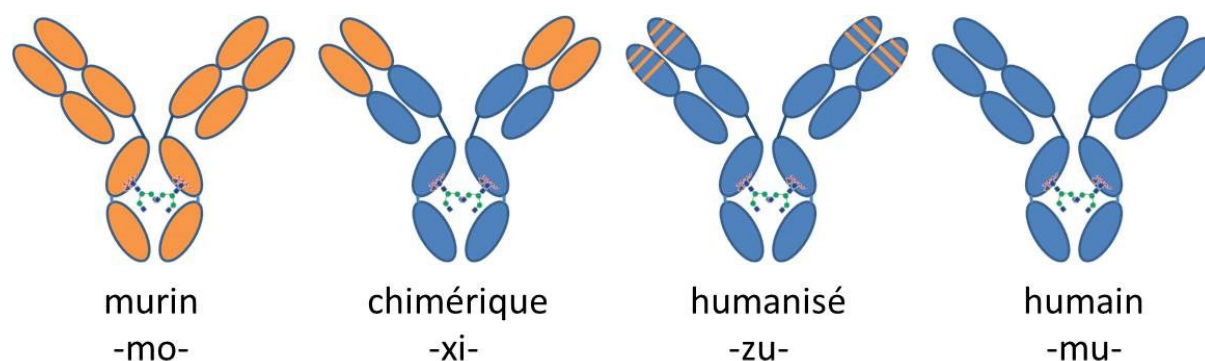


Figure 10

Représentation schématique des différents degrés d'humanisation des IgG thérapeutiques. Les domaines ou séquences représentés en orange sont murins. Les domaines ou séquences représentés en bleu sont humains. De gauche à droite, sont représentés les anticorps murins, chimériques, humanisés et humains. Dans l'anticorps chimérique, Les fragments variables des chaînes lourdes et légères sont d'origine murine. Dans le cas des anticorps humanisés, seuls les CDR sont murins.

C'est ainsi qu'en 1992 fut inventé le rituximab, anticorps thérapeutique chimérique toujours sur le marché et possédant des domaines constants humains (Anderson et al., 2009; Maloney et al., 1994). Si ces technologies successives ont permis aux détenteurs de leurs brevets de contourner la protection conférée par les brevets précédents, et d'avancer l'argument de la plus grande humanisation pour le marketing, il a été montré que le degré d'immunisation à l'encontre de l'anticorps n'était pas corrélé au degré d'humanisation dès lors que celui-ci n'était plus totalement murin (van Meer et al., 2013). De plus, cet article montre que le taux d'immunisation chez les primates non humains ne prédisait pas l'immunogénicité chez l'Homme, ce qui pose une fois de plus la question de la pertinence des modèles animaux pour la préclinique des anticorps thérapeutiques (Loisel et al., 2007).

Pour la majorité, les anticorps thérapeutiques sont formulés sous forme de solutions-mères dans des flacons de verre, soit à recomposer avec de l'eau pour préparations injectables pour ceux qui sont lyophilisés, soit sous forme liquide à diluer dans les poches de soluté pour perfusion. Ces solutions répondent aux exigences des solutés injectables et doivent donc être apyrogènes, neutres, isotoniques, limpides et stériles. Elles doivent être stables le plus longtemps possible, c'est-à-dire conserver une efficacité et une tolérance optimale. Lors de stockages longs, les anticorps peuvent présenter plusieurs types de modifications parmi lesquelles : l'oxydation, en particulier sur les résidus méthionines (Alt et al., 2016; Tsuchida et al., 2016), la photodégradation (Hernández-Jiménez et al., 2016), qui concourent à la dénaturation et donc à l'aggrégation irréversible. Les excipients présents dans ces formulations doivent protéger les protéines de ces phénomènes. Plusieurs types d'excipients sont utilisés. Des systèmes-tampon tels que les sels de citrate, de phosphate ou d'histidine, servent à maintenir un pH neutre. Des surfactants, principalement des polysorbates, augmentent la stabilité colloïdale et limitent l'aggrégation. Des agents dispersants protègent de l'aggrégation par action osmotique et peuvent servir de cryoprotectants pour la lyophilisation. Ce sont principalement des sucres comme le mannitol, le tréhalose, ou le saccharose, même si des sels de glycine ou du chlorure de sodium sont employés également. Les impuretés peuvent provoquer des réactions dans le cas où elles seraient injectées, mais pour prendre l'exemple du CHRU de Tours, toutes les solutions d'anticorps sont filtrées à 0.2µm pendant l'administration au moment du passage dans la tubulure. Les impuretés sont également des supports pour le développement d'agrégats. Il existe deux types d'agrégats, qui diffèrent dans leur structure comme dans les conséquences potentielles à l'administration. Les oligomères sont de petits agrégats réversibles. Leur formation répond à une loi d'action de masse, ce qui

justifie l'utilisation d'excipients pour déplacer l'équilibre (Westermaier et al., 2013). Ces agrégats ne persistent pas après administration lorsqu'ils sont composés de protéines non dénaturées, mais leur présence doit être limitée parce qu'ils sont à la base de la formation de la seconde catégorie d'agrégats : les agrégats irréversibles (Bria et al., 2015). Ces derniers sont formés par nucléation soit autour d'une impureté (solide, particule de verre du flacon ou fibre) ou d'agrégats oligomériques. Leur apparition peut être facilitée par différents stress, qu'ils soient mécaniques ou physiques, ainsi que par une dénaturation même partielle d'un ou plusieurs domaines de l'anticorps (Brader et al., 2015; Hernández-Jiménez et al., 2016; Kameoka et al., 2007). La déglycosylation ainsi que la bioconjugaison ont également été identifiées comme des pourvoyeurs potentiels d'agrégation, laissant présager des problématiques de stabilité physicochimiques supplémentaires pour les anticorps déglycosylés et les ADCs (Beckley et al., 2013; Kayser et al., 2011).

Le phénomène d'agrégation est auto-amplifié, les agrégats de taille suffisante (de l'ordre du micromètre) servant de noyau à leur tour (Bria et al., 2015). L'implication de ces gros agrégats dans l'immunogénicité est démontrée (Ahmadi et al., 2015; Kijanka et al., 2016). Limiter l'immunogénicité d'une solution d'anticorps nécessite donc de contenir la formation d'agrégats réversibles. Il est généralement admis qu'une solution thérapeutique doit tendre vers l'absence de dimères détectables, et que leur proportion ne doit pas dépasser les 5% en masse (Obrezanova et al., 2015). Si les excipients permettent de déplacer l'équilibre thermodynamique, ils n'agissent pas à la source du problème.

L'agrégation d'un anticorps thérapeutique est en partie conditionnée par sa séquence protéique, qui est immuable. La présence de certaines séquences pro-agrégantes et d'autres, anti-agrégantes, a un impact sur la formation d'oligomères (Chennamsetty et al., 2009; Obrezanova et al., 2015; X. Wang et al., 2009). Ces motifs comportent souvent des épitopes T, ce qui les rend de plus immunogènes *per se* (Kumar et al., 2012). A l'inverse, le Fc des anticorps humains comporte des « Regitopes T » qui sont des séquences peptidiques favorisant l'activation de cellules dendritiques FoxP3⁺ et donc la tolérance ainsi qu'un profil anti-inflammatoire (Kwekkeboom, 2012). Enfin, les polymorphismes des FcγR se retrouvent également parmi les facteurs de variabilité interindividuelle de la relation concentration-réponse (cf. chapitre 3.2.2).

3.2.4) Dosage et suivi thérapeutique pharmacologique

A dose égale, il existe une grande variabilité de concentrations plasmatiques résiduelles en anticorps (Gatault et al., 2015; Mould and Green, 2010). D'où la nécessité de comprendre la cinétique de l'anticorps, c'est-à-dire le devenir de la dose administrée au sein de l'organisme. Quelle partie de cette dose parvient effectivement sur le site d'action escompté? Quels sont les paramètres de la maladie, du patient, de la pathologie à prendre en compte pour ajuster la dose? Toutes ces questions ne sont pas du ressort du mécanisme d'action et donc de sa pharmacodynamie, mais touchent à la pharmacocinétique.

4) Pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques

4.1) Définitions

La pharmacocinétique (PK) caractérise l'administration ainsi que le devenir du médicament après son administration chez l'animal ou au patient. Un ensemble de paramètres chiffrés, tels que le volume de distribution, la biodisponibilité, ainsi que des constantes d'échange entre différents compartiments et d'élimination de ces différents compartiments, permettent de chiffrer ce devenir. La PK se décompose traditionnellement en quatre phases, bien séparées pour les petites molécules issues de la chimie. Ce découpage entre les phases d'administration, distribution, métabolisation et élimination est moins pertinent pour les anticorps thérapeutiques. Pour cette classe de médicaments, un autre schéma s'impose (figure 9). A une dose administrée va correspondre, pour un individu et à un moment donné une concentration plasmatique. Dans le cas où le site d'action du médicament est différent du compartiment plasmatique, il va y avoir une étape d'échange entre ce dernier et le compartiment-cible du médicament. Sur ce lieu vont s'opérer des phénomènes d'inhibition réciproque entre le médicament et sa cible, ainsi que des interactions avec les différents effecteurs de la réponse immunitaire éventuellement recrutés par l'anticorps. Enfin, l'inhibition et/ou la destruction de la cible vont avoir un effet sur l'activité de la maladie, ce qui doit provoquer une réponse clinique (Ternant and Paintaud, 2005).

L'absorption est la phase d'entrée du médicament dans l'organisme. Le paramètre-clé chiffré de cette phase s'appelle la biodisponibilité (f), qui caractérise la quantité de médicament qui se retrouve dans la circulation générale. La biodisponibilité est une fraction de la dose

administrée. Par exemple, pour $f = 0.5$, 50% de la dose atteint la circulation générale. Les anticorps sont des protéines gastrosensibles. De ce fait, les formulations d'anticorps sur le marché à ce jour sont prévues pour un usage parentéral (en regroupant sous ce terme les administrations intra ophtalmiques). L'administration se fait en général par voie intraveineuse, qu'il s'agisse de bolus ou de perfusion lente. Dans ce cas, la biodisponibilité vaut 1 et il n'y a pas de déterminants moléculaires pouvant avoir une influence sur ce chiffre. De plus en plus, avec l'avènement de l'hospitalisation à domicile, des formulations d'anticorps concentrés voient le jour, avec pour but l'auto-administration. Ces formulations d'administrent par voie sous-cutanée profonde, nécessitent de fortes concentrations pour administrer de petits volumes. Au-delà d'un volume d'injection de 3mL, la contre-pression tissulaire devient trop importante, engendrant des douleurs à l'administration. Une solution à ce problème consiste en l'utilisation de hyaluronidases comme la rHuPH20, permettant de dégrader les acides hyaluroniques des tissus conjonctifs, diminuant la contre-pression au sein des tissus et augmentant le volume potentiellement administrable (Bookbinder et al., 2006). Cette enzyme permet d'administrer le rituximab par voie sous-cutanée en atteignant une biodisponibilité de 0,65 (Salar et al., 2014). Pour d'autres voies d'administration, notamment intra-ophtalmiques ou pulmonaires, le passage sanguin n'est pas souhaitable. Le traitement d'une tumeur pulmonaire pourrait bénéficier de l'utilisation d'anti-EGFR, et l'administration locale pourrait permettre d'éviter leurs effets indésirables systémiques. La biodisponibilité du cétuximab par voie inhalée a été étudiée chez le macaque, et est de 3.10^{-4} (Guilleminault et al., 2014). En effet, les anticorps ne diffusent pas à travers l'épithélium respiratoire, malgré l'expression par celui-ci du FcRn qui est le principal déterminant moléculaire de la biodistribution et du transfert maternofoetal des IgG (Roopenian et al., 2003).

4.2) Déterminants de la pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques

La pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques présente d'importantes variations interindividuelles. Pour un patient donné, à une dose administrée à un moment donné va correspondre une concentration sérique et à une décroissance de celle-ci dans le temps, une « clairance » plasmatique, responsable de la demi-vie de l'anticorps. Ainsi, le premier facteur responsable des différences de pharmacocinétique va être la dose. Les anticorps thérapeutiques s'administrent pour la plupart en milieu hospitalier et sous contrôle médical. Il est donc volontiers recherché un protocole d'administration avec des doses les plus espacées possibles. Les anticorps endogènes de type IgG1 possèdent une demi-vie longue, de 21 jours en moyenne, qui permet lorsque cette classe est utilisée comme base pour un anticorps thérapeutique d'effectuer une administration tous les deux à trois semaines. Les principaux facteurs de variabilité de la pharmacocinétique des anticorps sont liés à la fois à la physiopathologie du patient (âge, sexe, surface corporelle), à la pathologie (masse antigénique, statut inflammatoire, statut immun), au médicament administré (caractéristiques physicochimiques, stabilité colloïdale), aux médicaments coadministrés, et aux mécanismes de biodistribution et de clairance de l'anticorps. Ceux-ci comportent le FcRn, ainsi que d'autres mécanismes spécifiques et non spécifiques (Wang et al., 2008).

Dans cette partie, nous détaillerons le rôle du FcRn comme déterminant moléculaire majeur de la pharmacocinétique des anticorps, en particulier de leur distribution, puis nous exposerons les mécanismes de clairance et les facteurs de variabilité de cette PK.

4.2.1) Distribution de la circulation générale aux tissus

C'est la phase de répartition du médicament entre les différents compartiments. Les constantes chiffrées caractérisant cette phase sont notamment le volume de distribution, qui est le volume théorique dans lequel se répartit la dose du médicament pour expliquer la concentration initiale. Pour une administration parentérale, cela s'écrit :

$$Vd = \frac{D}{C_0}$$

Avec Vd le volume de distribution, D la dose administrée et C₀ la concentration initiale. Pour les anticorps thérapeutiques, la diffusion se fait principalement dans le sang et la lymphe, entraînant des volumes de diffusion restreints, de l'ordre de 3 à 5 litres.

D'un point de vue tissulaire, l'exposition d'un tissu à l'anticorps dépend de plusieurs facteurs dont la surface d'échange, le taux de vascularisation et sa perméabilité capillaire. Ainsi, il a pu être estimé que la répartition d'un anticorps, en l'absence de cible, se faisait comme suit : poumon, 15% de la dose, cœur 10%, rein 14%, muscle 4% ; peau 16% ; intestin grêle 5%, gros intestin 5%, rate 13%, foie 12%, os 7%, estomac 5%, ganglions lymphatiques 6%, tissu adipeux 5%, cerveau 0,4%, pancréas 6%, gonades 6%, thymus 7% et thyroïde 68% (Shah and Betts, 2013). Ce dernier chiffre peut paraître anormal, et est probablement artéfactuel. En effet, ce travail méta-analytique a été effectué sur une série d'études murines, simiennes et humaines menées pour la plupart à l'aide d'anticorps radiomarqués par des isotopes d'iode, et la radioactivité accumulée dans la thyroïde peut provenir de métabolites iodés captés préférentiellement par cet organe.

En dehors d'immunoglobulines polyclonales qui ne rentrent pas dans la catégorie des anticorps recombinants, les anticorps administrés ont une cible antigénique, qu'elle soit soluble ou membranaire, voire les deux, qui modifie les paramètres de distribution. La distribution est donc en partie conditionnée par l'abondance et l'accessibilité de la cible. Certaines cibles sinon une majorité se trouvent dans le compartiment interstitiel, et l'anticorps doit pour accéder quitter le compartiment vasculaire d'où il provient. Ce transport est un mécanisme actif sous-tendu par le FcRn.

4.2.2) Le Récepteur néonatal au Fc des IgG

Ce récepteur, apparenté au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, se compose d'une chaîne alpha comportant trois domaines et de la bêta-2-microglobuline (figure 11). Mis en évidence par l'équipe de Simister (Simister, 2003; Simister and Mostov, 1989), son existence avait été pressentie par Brambell (Brambell et al., 1964), qui avait postulé l'existence d'un unique récepteur responsable des phénomènes d'immunisation passive de rats nouveau-nés et de la sensibilisation anaphylactique passive chez le cochon d'inde. Il avait toutefois mis à part l'albumine, dont il avait supposé que le métabolisme était totalement indépendant de celui des gammaglobulines. Cette dernière constitue pourtant un ligand naturel du FcRn, qu'elle partage avec les IgG (Chaudhury et al., 2006, 2003). Elle possède un site distinct de fixation sur le FcRn, qu'elle utilise également comme récepteur de recyclage, ce qui lui confère une durée de vie allongée.

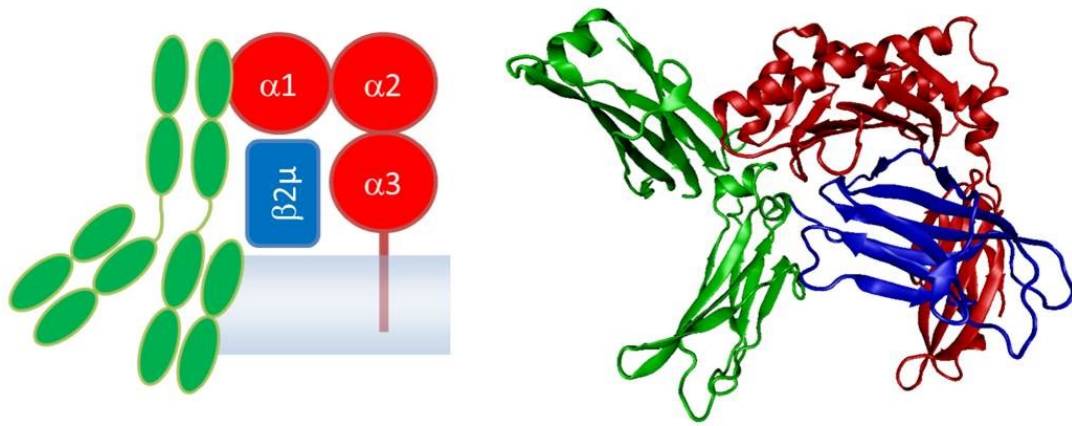


Figure 11

Structure schématique du FcRn. Gauche : schéma de l'association à pH acide d'une IgG (vert) et du FcRn. L'IgG est positionnée avec ses Fab contraints contre la membrane de la vacuole. Droite : structure déduite de la cocrystallisation du FcRn avec un Fc d'IgG (structure PDB n°4N0U) Le Fc (vert) est en contact à la fois avec la chaîne alpha du FcRn (rouge) et avec la bêta-2-microglobuline (bleu).

Le FcRn responsable à la fois du transfert transplacentaire des IgG (donc de l'immunité passive du fœtus) et de la longue demi-vie des IgG chez l'Homme (Roopenian et al., 2003). Il est exprimé de façon très vaste, dans l'endothélium vasculaire, les entérocytes, le syncytiotrophoblaste, les macrophages interstitiels, alvéolaires, spléniques et les cellules de Küppfer (Latvala et al., 2017). Dans les capillaires, il existe une macropinocytose physiologique perpétuelle, qui provoque l'internalisation de molécules plasmatiques dont les IgG et l'albumine. Ces deux molécules représentent le principal contingent protéique du plasma, et donc également de la pression oncotique plasmatique. Leur synthèse continue, respectivement par les plasmocytes et le foie représenteraient une dépense énergétique astronomique si ces protéines étaient catabolisées suite à la pinocytose endothéliale. Après internalisation des vésicules de macropinocytose, celles-ci se différencient en endosomes précoces, provoquant une acidification progressive de leur contenu. Arrivés à pH6, plusieurs résidus et notamment des histidines à la fois sur l'anticorps et le domaine $\alpha 3$ du récepteur subissent une protonation qui permet la liaison des immunoglobulines (ainsi que de l'albumine) au FcRn (figures 11, 12). La queue intracytoplasmique du FcRn contient à la fois

des motifs d'endocytose clathrine-dépendante, responsables de l'internalisation du FcRn, mais aussi une séquence qui les oriente vers les endosomes de recyclage plutôt que vers les endosomes tardifs (Mahmoud et al., 2017; Newton et al., 2005). Les anticorps monomériques ainsi liés peuvent alors : soit retourner à la membrane d'où ils sont issus, soit suivre des voies de transcytose et changer de compartiment (figures 12, 13). Ce routage intracellulaire est encore incomplètement connu, même si plusieurs acteurs ont déjà été identifiés. Par exemple, la protéine LEPROT est impliquée dans le recyclage à la membrane, qu'elle soit apicale ou basolatérale. Les composants du complexe exocyste EXOC2 et 7 sont eux impliqués dans les voies de transcytose. Enfin, PARDB6 est spécialisé dans le trafic apical (Nelms et al., 2017).

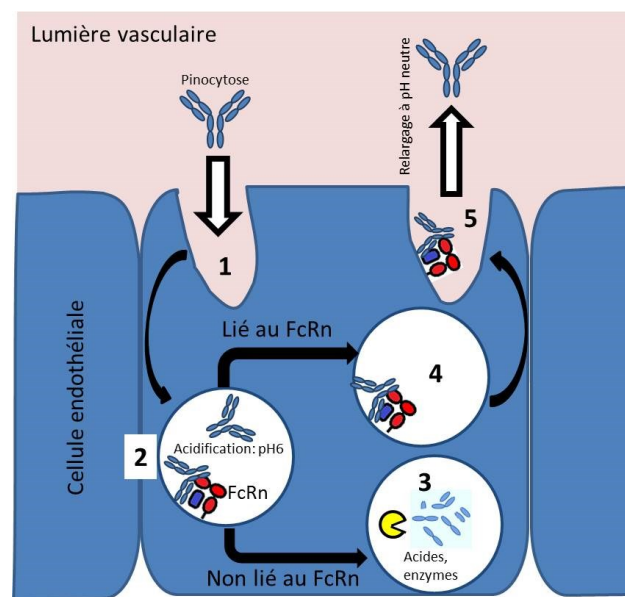


Figure 12

Fonctionnement du recyclage FcRn-dépendant. L'anticorps subit la pinocytose physiologique (1). Dans l'endosome (2), l'acidification provoque la liaison au FcRn. Les protéines non liées au FcRn sont dégradées dans les lysosomes (3). Les anticorps ayant lié le FcRn suivent d'autres voies (4) les ramenant à la membrane où le pH neutre permet leur relargage (5).

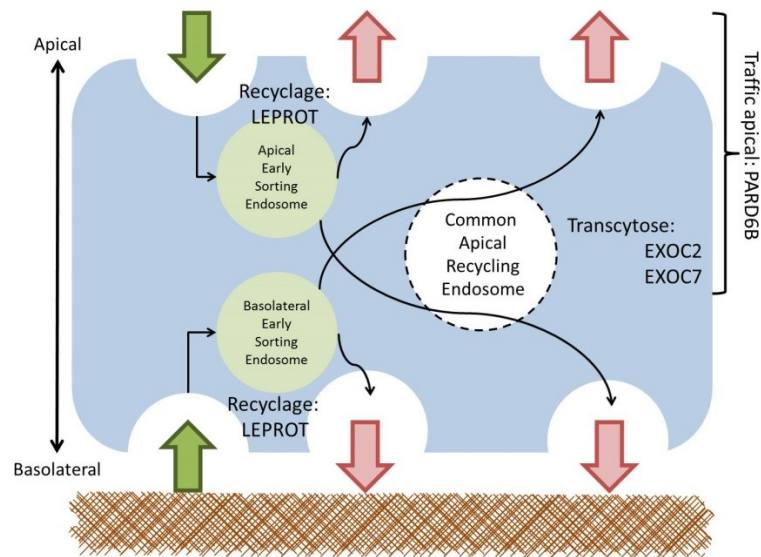


Figure 13

Schéma de voies de routage empruntées par les anticorps ayant lié le FcRn. En fonction de la face cellulaire où se fait l'internalisation, les voies de routage sont sous la dépendance d'acteurs moléculaires parfois distincts et parfois communs. Par exemple, la transcytose est sous la dépendance de plusieurs molécules du complexe exocyste (EXOC2, et 7). Adapté de Nelms et al. 2017.

Le FcRn est responsable de la longue demi-vie des anticorps de classe IgG chez l'Homme. Cette demi-vie allongée permet d'espacer les injections en maintenant une efficacité thérapeutique. Ceci a été démontré chez l'animal pour la première fois en 2010 (Zalevsky et al., 2010). Parmi les anticorps thérapeutiques possédant un Fc, le rituximab (IgG1) possède une demi-vie de l'ordre de 20j. Cette demi-vie est de 7,5j pour le panitumumab (IgG2 anti-EGFR indiqué dans certains cancers colorectaux métastatiques) et 26j pour le pembrolizumab (IgG4 anti-PD-1 indiqué dans le mélanome avancé ou métastatique) (Breedveld et al., 2007; "Keytruda, INN-pembrolizumab" EMEA, "Vectibix, INN-panitumumab" EMEA). Le gain de demi-vie apporté par ce fragment est important comparativement aux fragments d'anticorps dénués de Fc. Ainsi, les scFv possèdent une demi-vie de l'ordre de l'heure, et les Fab tels que l'abciximab également (Chen et al., 2012; Hutt et al., 2012; Usta et al., 2016). Il existe certaines alternatives à la liaison au FcRn pour contourner ce problème de courte demi-vie. Ainsi, le certolizumab, qui est un Fab anti-TNF- α a été pégylé, ce qui lui confère une demi-vie plasmatique de 15j, sensiblement proche de celle d'une IgG complète (Duggan and Keam, 2009). A l'instar des anticorps nus, les ADC utilisent le recyclage FcRn-dépendant. Certains auteurs pensent que la liaison à ce récepteur pourrait être pourvoyeuse d'effets indésirables(de

Goeij and Lambert, 2016), pourtant il a été montré que ce mécanisme est nécessaire et même indispensable pour éviter une partie de la toxicité de ces médicaments (Hamblett et al., 2016). Toutefois, pour cette classe d'anticorps, d'autres mécanismes de clairance sont en jeu, et leur demi-vie plasmatique reste faible : elle est comprise entre 4 et 6 jours pour le brentuximab védotine (anti-CD30 indiqué dans certains types de lymphomes CD30+) et de l'ordre de 5j pour le trastuzumab emtansine ("Kadcyla, INN-trastuzumab emtansine" EMEA; Younes et al., 2010).

Si le FcRn permet le recyclage et la transcytose des IgG monovalentes, il est également impliqué, et serait même indispensable dans la cross-présentation de l'antigène par les cellules dendritiques et l'élimination des complexes immuns (Baker et al., 2011). En présentant plusieurs portions Fc (s'il est multivalent), le complexe immunitaire effectue un pontage de plusieurs molécules de FcRn, ce qui provoque une prise en charge différente de celle des anticorps monomériques et aboutit à la voie lysosomiale puis à la présentation d'antigène, ce qui augmente la capacité à induire une réponse T efficace, même en présence de faibles concentrations de complexes immuns (Baker et al., 2011). Ainsi, le FcRn aurait un rôle de facilitateur ou « booster » de la réaction humorale. Pour les complexes immuns n'impliquant qu'un seul anticorps, il est généralement admis qu'ils sont recyclés au même titre que les anticorps libres, participant potentiellement à une augmentation artificielle de la demi-vie de la cible antigénique (Igawa et al., 2013; Qiao et al., 2008). Cette différence de prise en charge en fonction de la valence et donc de l'avidité Fc-dépendante a été démontrée dans un modèle d'infection murine à *Klebsiellae*, en utilisant un anticorps poly-Fc. Les anticorps présentant trois Fc étaient plus protecteurs, montraient une meilleure activité d'opsonisation et étaient plus rapidement éliminés de la circulation par un mécanisme FcRn-dépendant, créant un effet de siphon antigénique (Wang et al., 2017). Une autre solution a montré son efficacité pour augmenter la clairance antigénique. Il s'agit d'une technologie, appelée « sweeping antibodies », et qui consiste à générer un paratope contenant des résidus chargés de sorte à obtenir une fixation de l'antigène pH-dépendante. Ainsi, lors de l'acidification endosomale, l'antigène est relargué dans la vésicule qui va murir en endosome tardif et provoquer la dégradation de l'antigène, alors que l'anticorps sera recyclé grâce au FcRn (Igawa et al., 2016, 2013). Si l'affinité de ce récepteur pour ses ligands est un paramètre important, certains auteurs se sont interrogés sur l'existence de polymorphismes qui pourraient altérer ou modifier son expression.

Chez l'homme, la variation du nombre de copies du gène *FCGRT* codant pour le FcRn est rare, la plupart des sujets présentent deux copies du gène (Passot et al., 2013). Dans cette étude, la présence d'une copie supplémentaire n'a pas été associée à des différences en termes de PK pour le cétuximab. Ce récepteur présente également des polymorphismes, tels que des différences de nombre de répétitions de séquences en tandem (variable number tandem repeat ou VNTR). Le statut VNTR3/3 homozygote a été associé à une plus faible vitesse de biodistribution du cétuximab, sans différences sur son élimination. Une étude similaire menée sur les anti-TNF- α a également montré une absence d'influence du polymorphisme VNTR sur la réponse clinique (Montes et al., 2015). Ce polymorphisme a également été associé avec une meilleure exposition à l'infliximab dans le traitement des pathologies intestinales inflammatoires chroniques (Billiet et al., 2016) ainsi qu'à une meilleure efficacité du traitement par les immunoglobulines intraveineuses dans les déficits immunitaires communs variables (Gouilleux-Gruart et al., 2013).

Enfin, le FcRn a été décrit comme une potentielle cible thérapeutique. L'utilisation des immunoglobulines polyvalentes pour augmenter le catabolisme d'autoanticorps ou d'alloanticorps pathogènes reste le principal exemple de cette utilisation (Hansen and Balthasar, 2002; Li et al., 2011, 2005). Il a également été décrit la possibilité d'utiliser des anticorps anti-FcRn pour augmenter le catabolisme, et même si à ce jour aucun anticorps n'a vu le jour sur le marché dans cette indication, l'ARGX-113, un anticorps de type single-chain fragment variable est en phase d'essai clinique dans les myasthénies et thrombocytopénies auto-immunes (Getman and Balthasar, 2005; Li et al., 2011; Nixon et al., 2015). Enfin, le ciblage du FcRn pourrait avoir un intérêt dans des intoxications médicamenteuses, par inhibition du transport biliaire et du recyclage de l'albumine, ce qui favoriserait l'élimination du N-acétylparabenzoinone imine, métabolite hépatotoxique du paracétamol qui possède une importante fraction liée (Ward and Ober, 2017). De tels anticorps anti-FcRn doivent être dirigés contre un épitope différent de ceux développés pour les pathologies à auto ou allo-anticorps, puisque l'albumine se lie sur un site distinct (Oganesyan et al., 2014).

4.2.3) Ingénierie moléculaire et modulation de la PK FcRn-dépendante

L'ingénierie moléculaire permet à la fois de moduler les caractéristiques physicochimiques de l'anticorps ainsi que sa capacité à recruter des effecteurs, et de les adapter à l'effet désiré. Toute mutation comporte néanmoins des risques, notamment en termes de fonctionnalité. Certains auteurs ont décrit des conséquences sur des fonctions portées par des interfaces à distance du site muté, et qui sont donc par essence imprévisibles. Par exemple, dans le cas du motavizumab (un anti-virus respiratoire syncytial en phase 3), des mutations au niveau du site d'interaction avec le FcRn diminuent la capacité de l'anticorps à recruter les FcγRI, IIA, IIB, IIIA, ainsi que le C1q alors que les sites de liaison à ces différents effecteurs se trouvent dans le début du domaine C_{H2} et la charnière (Grevys et al., 2015). De même, notre équipe a montré que les polymorphismes responsables des différents allotypes, portés par les résidus dans le C_{H1} et dans le C_{H3}, à distance du site d'interaction avec le FcRn, modifiaient la capacité de l'anticorps à se lier au FcRn, et sa PK (Ternant et al., 2016). Les patients d'allotype G1m(17;1) présentaient une demi-vie plus courte de l'infliximab, anticorps d'allotype G1m(17;1), que les patients d'allotype G1m(3;-1) dont les anticorps endogènes déplaçaient moins bien l'infliximab lors de la compétition pour la liaison au FcRn.

Enfin, certains avancent l'implication de résidus des paratopes dans l'affinité au FcRn (Schoch et al., 2015). Dans ce travail, les auteurs s'appuient sur la proximité de la séquence des Fc du briakinumab (anti-IL12 en phase 3 pour la maladie de Cohn et le psoriasis) qui possède une demi-vie terminale de 8-9jours, contre 22 pour l'ustékinumab (anti-IL12 concurrent du briakinumab), dont les paratopes présentent des différences en termes de répartition des résidus chargés.

4.2.4) Clairance des anticorps thérapeutiques

La clairance traduit la cinétique de disparition du médicament au sein d'un certain volume, par unité de temps (ex. mL.min⁻¹). Elle peut aussi bien exprimer la disparition d'un compartiment à la faveur d'un autre (clairance de distribution), que la disparition du médicament de l'organisme (clairance d'élimination). Cette clairance fait intervenir différentes composantes, mécanismes d'élimination pour certains spécifiques, comme l'élimination médiée par des récepteurs, et d'autres non.

Clairance FcRn-dépendante

La saturabilité de la liaison au FcRn provoque une compétition au sein du compartiment endo-lysosomal. Les anticorps les plus affins sont recyclés, et les anticorps naturellement moins affins comme par exemple les anticorps dont les méthionines ont été oxydées seront plus dégradés (Bertolotti-Ciarlet et al., 2009). C'est également la saturabilité de ce mécanisme qui conduit à utiliser des immunoglobulines polyvalentes dans certaines pathologies auto-immunes où un anticorps pathologique est impliqué dans la physiopathologie, comme c'est le cas pour la pemphigoïde bulleuse (Schwab and Nimmerjahn, 2013). Dans ce cas, les immunoglobulines intraveineuses provoquent une augmentation de la concentration sérique totale en IgG, augmentant la compétition pour le recyclage FcRn-dépendant à l'intérieur des endosomes, ce qui augmente la clairance de l'auto-anticorps.

L'implication du FcRn dans les phénomènes de présentation de l'antigène a un impact sur la clairance des complexes immuns, mais aussi par extension de tout complexe présentant plusieurs Fc (Baker et al., 2013a). Ainsi, les agrégats d'anticorps présentent plusieurs Fc et donc se comportent comme des complexes immuns, en présentant une avidité semblable pour les récepteurs au Fc et notamment le FcRn. Il en résulte une augmentation artificielle de la liaison au FcRn (Bajardi-Taccioli et al., 2015), pouvant provoquer une plus importante présentation de peptides reconnus comme « non-soi » potentiellement contenus dans la séquence de l'anticorps (Rosenberg, 2006).

Clairance FcRn-indépendante

La clairance dépendante de la cible

La complexation de l'anticorps avec sa cible représente à la fois le mécanisme d'action du médicament et un mécanisme d'élimination de ce dernier. La cible est un antigène présent dans une certaine quantité, et est donc saturable. Pour de faibles concentrations d'anticorps, la cible n'est pas saturée et l'anticorps se lie donc intégralement et rapidement. Sa clairance plasmatique est donc très élevée tant que la totalité de la masse antigénique accessible n'est pas saturée. Dès lors que l'anticorps se trouve en excès suffisant, la clairance chute et la demi-vie augmente de nouveau proportionnellement à la dose. Ce phénomène de pharmacocinétique non-linéaire liée à la cible est connu sous le nom d'élimination du médicament médiée par la cible, ou target-mediated drug disposition (TMDD). Toutefois, les effets de la TMDD sur la pharmacocinétique ne s'observent pas systématiquement. Il se

produirait dans environ la moitié des anticorps, et serait plus fréquent dans le cas d'antigène membranaire (Liu, 2017). Dans certains cas, cette clairance s'effectue du compartiment plasmatique vers un autre compartiment, de façon unidirectionnelle. Cette TMDD porte le nom d'effet siphon ou « sink effect », comme c'est le cas avec le rituximab dans la leucémie lymphoïde chronique (Tout et al., 2017b). Dans le cas du traitement de lymphomes malins non-hodgkiniens par ce même anticorps, il est observé une TMDD dépendante du volume tumoral, avec modification du volume de distribution sans altération de la clairance, ce qui traduit une séquestration temporaire de l'anticorps dans un compartiment qui le restitue progressivement, ce qui a été appelé de façon officieuse un effet éponge ou « sponge effect » (Tout et al., 2017a).

Clairance médiée par les ADA

La présence d'ADA a plusieurs effets sur le traitement par anticorps thérapeutique. Lorsqu'ils sont neutralisants, ils peuvent diminuer l'efficacité du médicament, et donc avoir un impact sur la relation concentration-réponse (figure 9). Mais en complexant l'anticorps, ils augmentent également sa clairance, et il a été décrit que l'apparition d'ADA était associée à une clairance d'élimination augmentée de l'anticorps thérapeutique (Ducourau et al., 2011; Lecluse et al., 2010). L'effet des ADA sur la PK est assez similaire à celui de la TMDD. En effet, les ADA, à l'instar de la masse antigénique, constituent un « pool » d'une taille donnée, donc saturable, et qui ont un effet important sur la clairance lors de l'administration de trop faibles concentrations d'anticorps (Liu, 2017).

Récepteurs de glycannes

Parmi les autres facteurs d'élimination, certains motifs de glycosylation, sur l'Asn297 du domaine C_H2. Par exemple, les formes agalactosylées favorisent la prise en charge par le récepteur au mannose des macrophages (Macrophage Mannose Receptor ou MMR) et donc l'internalisation par les macrophages porteurs du récepteur de l'anticorps, qu'il soit lié ou non. Ce phénomène serait aussi à l'origine de la toxicité des ADC porteurs de la sous-unité B de la ricine, reconnue par le MMR (Gorovits and Krinos-Fiorotti, 2013). Le profil de glycosylation participe aussi à la clairance de l'anticorps par son action sur le taux d'agrégation de l'anticorps. La quantité d'agrégats présente dans les solutions d'anticorps présentant plus de formes agalactosylées (Arnold et al., 2007) ou déglycosylées (Kayser et al., 2011; Zheng et al., 2011).

Élimination non-spécifique

Le point isoélectrique de l'anticorps joue aussi un rôle dans la demi-vie. Ce point correspond au pH auquel la charge de l'anticorps est nulle. De façon générale, plus cette valeur est élevée, plus l'anticorps sera chargé positivement à pH neutre et plus il adhèrera aux membranes cellulaires (anioniques), augmentant son élimination non-spécifique. Toutefois, le pI n'est pas prédictif de la demi-vie, sauf dans le cas d'une même spécificité antigénique. Au-delà de la charge nette globale, la répartition de ces charges (soit diffuse, soit en îlots) pourrait avoir un impact sur la demi-vie (Schoch et al., 2015).

Spécificités du métabolisme des ADCs

Pour les ADCs, le métabolisme est plus complexe. Deux paramètres, que sont le clivage du linker et celui de la partie relarguée lors de ce clivage, s'ajoutent au métabolisme de l'anticorps. En effet, le mécanisme d'action d'un ADC s'appuie sur le relargage d'une molécule, le plus souvent cytotoxique, sous l'action d'une enzyme (figure 14). En fonction de la structure du linker, cette enzyme peut être extracellulaire ou intracellulaire (souvent une enzyme lysosomale dans ce cas). Cette structure ne garantit toutefois pas une spécificité absolue, et pour le linker valine-citrulline qui est la gâchette la plus couramment employée et qui est destinée à être clivée par la cathepsine G intralysosomiale, il a été démontré qu'elle pouvait être clivée par l'élastase extracellulaire, ce qui pourrait participer à la toxicité hématologique du brentuximab-vedotin (Zhao et al., 2017). Le plus souvent, la molécule couplée sur un ADC est de nature chimique et peut donc subir une métabolisation par les cytochromes, comme c'est le cas des auristatines ou des maytansinoïdes (Davis et al., 2012; Han et al., 2013). Dans le cas des immunotoxines, la molécule est de nature protéique et n'est pas sujette au métabolisme cytochrome-dépendant.

Enfin, la spécificité de l'anticorps pour sa cible, caractéristique vantée de cette classe de médicaments, n'est pas absolue. Un anticorps peut présenter une réactivité croisée à d'autres antigènes de l'hôte chez lequel il est administré, entraînant le risque de toxicité « off-target » (Notkins, 2004).

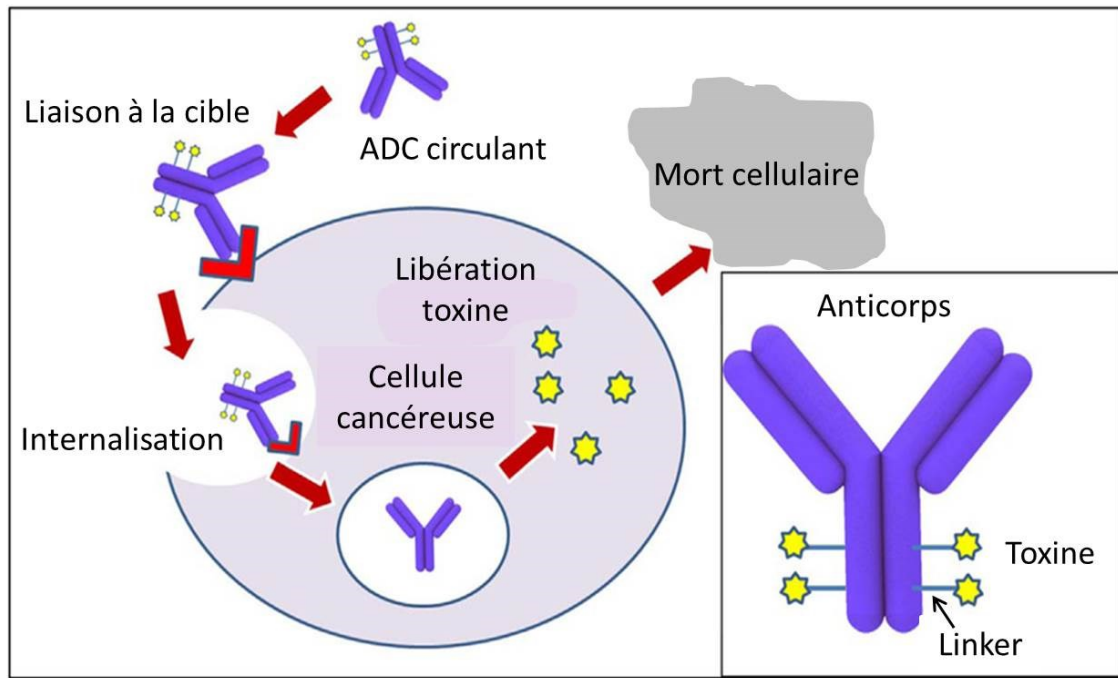


Figure 14

Représentation schématique du mécanisme d'action principal d'un ADC. L'anticorps présent dans le milieu interstitiel (1) se lie à sa cible (2). Idéalement, cette liaison provoque une internalisation du couple ADC-cible (3), et une progression dans la voie endolysosomale. Sous l'action d'enzymes lysosomales, le linker accrochant l'agent cytotoxique (étoiles) à l'anticorps est dégradé et l'agent cytotoxique diffuse vers le cytoplasme (4) où il va exercer sa toxicité pour provoquer la mort cellulaire (5). Adapté de (Shefet-Carasso and Benhar, 2015).

Facteurs de variabilité de la PK liés au patient

La variabilité de pharmacocinétique des anticorps s'explique principalement par le poids. Celui-ci aurait une influence différente sur la PK en fonction de l'anticorps considéré (Bai et al., 2012). Pour l'éculizumab, nous avons montré que l'ajustement posologique en fonction de la masse corporelle permettrait à la fois d'éviter de potentiels sur- et sous-dosages, et de réaliser des économies sur le coût de ce traitement des plus onéreux (Gatault et al., 2015). Ceci s'observe même dans des populations pédiatriques au cours du traitement par un ADC (Flerlage et al., 2016). Certaines études mettent en évidence une influence du sexe sur la variabilité interindividuelle, ce paramètre n'est pas suffisamment important pour être pris en compte dans la détermination de la posologie (Jonsson et al., 2016).

4.3) Pourquoi et comment augmenter la demi-vie de l'anticorps ?

La plupart des anticorps thérapeutiques s'utilisent sur un mode chronique, à l'exception de quelques-uns comme le palivizumab, dirigé contre le virus respiratoire syncytial et utilisé en traitement de bronchiolites chez des enfants à risque. L'administration se faisant majoritairement par voie intraveineuse, elle nécessite une présence médicale voire une hospitalisation. De ce fait, une augmentation de la demi-vie permet de limiter les hospitalisations, le recours au personnel médical, les gestes invasifs et augmente d'autant plus la compliance au traitement. En augmentant la demi-vie, la rémanence de l'anticorps dans l'organisme augmente également, ce qui participe à limiter l'immunogénicité.

Pour augmenter la demi-vie d'un anticorps, une piste très explorée est la modulation de l'affinité au FcRn. Ce récepteur est un acteur majoritaire de la PK des anticorps. Si une mauvaise liaison au FcRn est systématiquement associée à une clairance élevée, une bonne liaison au FcRn, bien qu'indispensable pour avoir une bonne demi-vie, n'est pas forcément associée à une PK favorable.

Une piste pour améliorer la demi-vie, est d'augmenter l'affinité pour le FcRn à pH6 afin de favoriser le recyclage de l'anticorps thérapeutique après internalisation physiologique. En effet, au sein des vésicules endosomales, il y a une compétition notamment avec les IgG endogènes, du fait de la saturabilité de la liaison au FcRn. Mais il est difficile d'augmenter l'affinité au FcRn à pH6 sans que ça en soit associé à une plus forte interaction aussi à pH7,

ce qui n'est pas souhaitable puisqu'il y faut que l'anticorps puisse être correctement relargué dans la lumière vasculaire ou l'espace interstitiel. Une augmentation de l'affinité au FcRn à pH neutre a été associée à un recyclage plus faible aboutissant à une PK défavorable (Borrok et al., 2015; Wang et al., 2011). Il existe donc des limites à l'amélioration de la PK par la modulation de l'affinité au FcRn. A ce jour, les meilleurs résultats obtenus par ingénierie moléculaire du Fc sur la PK ont abouti à des demi-vies de l'ordre de 60 à 100j, ce qui est déjà un gain considérable par rapport aux 21j de demi-vie décrits physiologiquement pour les IgG1 (Robbie et al., 2013).

Mais l'affinité au FcRn n'est pas le seul levier pour agir *via* l'ingénierie moléculaire. Le point isoélectrique d'un anticorps dépend de sa séquence protéique, et il est donc possible de le modifier en remplaçant les résidus basiques. Ainsi, en abaissant le point isoélectrique d'un ou deux points, il est possible de limiter l'adsorption tissulaire et augmenter la demi-vie (Igawa et al., 2010).

L'apparition d'ADA engendre à la fois un risque d'effets indésirables accrus, notamment au moment de la perfusion, mais a surtout un impact potentiellement important sur la pharmacocinétique. En augmentant la clairance de l'anticorps, les ADA vont provoquer une sous-exposition. Celle-ci sera à la fois synonyme d'efficacité altérée, c'est le rapport PK-PD, mais aussi d'immunisation accrue, par absence d'anticorps monomérique. Il y a donc un cercle vicieux, duquel il n'est possible de s'extraire que par le suivi thérapeutique pharmacologique. Celui-ci s'appuie sur un dosage sérique du médicament, notamment juste avant la perfusion. Ceci permet d'estimer les concentrations résiduelles en médicament. En prenant soin d'utiliser un test dosant l'anticorps libre (non complexé à sa cible ni aux ADA), il est possible d'optimiser la posologie afin de rester dans l'intervalle thérapeutique, pour conserver l'efficacité et limiter le risque d'immunisation.

B. Objectifs de la thèse

Il existe environ 70 anticorps possédant une AMM aujourd'hui. Leurs indications s'étalent de la cancérologie à l'allergologie, en passant par l'infectiologie et les maladies métaboliques. Ces molécules possèdent la même structure que les immunoglobulines endogènes, mais ne se comportent pas toujours de façon semblable à celles-ci. Si la demi-vie des immunoglobulines endogènes, en particulier celles de la classe G est de 21 jours en moyenne, d'importants écarts à cette valeur sont observés pour les anticorps thérapeutiques. De plus, la réponse à ces anticorps thérapeutiques est sujette à d'importantes variabilités interindividuelles, en termes de pharmacocinétique. Le récepteur néonatal au Fc des IgG est le principal responsable de la longue demi-vie des anticorps monoclonaux. Il est utilisé par tous les médicaments possédant un Fc d'IgG, qu'il s'agisse d'anticorps complets ou non. Des différences de demi-vie entre plusieurs anticorps thérapeutiques peuvent être dus soit à des différences d'affinité au FcRn, soit à d'autres mécanismes de clairance FcRn-dépendants ou non. Dans mon projet de thèse, je me suis particulièrement intéressé au rôle du FcRn dans la pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques à travers différentes problématiques impliquant ce récepteur.

Dans une première partie de ce travail, nous avons étudié l'influence de l'affinité du FcRn pour son ligand dans le contexte de différences en termes de PK. Nous avons utilisé le modèle des ADC alors non encore exploré, et en particulier le brentuximab védotine, un anti-CD30 indiqué dans certains types de lymphomes, et présentant une demi-vie très faible chez l'Homme, de l'ordre de 4 jours. Cet ADC se présente sous la forme d'un mélange d'espèces possédant plus ou moins de molécules de védotine par anticorps. Chez la souris, ces différentes espèces présentent des profils de PK et de toxicité différents. Nous avons cherché à savoir si les différences de PK étaient dues à une différence d'affinité pour le FcRn.

Une différence en termes de liaison au FcRn, comme dans cette première partie, peut être due à une vraie différence d'affinité intrinsèque d'un anticorps pour le récepteur, ou à un phénomène d'avidité, provoqué par la présentation simultanée de plusieurs portions Fc. Ce phénomène d'avidité se produit physiologiquement lorsque plusieurs Fc sont présentés simultanément par le même complexe moléculaire. Il s'agit d'un autre mécanisme de clairance des anticorps également dépendant du FcRn, qui constitue physiologiquement une voie d'élimination des complexes immuns. Un « cross-linking » de plusieurs molécules de FcRn par des Fc d'anticorps entraîne les anticorps impliqués vers la voie endolysosomiale et

aboutit à la présentation d'antigène. Dans le cas d'un complexe immun, ce phénomène permet une immunisation à l'encontre de la cible de l'anticorps. Mais dans le cas d'agrégats d'anticorps, un complexe formé de multiples Fc, il n'y a pas d'antigène cible à présenter, et cette voie physiologique peut alors aboutir à une immunisation à l'encontre du médicament.

Cette problématique fait l'objet des deux dernières parties de ce travail. Dans la seconde partie, nous avons cherché à mettre en évidence un lien entre des déterminants moléculaires d'agrégation, la présence d'agrégats, et la fréquence des immunisations à l'encontre de plusieurs anticorps possédant une AMM.

Dans la dernière partie, nous avons donc étudié l'impact de la formation de complexes immuns sur l'immunisation à l'encontre d'un anticorps thérapeutique, et le rôle du FcRn dans ce processus.

C. Première partie

Impact du taux de couplage d'un anticorps armé sur la liaison au FcRn

1) Objectifs

Les anticorps armés ou ADC sont une classe d'anticorps d'apparition récente en clinique. Les ADC sont constitués d'un anticorps sur lequel sont couplées de façon covalente une ou plusieurs molécules cytotoxiques. Il s'agit en général d'une molécule trop toxique pour un usage par voie systémique, qui est ciblée aux cellules porteuses d'un antigène reconnu par leur partie anticorps. L'intérêt est de limiter au maximum les toxicités ailleurs que sur la cible. Malheureusement, ces molécules présentent tout de même des effets indésirables imposant des doses maximales pour être bien tolérées. Parmi les facteurs qui ont une influence sur la dose tolérée chez la souris, le taux de couplage de l'anticorps semble important (Hamblett et al., 2004). En exemple, le brentuximab-védotine, deuxième ADC à avoir obtenu une AMM, est indiqué dans certains lymphomes malins non-hodgkiniens. Le brentuximab est un anticorps dirigé contre le CD30 peu efficace par lui-même. Pour la fabrication de l'ADC, il est réduit chimiquement afin d'exposer les thiols engagés dans les ponts disulfures interchaînes, ce qui fait apparaître deux sites de conjugaison par pont disulfure réduit. Sur les groupements thiols ainsi libérés sont couplés des adduits de type « védotine » (maléimide-caproate-valine-citrulline-ParaAminoBenzyl-MonoMéthylAuristatine E). L'anticorps armé ainsi formé contient donc deux molécules de védotine par pont disulfure réduit, soit huit au maximum. Le taux de couplage est appelé ratio drogue-anticorps (drug-to-antibody ratio ou DAR), et peut prendre les valeurs de 0, 2, 4, 6 et 8. Ces différentes espèces peuvent être séparées par chromatographie d'interaction hydrophobe (hydrophobic interaction chromatography ou HIC). Cette technique chromatographique est effectuée en gradient salin, et permet une séparation en fonction de l'hydrophobicité apparente des molécules contenues en solution. En couplant cette technique à une détection UV, il est possible de purifier séparément les différentes espèces contenues dans la solution de brentuximab-védotine.

Chez la souris, un DAR de 4 donne le meilleur rapport efficacité/tolérance (Hamblett et al., 2004). Cependant, la solution de brentuximab-védotine employée en clinique a un DAR moyen égal à quatre, mais comprend de l'anticorps nu, ainsi que des espèces de DAR 2, 4, 6 et 8. Or, l'anticorps non couplé est un inhibiteur compétitif des autres espèces, le DAR2 est bien toléré mais moins efficace, et les DAR 6 et 8 sont plus toxiques. Ces derniers présentent de plus une clairance plasmatique augmentée chez la souris (triplée pour le DAR8), par rapport à celle du DAR4 et l'anticorps nu (Sanderson et al., 2005). Une augmentation de la clairance plasmatique pourrait être causée par une diminution de l'affinité au FcRn,

notamment lors de l'acidification endosomale, à pH6. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons dans un premier temps séparé par HIC, puis caractérisées par chromatographie d'exclusion stérique (Size exclusion chromatography ou SEC), les différentes espèces présentes au sein de la solution de brentuximab-védotine. Celles-ci ont ensuite été testées pour leur capacité de liaison au FcRn. En effet, une modification de cette liaison pourrait avoir un impact sur la distribution, le métabolisme et l'élimination des ADC, entraînant une distribution différentielle du plasma vers l'espace interstitiel, voire une absence de transcytose-recyclage de certaines espèces.

L'étude de l'affinité au FcRn est une étape importante dans le développement d'un anticorps, ou de toute molécule contenant une portion Fc. De nombreuses techniques existent, depuis l'ELISA jusqu'au modèle animal transgénique surexprimant le FcRn humain. Ces techniques présentent toutes des avantages et des inconvénients, notamment du fait de leur plus ou moins grand éloignement de conditions physiologiques, et jusqu'ici, aucune ne s'est avérée totalement prédictive de la pharmacocinétique chez l'Homme. Nous avons choisi d'utiliser deux techniques d'analyse de la liaison au FcRn. La résonance plasmonique de surface, ou surface plasmon resonance (SPR), qui est une technique qui permet la mesure de constantes d'affinités entre deux protéines dont une est immobilisée sur une puce d'or, ici le hFcRn, tandis que l'autre passe sur cette surface, véhiculée dans une phase mobile. Nous avons complété cette analyse par une technique en surface cellulaire, à l'aide de cellules Jurkat transfectées par du hFcRn. Ce récepteur est normalement intracellulaire, rendant son accès difficile. Son internalisation est médiée par une séquence-signal contenue dans sa portion intracytoplasmique. La délétion de ce motif par ingénierie moléculaire permet d'obtenir un FcRn qui reste exprimé à la membrane de la cellule. Le test est effectué en compétition entre l'ADC et un anticorps couplé à un fluorophore. L'anticorps fluorescent est présent à concentration constante dans le milieu réactionnel, et des concentrations croissantes en ADC sont appliquées. L'anticorps fluorescent se trouve plus ou moins déplacé du FcRn à la surface des cellules, et l'intensité de fluorescence va donc décroître avec l'augmentation de la concentration en ADC. Les espèces de DAR 0, 2, 4, 6 et 8 purifiées en HIC sont toutes testées en SPR et en cytométrie en flux. Cette dernière est plus proche de la physiologie, puisque le FcRn n'est plus porté par une surface rigide, mais enchâssé dans une membrane phospholipidique, qui est une surface chargée exerçant des forces attractives ou répulsives à l'égard de l'anticorps au cours de sa fixation. L'inconvénient majeur de la compétition par

cytométrie en flux est de ne permettre qu'une lecture ponctuelle à pH6, puisque l'anticorps fluorescent ne se lie pas au FcRn à pH neutre.

Increment in Drug Loading on an Antibody–Drug Conjugate Increases Its Binding to the Human Neonatal Fc Receptor *in Vitro*

Guillaume Brachet,^{†,‡} Renaud Respaud,^{‡,§} Christophe Arnoult,^{||} Corinne Henriquet,[⊥] Christine Dhommée,^{||} Marie-Claude Viaud-Massuard,[#] Nathalie Heuze-Vourc'h,[¶] Nicolas Joubert,[#] Martine Pugnière,[⊥] and Valérie Gouilleux-Gruart^{*,†}

[†]CNRS, GICC UMR 7292, CHRU de Tours, Service d'Immunologie, Université François Rabelais de Tours, Tours, France

[§]CNRS, GICC UMR 7292, CHRU de Tours, Service de Pharmacie, Université François-Rabelais de Tours, Tours, France

^{||}CNRS, GICC UMR 7292, Université François Rabelais de Tours, Tours, France

[⊥]IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM, U1194, Université Montpellier, ICM Institut Régional du Cancer, Montpellier, F-34090 France

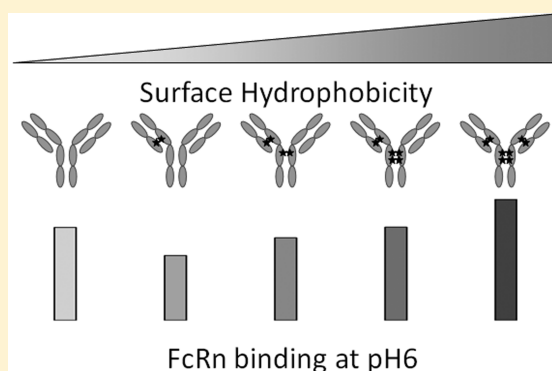
[#]CNRS, GICC UMR 7292, Université François Rabelais de Tours, Tours, France

[¶]INSERM U1100, Université François Rabelais de Tours, Tours, France

Supporting Information

ABSTRACT: Antibody–drug conjugates, such as brentuximab vedotin (BTXv), are an innovative category of monoclonal antibodies. BTXv is bioconjugated via the chemical reduction of cysteine residues involved in disulfide bonds. Species of BTXv containing zero, two, four, six, or eight vedotin molecules per antibody coexist in the stock solution. We investigated the influence of drug loading on the binding of the antibody to FcRn, a major determinant of antibody pharmacokinetics in humans. We developed a hydrophobic interaction chromatography (HIC) method for separating the different species present in the stock solution of BTXv, and we purified and characterized the collected species before use. We assessed the binding of these different species to FcRn in a cellular assay based on flow cytometry and surface plasmon resonance. HIC separated the different species of BTXv and allowed their collection at adequate levels of purity. Physicochemical characterization showed that species with higher levels of drug loading tended to form more aggregates. FcRn binding assays showed that the most conjugated species, particularly those with saturated loading, interacted more strongly than unconjugated BTXv with the FcRn.

KEYWORDS: antibody–drug conjugate, drug-to-antibody ratio, FcRn, flow cytometry, surface plasmon resonance, hydrophobic interaction chromatography



■ INTRODUCTION

Therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) have proved a major breakthrough in cancer treatment, greatly improving the prognosis of certain types of tumors.^{1,2} Antibody–drug conjugates (ADC) are a particularly important advance, because they make it possible to target cell populations specifically with powerful cytotoxic drugs that would be too toxic if delivered by the systemic route.³ Moreover, these new biomolecules are highly effective against heterogeneous tumors because the cytotoxic drug diffuses locally after controlled release, causing a bystander killing effect.⁴

Two technologies were used to load drugs onto antibodies for the ADCs that have received marketing authorizations so far. In both cases, the average number of drug molecules per antibody is described as the drug-to-antibody ratio (DAR). The first of these technologies, lysine bioconjugation, makes use of

the primary amines of the lysine residues exposed at the surface of the antibody. The result is a highly heterogeneous cocktail of ADCs with a drug payload ranging from zero to about six molecules bound to about 40 potentially accessible sites, with a mean DAR of 3.5 for trastuzumab–emtansine or Kadcyla.⁵ In lysine-conjugated ADCs, bioconjugation occurs on the solvent-accessible surface of the antibody, increasing the risk of nonspecific interactions with Fc receptors.

The second technology, cysteine bioconjugation, involves chemical reduction of the four interchain disulfide bonds of IgG, to allow conjugation on the eight exposed thiol groups. Zero to eight drug molecules are loaded, two by two, onto the

Received: January 29, 2016

Accepted: February 22, 2016



eight available sites.⁶ This method was used to produce brentuximab vedotin (BTXv) or Adcetris, an anti-CD30 ADC approved by the Food and Drug Administration in 2011 for the treatment of CD30-positive tumors, such as certain Hodgkin lymphomas and some large-cell anaplastic lymphomas.⁷ ADCs are very effective, despite their highly heterogeneous composition.^{8,9} For example, Adcetris contains species with DARs of zero to eight, with a mean value of four.⁸ This heterogeneity seriously hampers attempts to increase ADC efficiency.^{6,9–13} Indeed, drug loading can affect the properties of an ADC by reducing the interchain disulfide bonds, and because the cytotoxic agents increase the weight of the molecule and cause steric hindrance between the various chains of the antibody. These modifications can alter the overall physicochemical stability of the molecule, either by weakening the interactions maintaining antibody integrity or by altering interchain distance. Adem et al. showed that the physicochemical stability of an IgG1 subjected to cysteine bioconjugation was lower for high payloads.¹¹ The biological properties of ADCs can also be affected by physicochemical changes to the IgG occurring during conjugation. Acchione et al. studied the effect of DAR on antibody–antigen affinity and showed no difference between the various species of conjugated antibody.¹⁴ However, pharmacokinetic studies in murine models showed that the DAR affected both the clinical tolerance and clearance from the plasma of ADCs.^{15,16} Indeed, species with DARs of 6 and 8, which had higher levels of antitumor activity than species with DARs of 4 or less *in vitro*, were also more toxic in mice and were more rapidly cleared (species with a DAR of 8 were removed three times more rapidly than species with a DAR of 4).¹⁵ However, this model may not be applicable to humans, because the pattern of expression of the neonatal Fc Receptor (FcRn) differs between mice and humans.¹⁷ Several factors, including affinity for the FcRn, which is essential, determine the pharmacokinetics of IgG. The FcRn is a molecular transport system responsible for the long half-life of IgG molecules and their diffusion within tissues.^{18,19} FcRn binds IgG and albumin in acidic conditions (pH < 6.5) and releases them at neutral pH, allowing both recycling and transcytosis of endogenous IgG.^{20–23} Amino acid residues around the CH2–CH3 region of IgGs, particularly basic residues like the His310 in the CH2 domain and the His435 in the CH3 domain, are involved in the physiological interaction between IgG and FcRn.²⁴ Modification in the regions flanking these amino acids may therefore affect the affinity of IgGs to FcRn. Furthermore, modifications of the Fab arms may influence FcRn binding.²⁵ Wang et al. suggested that modifications of immunoglobulin tertiary structures accounted for changes in affinity to FcRn. The modification of residues lying between the various mAb chains may therefore affect FcRn binding. Here, we used BTXv as an example of a cysteine-linked ADC, to investigate the effect of DAR on the affinity of ADCs to FcRn.

We first developed a method for separating the different species present in the Adcetris stock solution. We then characterized these species and assessed their ability to bind FcRn. This study is the first to evaluate the binding of an ADC to human FcRn and to assess the effect of drug loading on it.

MATERIALS AND METHODS

mAbs. Commercially available stock solutions of BTXv (cysteine-linked IgG1 ADC, Takeda Pharmaceuticals, Puteaux, France), rituximab (MabThera, Roche, Neuilly, France), and

panitumumab (Vectibix, Amgen, Neuilly sur-Seine, France) were purchased.

Recombinant Human FcRn (Recombinant hFcRn). The human FcRn coding sequence (cDNA clone MGC:1506 IMAGE:3163446) minus its transmembrane and intracytoplasmic domain sequences was inserted into the pCMV6 Kan/Neo plasmid to obtain pCMV6hFcRn. A histidine tag was introduced into the plasmid to generate pCMV6hFcRn-His. The pCMV-SPORT6 plasmid encoding human beta-2 microglobulin (B2m, NM_004048.2) was obtained from OriGene (Rockville, Maryland). HEK293 cells were transfected with the two plasmids (pCMV6hFcRn-his and pCMV-SPORT6B2M) to produce hFcRn. Large-scale transient transfection was carried out in the FreeStyle™ MAX Expression System (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol, to produce the hFcRn-His fusion protein. Cell culture supernatants containing the secreted hFcRn-His fusion protein were harvested, filtered, and stored at –20 °C. Recombinant hFcRn was purified on nickel-IMAC resin (HisPur Ni-NTA chromatography cartridge, Thermoscientific, Waltham, MA) with an AKTA purifier.

Separation and Isolation of Individual DAR Species from the BTXv (Adcetris) Stock Solution. BTXv DAR species were separated with a Tosoh TSKgel butyl NPR 2.5 μ m 7.5 $\times$ 75 mm column (Tosoh, Tokyo, Japan) on a Waters Alliance e2695 HPLC system equipped with a Waters e2998 photodiode array detector and a Waters Fraction Collector III (Waters, Boulogne Billancourt, France).

The mobile phase was filtered (0.2 μ m) before use. A gradient of eluent A (50 mM sodium phosphate buffer, 1.5 M ammonium sulfate, pH 7) and eluent B (80% v/v 50 mM sodium phosphate pH 7 and 20% isopropyl alcohol), adapted from the protocol described by Ouyang et al., was established as follows: 100% to 20% eluent A over 45 min, then 20% A for 15 min and, finally, a return to 100% A over 1 min. We used a flow rate of 2 mL per minute throughout, and column temperature was maintained at 30 °C.²⁶ In total, we loaded 1 mg of BTXv sample onto the column for semipreparative hydrophobic interaction chromatography.

Fractions were collected at the maximum UV signal for 2 min per peak (4 mL). The fraction collector nozzle was rinsed for 1 min between peaks to minimize interpeak contamination. Fractions were collected in 5 mL of Protein LoBind Sterile Eppendorfs (ref 0030 108.302, Eppendorf), pooled in 20 mL of 9 kDa cutoff Pierce Concentrators (ref 87749, Thermo Scientific) and centrifuged three times at 3000 rpm (1100 g) for 45 min at +8 °C. The solvent was replaced with PBS (4 mM PBS Gibco pH 7.2, ref 70013016, Thermo Fisher) after the first centrifugation. The purified species were quantified with the protein measurement mode (ratio of the absorbances at 260 and 280 nm) of a Nanodrop 2000 spectrometer, and they were kept at +4 °C until their characterization or use for flow cytometry assays (performed within a day of purification).

Size Exclusion Chromatography with In-Line Multi-angle Laser Light Scattering and Refractive Index. Size exclusion chromatography (SEC) was performed on an Alliance e2695 (Waters) machine equipped with a Wyatt miniDawn Treos and Optilab T-rEx (Wyatt Technology Europe GmbH). A SHODEX KW803 column (300 mm $\times$ 7.8 mm) was used. For each sample, 50 μ g was injected onto the column and separated at a flow rate of 0.7 mL per minute. The elution buffer was PBS pH 7.2. UV detection was performed at 280 nm, with a PDA 2998 apparatus (Waters),

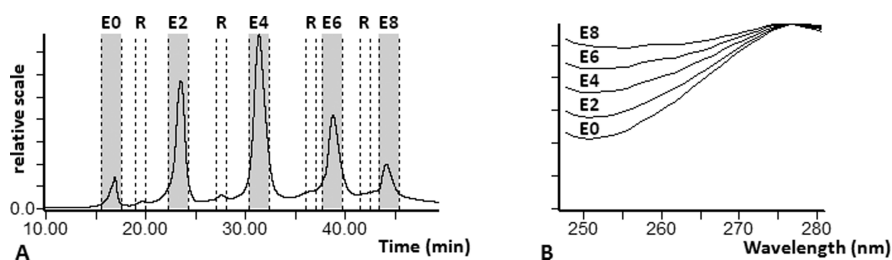


Figure 1. (A) UV chromatogram obtained from semipreparative hydrophobic interaction chromatography. Gray lines show the collected fractions, E0 to E8, and “R” illustrates the nozzle rinsing between fractions. The nozzle was also systematically rinsed at the start of each run. (B) UV spectra from the photodiode array during separation. From bottom to top, spectra at 16, 22, 30, 37, and 42 min, corresponding respectively to a drug to antibody ratio of 0 (E0), 2 (E2), 4 (E4), 6 (E6), and 8 (E8). Fractions were characterized from the A_{248}/A_{280} UV absorbance ratio.

whereas MALLS detection was performed with a three-angle (43.6° ; 90.0° ; 136.4°) miniDawn Treos detector (Wyatt Technology Europe) operating with a 60 mW solid-state laser at 658 nm. The molecular weights corresponding to the antibody peaks were calculated with Astra software version 6.0.6 (Wyatt Technology Europe). A differential index of refraction or dn/dc of 0.185 (mL/g) and a second virial coefficient of 0 were used. Molecular weights were calculated with the Zimm equation. Results are expressed as the percentages of monomers and of other species.

Analytical Hydrophobic Interaction Chromatography.

After concentration and buffer exchange, the fractions were injected onto the analytical HIC column (Tosoh TSKgel butyl NPR 2.5 μ m 4.6×100 mm) and subjected to the same mobile-phase gradient as for semipreparative HIC, at a flow rate of 0.6 mL per minute, to confirm that the correct peak had been collected. Purity was assessed by calculating the ratio of the area under the curve at 280 nm for the peak of interest relative to the total area under the curve, expressed as a percentage.

Surface Plasmon Resonance. Real-time SPR analyses were performed on a Bia3000 apparatus (GE Healthcare, Uppsala Sweden) at 25°C , at a flow rate of 50 μ L per minute, in 10 mM PBS buffer pH 6 and 0.005% Polysorbate 20 surfactant (GE Healthcare). FcRn was covalently immobilized on a CM5 sensor chip (GE Healthcare) at relatively low density (less than 550 RU), after EDC/NHS (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide/*N*-hydroxysuccinimide) activation, according to the manufacturer's instructions. Kinetic analyses of the different fractions of BTXv were performed using seven concentrations ranging from 4.6 nM to 300 nM. Each concentration of BTXv was simultaneously injected over 180 s into an FcRn-coated flowcell and into a control flowcell without FcRn. After 400 s of dissociation with running buffer, the sensor surfaces were regenerated with two pulses of PBS buffer at pH 7.4. After subtraction of the control, resulting sensorgrams were fitted to a two-site parallel binding model (BiaEvaluation 4.2, GE Healthcare) to calculate the kinetic parameters. The stability of the coated surface was checked by injecting rituximab (50 nM) as a positive control at the beginning and the end of every BTXv kinetic analysis.

Cells. Jurkat cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, TIB-152). Truncated FcRn (Δ FcRn)-expressing Jurkat cells were obtained by stably transfecting Jurkat cells with a plasmid containing the FCGRT coding sequence minus 99 nucleotides corresponding to the 33 amino acids at the carboxyl terminus of the protein.²⁷ This deletion leads to the expression of the FcRn at the membrane.²⁸ The cell lines were maintained in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal

calf serum and 2 mM L-glutamine. G418 (1 mg/mL) was added for the Δ FcRn Jurkat cell line only.

Flow Cytometry. In flow cytometry experiments, both wild-type Jurkat cells and transfected Jurkat cells were separated from dead cells by centrifugation on a density gradient (ref CMSMSL01, Eurobio). Cell counts were adjusted to 2×10^6 cells/mL, and the cell lines were mixed in a 1:1 ratio in HBSS buffer. Rituximab was labeled with Alexa Fluor 488 (RTX*⁴⁸⁸) according to the manufacturer's recommendations (ref A10235, Alexa Fluor 488 labeling kit, Fisher Scientific). RTX*⁴⁸⁸ (4.73 mol Alexa Fluor 488/mol) was used at a concentration of 1 μ g/mL in all cellular experiments, in competition with various mAbs diluted to 0, 10, 50, and 200 μ g/mL in HBSS buffered at pH 6 with MES (ref M1317, Sigma-Aldrich). The mAb dilutions were incubated with the Jurkat cell mixture (10^5 cells) for 1 h at 4°C and then washed with HBSS/MES pH 6 buffered medium and immediately processed on a 2-laser-8-color Beckman Coulter Gallios flow cytometer. Ten thousand events were acquired per condition by flow cytometry, with Gallios List Mode Data Acquisition and Analysis Software version 1.2. Raw data from all samples were analyzed with Kaluza Analysis Software v. 1.1.11052.10190 (Beckman Coulter, Villepinte, France). Gating on living cells was achieved on the basis of forward scatter–side scatter plots. The difference in mean fluorescence (Δ mean fluorescence) between the wild-type Jurkat cells, used as a measurement of nonspecific fluorescence, and Δ FcRn cells at a given concentration of antibody (C_n) on the mean fluorescence histograms was converted into a percentage binding inhibition and normalized relative to that for rituximab, as follows:

$$\text{inhibition \% } (C_n) = \frac{\left[1 - \frac{\Delta \text{mean fluorescence antibody } (C_n)}{\Delta \text{mean fluorescence antibody } (C_0)} \right]}{\left[1 - \frac{\Delta \text{mean fluorescence rituximab } (C_n)}{\Delta \text{mean fluorescence rituximab } (C_0)} \right]} \times 100$$

The Δ mean fluorescence at C_0 corresponds to RTX*⁴⁸⁸ alone. This percentage binding inhibition normalized relative to rituximab is referred to as the “percent inhibition” in the text.

Statistical Analysis. For analysis of the flow cytometry binding competition assay, we used a Mann–Whitney test to compare the values for percent inhibition for each control mAb and BTXv fraction. We considered *p*-values of 0.05 or below (two-tailed tests) to be statistically significant. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 5.

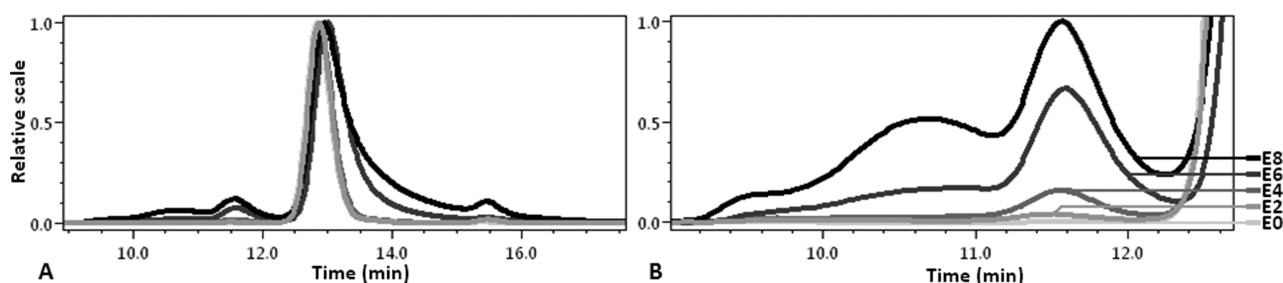


Figure 2. Size exclusion chromatograms of the purified fractions. (A) Species with lower drug to antibody ratios (E0, E2, and E4) interacted less with the column, and were therefore eluted earlier. The peak at about 15.5 min corresponds to low molecular weight species. (B) Oligomers: Fractions E0, E2, and E4 contain dimers, but no detectable larger oligomers. Fractions E6 and E8 contain both dimers and oligomers.

RESULTS

Purification of BTXv Fractions and Analysis by Chromatography. We used semipreparative HIC to separate the five main populations of BTXv: DAR 0 (E0), DAR 2 (E2), DAR 4 (E4), DAR 6 (E6), and DAR 8 (E8) (Figure 1). Sixty-five injections of 1 mg each were performed. The overall mean recovery was 48%. The proportions of the various DAR species in the stock solution were as follows: 5.8%, 27.5%, 35.5%, 22.0%, and 9.2% for E0, E2, E4, E6, and E8, respectively.

We assessed the aggregation of the stock solution and of the various DAR species by SEC coupled to in-line multiangle light scattering and refractometry (MALLS-RI). The chromatograms obtained are displayed in Figure 2. Aggregation is expressed as a percentage of the total mass of antibody injected and was 2.7% (m/m) for the stock solution: 2.4% dimers and 0.3% oligomers. We used the same techniques to analyze the purified species (Table 1). Dimerization levels ranged from 0.1% (E0) to 6.5%

that MALLS-RI gave a better assessment of molecular mass for lightly loaded species. The amount of aggregation increased with DAR, whereas the purity of the isolated species, as assessed by analytical HIC (Figure 3), decreased. Purity was between 77.46% and 99.26% and was considered sufficient for subsequent *in vitro* testing.

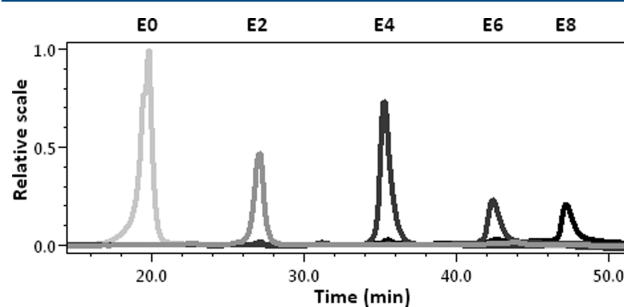


Figure 3. UV chromatogram of the analytical HIC for the collected species. Retention times were as follows: 19, 27, 36, 43, and 47 min for E0, E2, E4, E6, and E8, respectively. Purity was assessed by determining the area under the curve ratio. E8 was contaminated mostly with E4 and E6.

Table 1. Physicochemical Characterization of the Collected Species of Brentuximab–Vedotin^a

species	E0	E2	E4	E6	E8
drug to antibody ratio	0	2	4	6	8
concn (mg/mL)	0.360	0.562	0.900	0.587	0.600
calcd mass from MALLS-RI (kDa)	148	151	154	157	171
mass from native MS (Debaene et al. ¹²)	145.9	148.5	151.2	153.8	156.5
dimers (%)	0.10	0.30	1.80	6.50	5.80
oligomers (%)	None	None	None	0.60	2.80
purity (AUC ratio %)	99.26	89.95	94.23	87.86	77.46

^aFractions are named after the drug to antibody ratio.

(E6). The percent dimerization was substantially higher for E6 and E8 (6.5% and 5.8%, respectively) than for the other species ($\leq 1.8\%$). Moreover, on SEC, for the E6 and E8 populations, we observed a new peak in the UV signal corresponding to oligomers with an estimated size of more than 1200 kDa. These oligomers accounted for 0.6% of the injected mass of the E6 fraction and 2.8% of that of E8. We also observed a peak corresponding to low molecular weight species that we were unable to quantify (Figure S1). These two species also showed a much bigger monomer peak tailing (Figure 2), due to hydrophobic interactions with the stationary phase, which could be eliminated by adding 15% isopropyl alcohol to the mobile phase (Figure S2).

We estimated the mass of each subspecies by MALLS-RI. The results are shown in Table 1, and the chromatograms including MALLS traces are shown in Figure S1.¹² We found

Analysis of FcRn Binding by Flow Cytometry. The FcRn is involved in antibody pharmacokinetics. It binds to IgG isotypes with different affinities.²⁹ We investigated the effect of drug loading on the ability of BTXv to bind to FcRn, in Jurkat cells expressing a truncated form of FcRn (Δ FcRn) lacking the C-terminal dileucine internalization motif, resulting in the exposure of the protein at the cell surface.²⁸ We developed a competition assay, which we performed at pH 6 with rituximab labeled with the Alexa Fluor 488 fluorophore (RTX*⁴⁸⁸). We also performed this assay at pH 7.4, to assess its specificity. The pooled results are shown in Figure 4, but separate results, by concentration, are also presented in Figure S3. No FcRn binding was detected at neutral pH, for any of the DAR species (data not shown). We investigated the levels of CD30 on Jurkat cells, to evaluate Fab–mAb binding. We found that the density of CD30 was very low on Jurkat cells, with saturation observed at 1 μ g/mL BTXv (data not shown), a concentration of antibody one-tenth the first concentration used in the FcRn competition test. We calibrated the test, using unlabeled IgG1 rituximab, which displayed strong binding to FcRn, and IgG2 panitumumab, which displayed weak binding. We mixed Δ FcRn-transfected and untransfected Jurkat cells, to evaluate the nonspecific binding of mAbs (Figure 4A). We assessed the extent to which each fraction competed with RTX*⁴⁸⁸ for binding to the receptor and the percent inhibition of RTX*⁴⁸⁸

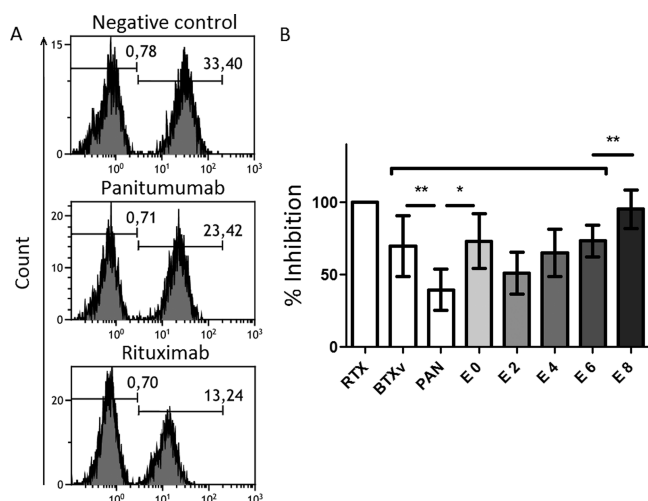


Figure 4. Flow cytometry analysis of mAb binding to membrane-expressed FcRn. Jurkat and Jurkat Δ hFcRn cells (v/v mix) were incubated at pH 6 with 1 μ g/mL Alexa Fluor 488-labeled rituximab (RTX*⁴⁸⁸) in the presence of unlabeled therapeutic mAbs, including brentuximab–vedotin (BTXv) species. (A) Representative flow cytometry histograms of wild-type and FcRn Jurkat cells (left and right in the charts, respectively), with 1 μ g/mL RTX*⁴⁸⁸ and no competitor unlabeled mAb (top), or with 200 μ g/mL panitumumab (middle) or with rituximab (bottom). Wild-type Jurkat cells were used as a negative control. (B) Flow cytometry experiments with BTXv, panitumumab, rituximab, and BTXv fractions tested at concentrations of 0, 10, 50, and 200 μ g/mL. Rituximab was chosen as the reference molecule (100% binding). Inhibition values were pooled for all concentrations (10, 50, and 200 μ g/mL) and are displayed as histograms. P-values are represented as follows: * for $p < 0.05$ and ** for $p < 0.01$.

binding (Figure 4B). Unlabeled rituximab binding levels were arbitrarily set at 100% (positive control). The mean percent inhibition values (standard deviation in brackets) were 39.58% (14.2) for panitumumab, 69.78% (21.1) for BTXv stock solution, 73.17% (18.96) for E0, 51.08% (14.34) for E2, 65.09% (16.19) for E4, 73.39% (10.96) for E6, and 95.24% (13.22) for E8. The percent inhibition achieved differed significantly between the stock solution of BTXv and panitumumab ($p < 0.01$). The inhibitory capacities of the E0, E2, E4, and E6 species were similar to that of BTXv stock solution. Only E8 competed significantly more strongly with RTX*⁴⁸⁸ than any of the other species for binding to FcRn.

SPR Analysis of FcRn Binding. Our cellular assay provides an assessment of IgG binding to a membrane-bound FcRn, but it can provide measurements only of long-term binding parameters. We therefore used SPR to analyze the binding of BTXv DAR species to FcRn further. We performed kinetic analyses of the different species, E0, E2, E4, E6, and E8, for

increasing concentrations (4.6 nM to 300 nM) on immobilized FcRn in the same conditions, at pH 6 (Figure S4). The kinetic data were evaluated using a two-site fitting model, and the numeric values are given in Table 2. Affinity and kinetic constants only showed small changes in terms of value. The total Rmax increased from E0 to E8, indicating an increase in site occupancy from 6% to 8% respectively. No association was observed between the various DAR species and hFcRn at pH 7.4 (data not shown).

DISCUSSION

IgG-type therapeutic mAbs have a longer half-life than other types of antibodies, making it possible to leave longer intervals between infusions, thereby improving patient comfort. This longer half-life results from the unique pharmacokinetics of these molecules, due to FcRn-mediated recycling and transcytosis functions.²² Any substantial modification of an antibody may affect its affinity for FcRn and, thus, its pharmacokinetic properties.³⁰ The commercially available solution of BTXv is heterogeneous because it contains five major species, which can be separated by HIC. A few studies have investigated the impact of drug loading on antibodies obtained by cysteine conjugation, and various methods were used to obtain pure DAR species solutions in these studies. For example, Hamblett et al. chose to purify E2 and E4 by HIC-based separation, but they constructed E8 *de novo*, by conjugating an antibody to the linker-drug moiety.¹⁵ In other studies, all the fractions were treated in the same way, to maximize the comparability of the purified fractions.³¹ We adopted this strategy and used semipreparative HIC to purify our DAR species.

We characterized various DAR species of BTXv by analytical HIC and SEC, with in-line detectors. We used multiangle laser light scattering and refractometry (MALLS-RI) to calculate the mean size of each species. MALLS-RI is less accurate than native mass spectrometry, but, for E0 to E6, the relative error remained within the 1.7 to 2.1% range. The error was systematically higher for E8. However, this result confirmed that the species collected were as expected. We systematically assessed the purity and aggregation levels for each collected species, because aggregation may have an impact on functional tests due to the creation of an avidity phenomenon influencing the affinity of IgG to the receptor. Indeed, aggregation has been shown to be correlated with DAR, ionic strength, and exposure to high temperature.¹¹ One probable explanation for this finding is that the hydrophobic profile of vedotin, like that of other linker payloads that are or have been used on ADCs, is substantially different from that of naked antibodies, with the conjugation of small hydrophobic molecules increasing the amounts of aggregated forms in the solution.^{10,32} We therefore ensured that the fraction collector and centrifuge were cooled and we replaced the HIC mobile phase with PBS, which has a

Table 2. Surface Plasmon Resonance Data^a

	ka1 (1/M·s)	kd1 (1/s)	ka2 (1/M·s)	kd2 (1/s)	Rmax1 (RU)	Rmax2 (RU)	Rmax total	KD1 (M)	KD2 (M)	Chi2	SR (%) ^b
E0	1.36×10^5	0.0336	9.94×10^4	3.21×10^{-3}	68.4	27.2	95.6	2.47×10^{-7}	3.23×10^{-8}	1.11	6
E2	3.82×10^4	0.0249	1.24×10^5	1.84×10^{-3}	73.4	14	87.4	6.54×10^{-7}	1.48×10^{-8}	0.82	6
E4	6.82×10^4	0.0372	1.04×10^5	1.77×10^{-3}	74.6	19.8	94.4	5.46×10^{-7}	1.71×10^{-8}	1.23	6
E6	8.00×10^4	0.0329	1.07×10^5	1.66×10^{-3}	76.7	33.6	110.3	4.12×10^{-7}	1.55×10^{-8}	2.66	7
E8	7.01×10^4	0.0244	8.10×10^4	1.30×10^{-3}	74	51.4	125.4	3.48×10^{-7}	1.61×10^{-8}	3.65	8

^aA two-site model was used for parameter calculation. ^bStoichiometric ratio SR = exp Rmax/calc Rmax, calc Rmax = Ru immobilized level $\times$ molecular weight (MW) BTXv/MW FcRn, with MW FcRn = 49.7 kDa. MW BTXv are given in Table 1.

low ionic strength, within a few hours of semipreparative HIC. For purified DAR species, aggregation increased with DAR. For E6 and E8, aggregates accounted for up to 6% of the total mass. We checked whether these aggregates were inherent to the DAR species considered or whether they were formed due to the highly ionic conditions to which they were exposed during purification. SEC indicated that the proportion of dimers in the Adcetris solution was 2.4%. E0, E2, E4, E6, and E8 accounted for 5.8, 27.5, 35.5, 22.0, and 9.2% of the Adcetris mixture, respectively. Dimers accounted for 0.1, 0.3, 1.8, 6.5, and 5.8% of the total mass injected during SEC for E0, E2, E4, E6, and E8 respectively. By multiplying the proportion of dimers for each DAR species by the proportion of that species in the commercial solution, we found that the expected overall percentage of dimers would be 2.69%. Repeating the same calculation for higher order aggregates, which accounted for 0.3% of the Adcetris solution, we would expect to observe 0.38% oligomers. This suggests that the proportion of aggregates observed after HIC-based purification is inherent to the species itself rather than the conditions to which it has been exposed.

Purity tended to decrease as DAR increased. This may have been due to a problem during fraction collection, although the fraction collector nozzle was systematically rinsed between fractions. Another potential explanation is spontaneous partial hydrolysis of the linker, which is thought to occur in plasma.^{33,34}

We set up a cellular binding assay using rituximab (IgG1) as a strong positive control and panitumumab (IgG2) as a weak positive control, since IgG2 are known for having a weaker affinity for FcRn. We checked that the result depended essentially on the mAb, and little on concentration. A number of controls were used to evaluate nonspecific binding, particularly that occurring at pH 7.4. No binding was detected at pH 7.4 in flow cytometry or following an increase in pH from 6 to 7.4 in SPR. Thus, bioconjugation of brentuximab with vedotin does not result in FcRn binding at neutral pH.

We found that both commercial BTXv and the various DAR species competed moderately strongly with RTX*^{AF488} for binding to FcRn. The ability to compete with RTX*^{AF488} differed between the DAR species. The unconjugated BTXv, E0, tended to behave like the control IgG1, rituximab, although the 95% confidence interval of the percent inhibition value did not include 100% (53.25; 93.11). E4 and E6 behaved similarly, and like BTXv. This was expected because these species accounted for more than 50% of the stock solution. The percent inhibition for E2 was significantly different from those of E0, E8, and BTXv. Interestingly, the percent inhibition of E2 was lower than that of E0, but the percent inhibition increased with increasing DAR, from E4 onward. Indeed, E8 had a higher percent inhibition than E0, which was unexpected because we had thought that steric hindrance between the chains of the antibody caused by the addition of vedotin would compromise tertiary structure and, therefore, affinity to FcRn.

We therefore developed an SPR assay to check our results on all five DAR species collected. The impact of drug loading was assessed by comparing the kinetics of the response at various concentrations of the naked antibody E0, and the various conjugated species, E2 to E8. In our conditions, we observed no overstoichiometry, which might have occurred with aggregates. However, the R_{max} for E8 (stoichiometric ratio 8%) was higher than that of E0 (stoichiometric ratio 6%), which means that E8 shows an increased site occupancy on FcRn compared to

species with fewer vedotin. The dissociation equilibrium constant (K_D) and constant rates (k_a, k_d) were not significantly different for the various species.

Pharmacokinetic studies performed in mice by Hamblett et al. showed that the clearance rate of E8 was three times higher than that of E4.¹⁵ E8 was also more toxic and had a higher distribution volume than E4, although the two species had similar half-lives.¹⁵ A high clearance rate may reflect a high antigen burden, a weak affinity for FcRn at pH 6, a high affinity for FcRn at pH 7.4, or another source of elimination. Antigen-mediated clearance is ruled out since BTXv does not bind rodent CD30.³⁵ We show that E8 has a higher affinity for FcRn at pH 6 but that no association was detectable at pH 7.4. Ward et al. pointed out that antibody elimination *in vivo* involves several mechanisms, such as FcRn recycling, endosome sorting, immune complex formation, and Fcγ receptor cooperation.³⁶ The higher rates of clearance observed for highly loaded species in the study by Hamblett et al. may therefore be due to factors other than FcRn-related elimination, such as increased uptake by the reticuloendothelial system cells, as suggested by Lyon et al.¹⁶

Other studies involving the interaction of protein G or protein A with a biotinylated antibody as a surrogate for the ADC–FcRn interaction have suggested that FcRn binding is not modified by antibody conjugates.¹⁴ We decided to use a model that was as close to physiological conditions as possible to determine whether a linker and drug approved for therapy impaired the binding of antibody to FcRn anchored in a membrane. We showed that the DAR of an ADC species influenced antibody binding to FcRn. Indeed, the presence of vedotin between the various chains of the antibody abolished some or all of the covalent bonds holding the antibody together. Moreover, two entities of vedotin are conjugated in the place of a single disulfide bond, modifying the steric hindrance between antibody chains. For example, for E2, the two vedotin adducts may be linked between a light chain and a heavy chain or between two heavy chains. This adds yet another level of heterogeneity, which we did not study here because the available techniques are unable to collect the different subspecies in sufficient quantities for the various FcRn binding assays. However, two subspecies with the same DAR may bind FcRn with different affinities, because the site of steric hindrance differs between them.

In vivo studies of BTXv have shown that a DAR of 4 yields the best toxicity–efficacy balance.¹⁵ This goal is achieved by manufacturing BTXv as a mixture of E0 to E8. New technologies have made it possible to control the DAR during the manufacturing process. These technologies include glycoengineering,³⁷ bacterial transglutaminase conjugation,³⁸ Thiomab technology, and controlled cysteine conjugation technologies, such as interchain covalent bond-restoring technologies.^{31,39} Some of these technologies have already been used to produce ADCs with improved pharmacokinetics in mice.^{31,38} Bryant et al. used ELISA to investigate the impact of their thiol rebridging conjugation technology on FcRn binding. FcRn binding did not seem to be impaired by drug loading. However, no weak or negative control was used to check whether the absence of difference observed was due to a real lack of difference or to the assay having insufficient discriminatory power.³¹ Nevertheless, this type of technology makes it possible to obtain homogeneous solutions with an optimal DAR, and its use to replace first-generation conjugating technologies should be considered.

In summary, our results show that, in BTXv, species with a higher DAR display greater binding to FcRn. They also highlight the complexity of ADC elimination, and the need to investigate these mechanisms further *in vitro* to improve our understanding of the behavior of ADCs *in vivo* and to meet the requirements of quality-by-design for the next generation of ADCs.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00082.

Size exclusion chromatograms, flow cytometry experiments, and sensorgrams (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: valerie.gouilleux@univ-tours.fr. Phone: +33234378913. Fax: +33234389412.

Author Contributions

†G.B. and R.R. contributed equally to this work.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This publication was funded with support from the French National Research Agency under the program “Investissements d’avenir” Grant Agreement LabEx MAbImprove: ANR-10-LABX-53. The authors would like to thank the Hospital Pharmacy of the Tours Teaching Hospital for providing us with leftover Adcetris. The authors would also like to thank Marie Brachet-Botineau for proofreading this text.

■ ABBREVIATIONS USED

ADC, antibody–drug conjugate; BTXv, brentuximab-vedotin; DAR, drug-to-antibody ratio; E0, species with no linked vedotin; E2, species with 2 mol of vedotin/mol; E4, species with 4 mol of vedotin/mol; E6, species with 6 mol of vedotin/mol; E8, species with 8 mol of vedotin/mol; FcRn, Fc fragment neonatal receptor; HBSS, Hanks balanced salt solution; HIC, hydrophobic interaction chromatography; IgG, immunoglobulin G; Jkt, Jurkat cells; mAb, monoclonal antibody; MALLS, multiangle laser light scattering; RPMI, Roswell Park Memorial Institute; RTX, rituximab; RI, refractive index; SEC, size exclusion chromatography; SPR, surface plasmon resonance

■ REFERENCES

- (1) Grillo-Lopez, A. J.; Dallaire, B. K.; McClure, A.; Weaver, R.; Varns, C.; Wei, A.; Allen, R.; Lee, D.; Shen BSP, D.; Leonard BSP, J.; et al. Monoclonal Antibodies: A New Era in the Treatment of Non-Hodgkins Lymphoma. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2001**, *2*, 301–11.
- (2) Schmidt, K. V.; Wood, B. A. Trends in cancer therapy: role of monoclonal antibodies. *Semin Oncol Nurs* **2003**, *19*, 169–79.
- (3) Davis, M. T.; Preston, J. F. A conjugate of alpha-amanitin and monoclonal immunoglobulin G to Thy 1.2 antigen is selectively toxic to T lymphoma cells. *Science* **1981**, *213*, 1385–8.
- (4) Okeley, N. M.; Miyamoto, J. B.; Zhang, X.; Sanderson, R. J.; Benjamin, D. R.; Sievers, E. L.; Senter, P. D.; Alley, S. C. Intracellular activation of SGN-35, a potent anti-CD30 antibody-drug conjugate. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 888–97.
- (5) Jumbe, N. L.; Xin, Y.; Leipold, D. D.; Crocker, L.; Dugger, D.; Mai, E.; Sliwowski, M. X.; Fielder, P. J.; Tibbitts, J. Modeling the

efficacy of trastuzumab-DM1, an antibody drug conjugate, in mice. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* **2010**, *37*, 221–42.

(6) Wagner-Rousset, E.; Janin-Bussat, M.-C.; Colas, O.; Excoffier, M.; Ayoub, D.; Haeuw, J.-F.; Rilatt, I.; Perez, M.; Corvaia, N.; Beck, A. Antibody-drug conjugate model fast characterization by LC-MS following IdeS proteolytic digestion. *mAbs* **2014**, *6*, 173–84.

(7) de Claro, R. A.; McGinn, K.; Kwitkowski, V.; Bullock, J.; Khandelwal, A.; Habtemariam, B.; Ouyang, Y.; Saber, H.; Lee, K.; Koti, K.; et al. U.S. Food and Drug Administration approval summary: brentuximab vedotin for the treatment of relapsed Hodgkin lymphoma or relapsed systemic anaplastic large-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 5845–9.

(8) Adcetris, INN-brentuximab vedotin - WC500135054.pdf [Internet]. [cited 2015 Jun 18]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002455/WC500135054.pdf.

(9) Lazar, A. C.; Wang, L.; Blättler, W. A.; Amphlett, G.; Lambert, J. M.; Zhang, W. Analysis of the composition of immunoconjugates using size-exclusion chromatography coupled to mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 1806–14.

(10) Wakankar, A.; Chen, Y.; Gokarn, Y.; Jacobson, F. S. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. *mAbs* **2011**, *3*, 161–72.

(11) Adem, Y. T.; Schwarz, K. A.; Duenas, E.; Patapoff, T. W.; Galush, W. J.; Esue, O. Auristatin Antibody Drug Conjugate Physical Instability and the Role of Drug Payload. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 656–64.

(12) Debaene, F.; Bœuf, A.; Wagner-Rousset, E.; Colas, O.; Ayoub, D.; Corvaia, N.; Van Dorsselaer, A.; Beck, A.; Cianfèrani, S. Innovative Native MS Methodologies for Antibody Drug Conjugate Characterization: High Resolution Native MS and IM-MS for Average DAR and DAR Distribution Assessment. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 10674–83.

(13) Marcoux, J.; Champion, T.; Colas, O.; Wagner-Rousset, E.; Corvaia, N.; Van Dorsselaer, A.; Beck, A.; Cianfèrani, S. Native mass spectrometry and ion mobility characterization of trastuzumab emtansine, a lysine-linked antibody drug conjugate. *Protein Sci.* **2015**, *24*, 1210.

(14) Acchione, M.; Kwon, H.; Jochheim, C. M.; Atkins, W. M. Impact of linker and conjugation chemistry on antigen binding, Fc receptor binding and thermal stability of model antibody-drug conjugates. *mAbs* **2012**, *4*, 362–72.

(15) Hamblett, K. J.; Senter, P. D.; Chace, D. F.; Sun, M. M. C.; Lenox, J.; Cervený, C. G.; Kissler, K. M.; Bernhardt, S. X.; Kopcha, A. K.; Zabinski, R. F.; et al. Effects of Drug Loading on the Antitumor Activity of a Monoclonal Antibody Drug Conjugate. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 7063–70.

(16) Lyon, R. P.; Bovee, T. D.; Doronina, S. O.; Burke, P. J.; Hunter, J. H.; Neff-LaFord, H. D.; Jonas, M.; Anderson, M. E.; Setter, J. R.; Senter, P. D. Reducing hydrophobicity of homogeneous antibody-drug conjugates improves pharmacokinetics and therapeutic index. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 733–5.

(17) Abdiche, Y. N.; Yeung, Y. A.; Chaparro-Riggers, J.; Barman, I.; Strop, P.; Chin, S. M.; Pham, A.; Bolton, G.; McDonough, D.; Lindquist, K.; et al. The neonatal Fc receptor (FcRn) binds independently to both sites of the IgG homodimer with identical affinity. *mAbs* **2015**, *7*, 331–43.

(18) Brambell, F. W.; Hemmings, W. A.; Morris, I. G. A Theoretical Model of Gamma-Globulin Catabolism. *Nature* **1964**, *203*, 1352.

(19) Antohe, F.; Rădulescu, L.; Gafencu, A.; Gheție, V.; Simionescu, M. Expression of functionally active FcRn and the differentiated bidirectional transport of IgG in human placental endothelial cells. *Hum. Immunol.* **2001**, *62*, 93–105.

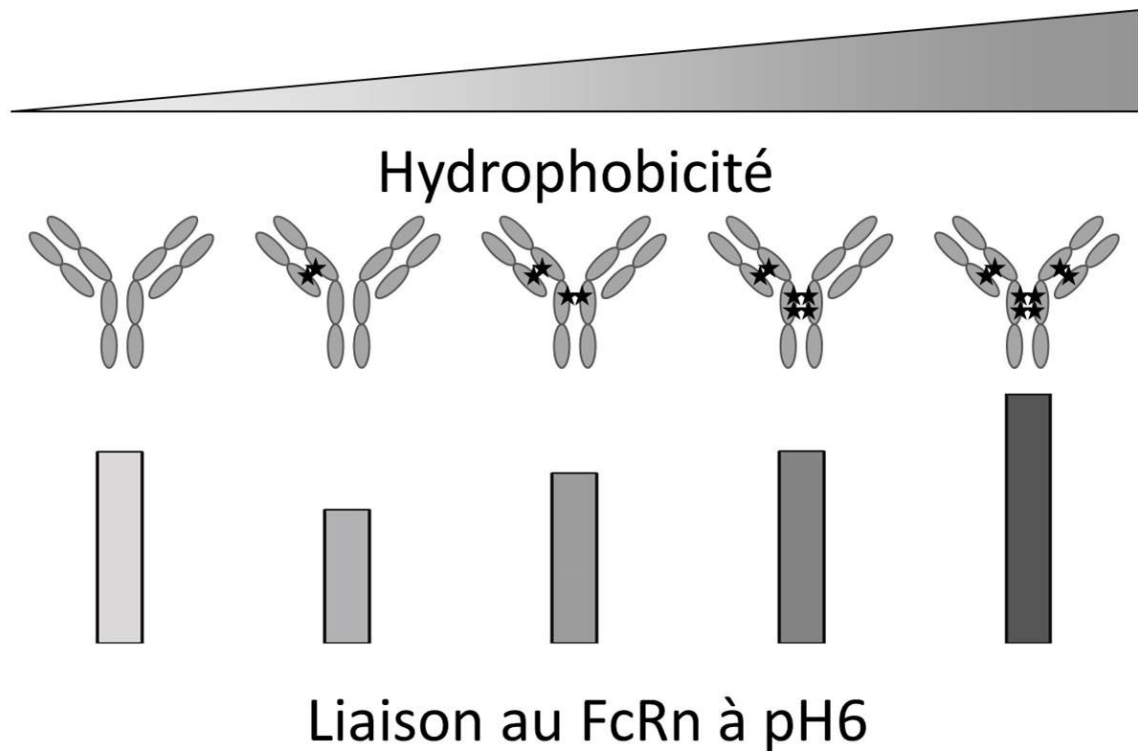
(20) Simister, N. E. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* **2003**, *21*, 3365–9.

(21) Chaudhury, C.; Brooks, C. L.; Carter, D. C.; Robinson, J. M.; Anderson, C. L. Albumin binding to FcRn: distinct from the FcRn-IgG interaction. *Biochemistry* **2006**, *45*, 4983–90.

(22) Roopenian, D. C.; Akilesh, S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 715–25.

- (23) Rodewald, R.; Kraehenbuhl, J. P. Receptor-mediated transport of IgG. *J. Cell Biol.* **1984**, *99*, 159s–164s.
- (24) Martin, W. L.; Bjorkman, P. J. Characterization of the 2:1 Complex between the Class I MHC-Related Fc Receptor and Its Fc Ligand in Solution. *Biochemistry* **1999**, *38*, 12639–47.
- (25) Wang, W.; Lu, P.; Fang, Y.; Hamuro, L.; Pittman, T.; Carr, B.; Hochman, J.; Prueksaritanont, T. Monoclonal antibodies with identical Fc sequences can bind to FcRn differentially with pharmacokinetic consequences. *Drug Metab Dispos Biol. Fate Chem.* **2011**, *39*, 1469–77.
- (26) Ouyang, J. Drug-to-antibody ratio (DAR) and drug load distribution by hydrophobic interaction chromatography and reversed phase high-performance liquid chromatography. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *1045*, 275–83.
- (27) Passot, C.; Azzopardi, N.; Renault, S.; Baroukh, N.; Arnoult, C.; Ohresser, M.; Boisdron-Celle, M.; Gamelin, E.; Watier, H.; Paintaud, G.; et al. Influence of FCGRT gene polymorphisms on pharmacokinetics of therapeutic antibodies. *mAbs* **2013**, *5*, 614–9.
- (28) Newton, E. E.; Wu, Z.; Simister, N. E. Characterization of basolateral-targeting signals in the neonatal Fc receptor. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 2461–9.
- (29) Malek, A.; Sager, R.; Zakher, A.; Schneider, H. Transport of immunoglobulin G and its subclasses across the in vitro-perfused human placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1995**, *173*, 760–7.
- (30) Wang, W.; Antonsen, K.; Wang, Y. J.; Wang, D. Q. pH dependent effect of glycosylation on protein stability. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, *33*, 120–7.
- (31) Bryant, P.; Pabst, M.; Badescu, G.; Bird, M.; McDowell, W.; Jamieson, E.; Swierkosz, J.; Jurlewicz, K.; Tommasi, R.; Henseleit, K.; et al. In Vitro and In Vivo Evaluation of Cysteine Rebridged Trastuzumab-MMAE Antibody Drug Conjugates with Defined Drug-to-Antibody Ratios. *Mol. Pharmaceutics* **2015**, *12*, 1872.
- (32) Hollander, I.; Kunz, A.; Hamann, P. R. Selection of reaction additives used in the preparation of monomeric antibody-calicheamicin conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 358–61.
- (33) Shen, B.-Q.; Xu, K.; Liu, L.; Raab, H.; Bhakta, S.; Kenrick, M.; Parsons-Reponte, K. L.; Tien, J.; Yu, S.-F.; Mai, E.; et al. Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 184–9.
- (34) Alley, S. C.; Benjamin, D. R.; Jeffrey, S. C.; Okeley, N. M.; Meyer, D. L.; Sanderson, R. J.; Senter, P. D. Contribution of linker stability to the activities of anticancer immunoconjugates. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 759–65.
- (35) Francisco, J. A.; Cervený, C. G.; Meyer, D. L.; Mixan, B. J.; Klussman, K.; Chace, D. F.; Rejniak, S. X.; Gordon, K. A.; DeBlanc, R.; Toki, B. E.; et al. cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood* **2003**, *102*, 1458–65.
- (36) Ward, E. S.; Devanaboyina, S. C.; Ober, R. J. Targeting FcRn for the modulation of antibody dynamics. *Mol. Immunol.* **2015**, *67*, 131.
- (37) Zhou, Q.; Stefano, J. E.; Manning, C.; Kyazike, J.; Chen, B.; Gianolio, D. A.; Park, A.; Busch, M.; Bird, J.; Zheng, X.; et al. Site-specific antibody-drug conjugation through glycoengineering. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 510–20.
- (38) Lhospice, F.; Brégon, D.; Belmant, C.; Dennler, P.; Chiotellis, A.; Fischer, E.; Gauthier, L.; Boëdec, A.; Rispaud, H.; Savard-Chambard, S.; et al. Site-Specific Conjugation of Monomethyl Auristatin E to Anti-CD30 Antibodies Improves Their Pharmacokinetics and Therapeutic Index in Rodent Models. *Mol. Pharmaceutics* **2015**, *12*, 1863.
- (39) Joubert N., Viaud-Massuard M. C., Respaud R. Novel Antibody-Drug Conjugates and the Use of Same in Therapy [Internet]. 2015 [cited 2015 Feb 25]. Available from: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2015004400>.

2) Principaux résultats



Après séparation des espèces de DAR 0, 2, 4, 6 et 8 contenues dans la solution de brentuximab-védotine par HIC, technique de séparation moléculaire qui s'appuie sur les différences en termes d'hydrophobicité de surface, nous avons évalué leur affinité au FcRn. Dans le test de compétition par cytométrie en flux comme dans le test en SPR, l'affinité au FcRn à pH6 augmente avec le DAR. La SPR montre en revanche que même les espèces fortement couplées n'ont pas d'affinité pour le FcRn à pH neutre.

D. Seconde partie

Agrégation et immunogénicité des anticorps
thérapeutiques

1) Objectifs

La plupart des anticorps possédant une AMM aujourd'hui sont d'isotype IgG1, avec une chaîne légère kappa. Pourtant, tous ne sont pas égaux en termes d'immunogénicité. Certains entraînent des réactions allergiques, comme le cétuximab, d'autres provoquent parfois une immunisation avec apparition d'ADA, enfin d'autres présentent des profils de tolérance excellents. Certains de ces déterminants sont clairement identifiés, comme par exemple la présence d'alpha-1,3-galactose (Chung et al., 2008), ou la présence d'agrégats (Ahmadi et al., 2015; Kijanka et al., 2016). En ce qui concerne les agrégats, la cinétique aboutissant à des complexes moléculaires de taille suffisante pour qu'ils soient immunogènes passe par la formation d'agrégats oligomériques réversibles. Deux anticorps s'associent pour former un dimère (Paul et al., 2012). Ce premier échelon d'agrégat se forme et se défait continuellement en solution, répondant à une loi d'action de masse. Les dimères s'associent et se dissocient ensuite pour former des oligomères solubles et réversibles. Puis, par un phénomène de nucléation, les oligomères s'associent, pour finir par former des agrégats irréversibles et insolubles. Ce sont ces particules, d'une taille de l'ordre du micron, qui sont le support de l'immunisation contre l'anticorps thérapeutique (Ahmadi et al., 2015). Les quantités d'agrégats dans une solution donnée augmentent avec le temps et différents types de stress. Les fabricants développent donc des solutions contenant des excipients adaptés et à des concentrations minimisant l'agrégation. Le taux de dimères au sein d'une solution est donc un paramètre pris en compte, et intervenant dans les stabilités annoncées. La présence d'agrégats est un facteur de risque directement impliqué dans l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques (Rosenberg, 2006). L'apparition d'ADA augmente la clairance plasmatique terminale de l'anticorps, modifiant sa PK.

Dans ce premier travail, nous avons cherché à voir s'il existait des différences notables en termes de quantités de dimères dans des solutions d'anticorps possédant une AMM. Nous avons étudié la stabilité des taux de dimères en solution sur plusieurs semaines. Ces différences peuvent provenir de plusieurs facteurs, notamment la séquence protéique. Nous avons cherché à corrélérer ce taux à la présence dans certaines positions de résidus présentant des caractéristiques physicochimiques spécifiques, par une analyse d'alignement de séquences. Nous avons étudié d'autres paramètres liés à la production des anticorps qui pourraient constituer d'autres facteurs d'agrégation ou d'immunogénicité. Parmi ces facteurs, la composition du tampon, la concentration initiale dans la solution mère, la présence ainsi

que la quantité de régions pro-agrégantes, la glycosylation si disponible et la nature de la lignée d'expression ont été explorées. Enfin, nous avons cherché à comprendre si le taux d'agrégats ou d'autres paramètres liés à la structure ou au mode de synthèse de ces anticorps pouvaient être corrélés au taux d'immunisation observés en clinique.

2) Matériel et méthodes

Anticorps

Nous avons utilisé les solutions d'anticorps commercialisées suivantes : adalimumab (Humira, Abbvie), trastuzumab (Herceptin, Roche), infliximab (Remicade, Merck Sharpe & Dohme), rituximab (Mabthera, Roche), cétuximab (Erbix, Merck), bévacizumab (Avastin, Roche), basiliximab (Simulect, Novartis), pertuzumab (Perjeta, Roche), ipilimumab (Yervoy, Bristol-Myers Squibb), golimumab (Simponi, Merck Sharpe & Dohme) et élotuzumab (Empliciti, Bristol Myers Squibb).

Formulation

La concentration est ajustée à 1mg/mL après élimination du tampon commercial et remplacement par un tampon phosphate (phosphate buffer saline ou PBS) pH 7,2. L'échange de solvant est effectué à l'aide de filtres ultracentrifugeables (Pierce Concentrators) équipés de membranes de cellulose régénérée d'une perméabilité limite de 9kDa. Après trois rinçages avec du PBS par centrifugation à 1100g pendant 45minutes, chaque solution est filtrée à 0,22µm et stockée dans des flacons en verre à +4°C.

Analyse chromatographique

Les solutions sont injectées dans un système chromatographique Waters Alliance e2695 équipé d'un détecteur à barrette de diode e2998, d'un appareil de diffusion dynamique multi-angle Wyatt Minidawn Treos et d'un réfractomètre Wyatt OptiLab T-rex, sur une colonne Shodex Protein KW-803 de dimension 300 x 7,8mm. Une quantité de 50µg de chaque anticorps est injectée en triplicata à J0, J7 et J14. Les solutions sont conservées à +4°C dans le passeur d'échantillon.

Les chromatogrammes ainsi que les signaux de diffusion de lumière sont traités à l'aide du logiciel Astra version 6.0.6 (Wyatt Technology Europe). Les résultats en proportions de dimères et d'oligomères sont exprimés en moyenne sur la totalité des injections.

Séquences d'anticorps et alignements

Les séquences ainsi que leurs sources sont décrites dans l'annexe 1. Ces séquences ont été alignées grâce à l'outil « Multiple sequence alignment » du logiciel clustal Omega accessible en ligne à l'adresse <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Les paramètres d'alignement sont laissés par défaut.

Structures

Les structures en cristallographie de l'adalimumab, du trastuzumab, de l'infliximab, du rituximab, du cétuximab, du bévacizumab, du basiliximab, et du pertuzumab utilisées sont respectivement consignées sous les identifiants PDB suivants : 3WD5, 4HKZ, 4G3Y, 2OSL, 1YY8, 1BJ1, 1MIM, et 1L7I.

Ces structures sont traitées par Asaview, un logiciel en ligne accessible à l'adresse <http://www.abren.net/asaview/>, permettant de déterminer la surface absolue accessible au solvant (Absolute Surface Area ou ASA) de chaque résidu afin d'éliminer de l'étude les résidus enfouis. Les coefficients ASA sont apposés contre chaque résidu de l'alignement. Les résidus ayant un coefficient ASA supérieur à 0,2 systématiquement pour tous les anticorps testés sont conservés, les autres sont écartés de l'analyse.

Les paramètres étudiés sont au nombre de cinq : l'hydropathie, le volume, la charge, la polarité, et le statut de donneur ou accepteur d'hydrogène. Ces catégories sont respectivement nommées « hydropathy », « volume », « charge », « polarity », et « hydrogen ». La matrice est ainsi dupliquée, afin de pouvoir remplacer chaque acide aminé par le nombre qui chiffrera le paramètre considéré, selon les classes décrites par Pommié *et al.* (Pommié et al., 2004).

Le codage a été effectué comme suit : pour l'hydropathie, Pommié définit trois classes: hydrophobe (codé 1), neutre (codé 2), et hydrophile (codé 3). Pour le volume, il existe cinq classes: très petit (codé 1), petit (codé 2), moyen (codé 3), grand (codé 4) et très grand (codé 5). Pour la charge, il existe trois classes: charge positive (codé 1), négative (codé 2), ou nulle (codé 3). Pour la polarité, il existe deux classes: polaire (codé 1) ou non polaire (codé 2). Enfin, pour la capacité à donner ou accepter des liaisons hydrogène, il existe quatre classes: donneur (codé 1), accepteur (codé 2), donneur et accepteur (codé 3), ou ni donneur ni accepteur (codé 4). Les matrices, obtenues par remplacement de la lettre correspondant à un résidu donné par le nombre codant le paramètre physicochimique associé, sont données en annexe 2.

Analyse des matrices

Les anticorps thérapeutiques testés sont répartis en deux catégories. Les « BONS » sont les anticorps pour lesquels le taux de dimères en chromatographie d'exclusion de taille est inférieur à 0,15%. Les « MAUVAIS » sont ceux pour lesquels le taux de dimères est strictement supérieur à 0,15%. Pour chaque paramètre physicochimique, la moyenne des valeurs chiffrées correspondant aux caractéristiques physicochimiques des anticorps de la catégorie « BONS » est comparée à celle des anticorps de la catégorie « MAUVAIS ». La comparaison des moyennes, effectuée sur un petit échantillon (n=9) sans notion de normalité de distribution de la variable (rendue ordinale par encodage), est effectuée à l'aide d'un test non paramétrique de Wilcoxon. Les calculs sont automatisés grâce au logiciel « Stat R ».

3) Résultats

3.1) Analyse physicochimique

Les résultats de la quantification des monomères et pics d'oligomères sont présentés en annexe 3. Le bilan est présenté dans le tableau ci-après (tableau 4). Sur cinquante microgrammes théoriquement injectés, les quantités de monomères mesurées en réfractométrie étaient comprises entre 40 et 50µg sauf pour le golimumab qui était systématiquement entre 35 et 37 microgrammes (voir données brutes en annexe 3). Les proportions de dimères consignées dans ce tableau sont comprises entre 0 et 3% m/m. Le basiliximab, l'infliximab et l'ipilimumab (anti-CTLA4 indiqué dans le mélanome avancé ou métastatique) ne présentaient pas de dimères détectables en UV, MALS ou réfractométrie. Les proportions d'agrégats sont restées stables tout au long de l'étude (annexe 3).

Tableau 4

	Monomères		Oligomères		Oligomères (%)
	moyenne (µg)	ecart-type (µg)	moyenne (µg)	ecart-type (µg)	Moyenne%
Adalimumab	43,670	1,654	0,065	0,056	0,149
Basiliximab	41,715	1,874	/	/	/
Bevacizumab	40,108	1,871	1,240	0,139	2,999
Cetuximab	38,698	8,985	0,059	0,024	0,152
Golimumab	41,651	5,410	0,353	0,065	0,839
Elotuzumab	35,611	1,985	0,258	0,069	0,718
Infliximab	41,778	2,377	/	/	/
Ipilimumab	41,015	1,396	/	/	/
Pertuzumab	40,196	2,773	0,051	0,049	0,127
Rituxumab	48,014	1,317	0,071	0,101	0,148
Trastuzumab	44,104	0,964	0,073	0,020	0,164

Quantification des différentes espèces dans les solutions d'anticorps par SEC-UV.

3.2) Analyse structurale

Les séquences intégrales n'étaient pas toutes disponibles sur les bases de données en ligne. En particulier, pour le golimumab et l'ipilimumab, n'étaient disponibles que les séquences des régions variables. Ces anticorps ont donc été éliminés de l'analyse structurale.

Les séquences alignées des anticorps sont disponibles en annexe 4. L'alignement s'arrête au niveau de la charnière parce que tous les Fc disponibles étaient identiques à l'allotype près, avec une différence supplémentaire pour le bévacizumab, sous la forme d'une proline insérée en position 218. Ceci rallongeant théoriquement la longueur du Fc alors que tout le reste est strictement identique aux autres anticorps, nous avons contacté la base de données, qui a confirmé sa séquence et n'explique pas cette différence. Les Fc ont été écartés de l'analyse pour raison de similarité, à l'exception du paramètre allotype et de la différence de structure du bévacizumab qui seront discutés. De même pour les C_H1, qui étaient identiques à l'allotype près, et des C_L, parfaitement identiques (cf. annexe 4).

Parmi les neuf anticorps analysés (tous sauf ipilimumab et golimumab), huit disposaient de structures cristallisées de Fab. Ces structures ont été utilisées pour déterminer le coefficient d'accessibilité au solvant des résidus d'acides aminés discordants entre les Fab des huit anticorps analysés (tous sauf ipilimumab, golimumab et élotuzumab). Un résidu est considéré comme « accessible au solvant » dès lors que le coefficient dépasse 0,2. Une analyse des différences de séquences n'a donné aucun résultat permettant d'expliquer les différences de taux d'agrégats. Nous avons donc décidé de poursuivre l'analyse en codant les paramètres physicochimiques comme précisé dans le matériel et méthodes. Les matrices obtenues sont en annexe 5. Nous avons ensuite mené l'analyse statistique sur ces matrices à l'aide du logiciel « R ». Nous avons classé les anticorps en deux groupes, en fonction du taux d'agrégats observés en SEC. Pour augmenter la puissance de l'analyse, nous avons choisi un seuil arbitraire de 0,15% d'agrégats m/m, ce qui permet de scinder l'échantillon en deux groupes de tailles égales. Le seuil de significativité retenu est de 5%. Les résultats sont consignés dans le tableau 5.

Une seule position ressort statistiquement significative pour deux paramètres : hydrophobie et charge (sur fond rouge dans le tableau). Il s'agit du résidu en position 28, au sein du CDR1 de la chaîne légère. Dans le cas des anticorps présentant moins de 0,15% m/m de dimères, elle est occupée dans 3 cas sur 6 par une sérine, acide aminé non chargé (charge) et neutre

(hydrophilie), et dans les trois autres cas respectivement par une glycine, résidu non chargé et neutre, une phénylalanine, non chargée et hydrophobe, et un acide aspartique, chargé et hydrophile. Le pertuzumab (anti-HER2 indiqué dans certains cancers du sein) est un cas particulier, puisqu'il présente en position 28 un acide aspartique, qui est un résidu hydrophile et chargé retrouvé à la même position pour tous les anticorps du groupe d'anticorps présentant plus de 0,15% m/m de dimères. En effet, pour ces derniers, cette position est occupée strictement par un acide aspartique.

Tableau 5

Chaîne légère					
Position	hydropathy	volume	charge	polarity	hydrogen
1	NA	0,37	0,37	NA	0,37
3	0,10	0,37	NA	0,10	0,10
9	0,10	0,64	NA	0,10	0,10
15	0,10	0,10	NA	NA	NA
18	NA	NA	NA	NA	NA
24	0,72	0,72	0,72	NA	0,72
28	0,05	0,26	0,04	0,37	0,05
40	NA	NA	NA	NA	NA
41	NA	NA	NA	0,37	0,37
42	0,37	0,37	NA	0,37	0,37
43	0,10	0,11	0,10	0,37	0,12
46	NA	NA	NA	NA	NA
55	1,00	0,37	0,72	0,77	1,00
57	NA	0,72	NA	NA	NA
61	0,16	0,86	0,24	0,37	0,16
67	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24
71	0,37	0,37	0,37	NA	0,37
77	0,37	0,37	NA	NA	NA
78	0,64	0,38	0,64	NA	0,64
80	NA	NA	0,10	NA	0,10
102	0,11	0,10	NA	0,21	0,21
105	NA	0,64	0,64	NA	0,64

Chaîne lourde					
Position	hydropathy	volume	charge	polarity	hydrogen
1	0,64	0,64	0,76	NA	0,76
3	0,64	0,37	1,00	0,64	1,00
5	0,11	0,37	0,76	0,21	0,22
7	0,64	0,37	0,64	0,37	0,37
13	0,64	0,38	0,38	0,64	0,38
19	1,00	1,00	0,38	0,64	0,38
23	0,22	0,12	0,38	0,37	0,22
28	0,19	1,00	0,22	0,37	0,16
42	0,37	0,38	1,00	1,00	1,00
64	0,16	0,07	0,89	0,21	0,50
65	0,67	0,28	0,57	0,37	0,79
67	1,00	0,38	0,22	0,64	0,22
75	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64
77	0,54	0,64	0,64	1,00	1,00
78	0,37	0,38	0,38	0,64	0,38
89	0,64	0,22	0,22	0,64	0,22
90	0,11	0,38	0,64	0,21	0,21
91	0,64	1,00	0,37	0,64	0,37
95	0,64	0,37	0,64	0,64	0,64
123	1,00	1,00	0,64	0,37	0,37
126	0,22	0,22	0,64	0,37	0,37
131	0,76	0,64	0,64	0,21	0,21
228	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64

Analyse statistique de l'influence de paramètres physicochimiques de résidus d'acides aminés sur la propension à l'agrégation (p-values).

3.3) Analyse bibliographique des autres facteurs d'immunogénicité

En dehors de la présence d'agrégats au sein des solutions d'anticorps thérapeutiques, d'autres facteurs favorisant l'immunogénicité ont été identifiés dans la littérature. Ces facteurs ont trait à la structure primaire de l'anticorps (séquence peptidique, glycosylations). Nous avons compilé les informations de la littérature, afin d'identifier d'éventuels facteurs favorisant soit l'aggrégation, soit directement l'immunogénicité. Les données compilées dans le tableau 6 concernent la cible antigénique, la formulation, l'allotype, la lignée d'expression, la présence de glycoformes agalactosylées ou fortement mannosylées, les données quantitatives de l'étude sur la proportion d'agrégats, le nombre de séquences agrégogènes au sein des chaînes lourdes et des chaînes légères, la demi-vie chez l'Homme et la fréquence de détection d'ADA parmi les patients traités.

Nous avons analysé les formulations galéniques, les données relatives à la production, à la glycosylation et à la présence de séquences agrégogènes (X. Wang et al., 2009) pour chercher une éventuelle association avec la formation de dimères et d'oligomères. Tout d'abord, une observation rappelant que la seule mesure du taux d'agrégats sans caractérisation plus fine est insuffisante : les anticorps présentant des pics d'agrégats plus gros que des dimères ne sont pas ceux qui présentent les plus forts taux de dimérisation (tableau 6). Les anticorps présentant strictement plus de 0,15% m/m de dimères, soit le bévacizumab, l'élotuzumab (anti-SLAM-F7 indiqué dans le myélome multiple) et le trastuzumab, ne présentent ni cible commune, ni concentration plus haute que les autres anticorps, ni composition de tampon singulière. Ils sont tous d'allotype G1m(17;1), qui est également retrouvé dans trois des sept autres anticorps analysés. L'espèce d'origine de la lignée d'expression ainsi que la présence de glycoformes agalactosylées ou high-mannose ne semble pas avoir d'impact non plus au regard des données disponibles. Nous avons comparé le nombre de séquences agrégogènes entre les deux groupes d'anticorps. Un test de student de comparaison de moyennes n'a pas révélé de différence statistiquement significative au risque α de 5% ($p=0.09$), peut-être par manque de puissance. Les anticorps présentant plus de 0,15 m/m de dimères présentaient une demi-vie moyenne de 17 jours chez l'homme, contre 12 pour les autres anticorps analysés.

Tableau 6

DCI	cible	Conc. (mg/mL)	Tampon pH	Surfactant	Agent dispersant	Allotype	Lignée	Glycoformes:			APR*	Demi-vie chez l'Homme	Détection ADA		
								espèces	Dimères (%)	Oligo-mères					
								sans Gal terminal	high-Man		Chaîne légère	Chaîne lourde	(i)		
Adalimumab	TNF- α	50	Citrate / Phosphate	Polysorbate 80	NaCl / Mannitol	G1m17;1	Hamster	oui ¹	oui M5 ²	0,15	-	5	9	15	17-53% ^{3,4}
Basiliximab	CD25	4	Phosphate	-	Mannitol / NaCl / Saccharose / Glycine	G1m3;-1	Souris	?	?	0,00	-	2	9	7,2	1,18-43,6% ^{5,6}
Bevacizumab	VEGF	25	Phosphate	Polysorbate 20	Trehalose	G1m17;-1	Hamster	oui ⁷	oui M5 ⁷	3,00	-	5	10	18	0,63% ⁸
Cetuximab	EGFR	5	Citrate	Polysorbate 80	NaCl / Glycine	G1m3;-1	Souris	oui ⁹	M5/M6 ⁹	0,15	+	4	10	2,91-4,16	5% ¹⁰ + IgE
Elotuzumab	SLAMF7	25	Citrate	Polysorbate 80	Sucrose	G1m17;1	Souris	?	?	0,72	+/-	4	9	4,6	?
Infliximab	TNF- α	10	Phosphate	Polysorbate 80	Saccharose	G1m17;1	Souris	oui ¹¹	M5 ¹¹	0,00	-	3	7	8-9,5	14-44% ^{12,13}
Ipilimumab	CTLA-4	5	Tris / acide pentétique	Polysorbate 80	Mannitol	G1m3;1	Hamster	?	?	0,00	-	?	?	15,4	1,1-8,4% ^{**14,15}
Pertuzumab	HER2	30	Histidine	Polysorbate 20	Saccharose	G1m17;-1	Hamster	?	?	0,13	-	4	9	18	2,8% ¹⁶
Rituximab	CD20	10	Citrate	Polysorbate 80	NaCl	G1m17;1	Hamster	oui ¹⁷	oui M5/7 ¹⁷	0,15	-	2	9	19,2	<1-18,2% ^{***18,19}
Trastuzumab	HER2	21	Histidine	Polysorbate 20	Trehalose	G1m17;1	Hamster	oui ²⁰	oui M5 ²⁰	0,16	-	6	9	28,5	0,1% ²¹

1(Tebbey et al., 2015); 2(Sjogren et al., 2015); 3(Jani et al., 2014); 4(van Schouwenburg et al., 2013); 5("simulate.pdf", n.d.); 6(Sands et al., 2012); 7(Torkashvand et al., 2015); 8("crp insert - Human-Anti-Avastin-Manual-200-810-ADG-Lifetech-India.pdf", n.d.); 9(Ayoub et al., 2013); 10(Hwang and Foote, 2005); 11(Pisupati et al., 2017); 12(Hanauer et al., 2002); 13(Bendtsen et al., 2006); 14("Yervoy - FDA prescribing information, side effects and uses", n.d.); 15("Attachment: Product Information: Nivolumab - auspar-nivolumab-160823-pl.pdf", n.d.); 16(Basega et al., 2012); 17(Montacir et al., 2017); 18(McLaughlin et al., 1998); 19(Schmidt et al., 2009); 20(Gahoual et al., 2014); 21(Morita et al., 2016).

*Aggrégation-prone regions ou régions pro-agrégantes
**anti-ipilimumab détectés lors de l'association ipilimumab+nivolumab
***<1% dans le lymphome, 18,2% dans le pemphigus

Principales caractéristiques des anticorps de l'étude.

Nous avons ensuite étudié les associations entre nombre de régions agrégogènes et proportion de dimères, taux d'immunisation (en utilisant le taux maximum observé pour chaque anticorps) et proportion de dimères, demi-vie et proportion d'agrégats, et entre immunisation et nombre de séquences agrégogènes (figure 15, et littérature : “Attachment: Product Information: Nivolumab - auspar-nivolumab-160823-pi.pdf,” n.d.; Ayoub et al., 2013; Baselga et al., 2012; Bendtzen et al., 2006; “crp insert - Human-Anti-Avastin-Manual-200-810-ADG-Lifetech-India.pdf,” n.d.; Gahoual et al., 2014; Hanauer et al., 2002; Hwang and Foote, 2005; Jani et al., 2014b; McLaughlin et al., 1998; Montacir et al., 2017; Morita et al., 2016; Pisupati et al., 2017; Sands et al., 2012; Schmidt et al., 2009; “simulect.pdf,” n.d.; Sjögren et al., 2015; Tebbey et al., 2015; Torkashvand et al., 2015; van Schouwenburg et al., 2013; “Yervoy - FDA prescribing information, side effects and uses,” n.d.). Parmi les anticorps présentant les demi-vies les plus réduites, le basiliximab et l’infliximab, qui ne présentent aucun dimère détectable en SEC. La relation attendue était une diminution de la demi-vie avec l’augmentation du taux d’agrégats, ce qui n’est pas le cas, et aucune corrélation n’est mise en évidence entre ces deux paramètres (figure 15A). De même, si l’hypothèse d’une relation entre immunisation et taux d’agrégats pouvait être formulée, elle n’a pas été confirmée dans notre étude (figure 15B). Le coefficient de corrélation entre proportion d’agrégats et nombre de séquences agrégogènes est augmenté artificiellement par l’importante proportion d’agrégats retrouvée dans le bévacizumab (figure 15C). Cet anticorps modifie également les courbes de tendance en 14A et 14B. La séquence du Fc de cet anticorps est unique, possédant une insertion en position 218 (proline). Cette donnée n’a toutefois pas pu être corroborée par une seconde source doit donc être prise au conditionnel.

Il a été décrit que les motifs agrégogènes contenues dans les séquences des anticorps thérapeutiques contiennent des épitopes T (Kumar et al., 2012). Nous nous attendions donc à voir un plus grand nombre de tels motifs dans les anticorps les plus immunogènes en clinique. Cette relation a été explorée (figure 15D), mais aucune association entre ces deux paramètres n’a été identifiée ($R^2=0,17$).

Ainsi, les quatre anticorps pour lesquels plus de 10% des patients s’immunisent en clinique sont l’adalimumab, le basiliximab, l’infliximab et le rituximab. Ils ne sont pas différenciables des autres anticorps de l’étude au regard des paramètres étudiés ici.

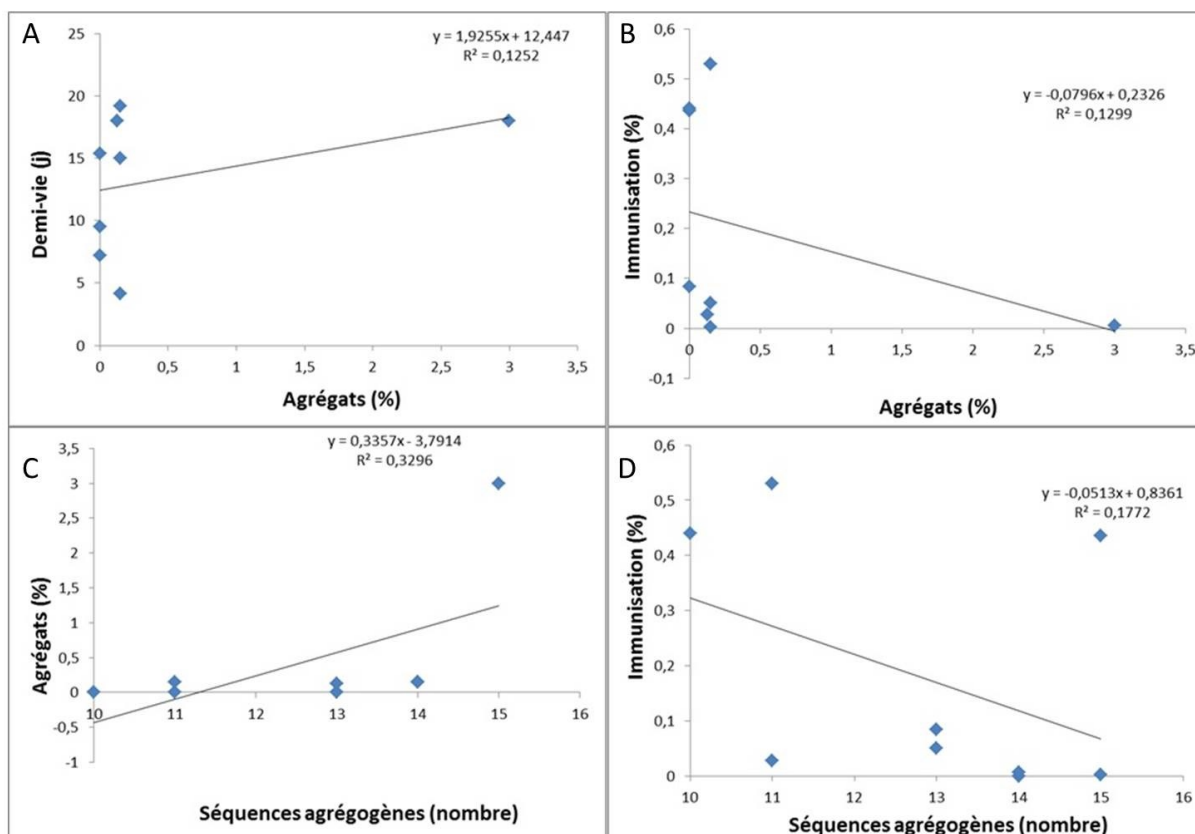


Figure 15

Analyse des corrélations entre : A. La demi-vie des anticorps en fonction de la proportion d'agrégats. B. Le taux maximal d'immunisation observé en clinique en fonction de la proportion d'agrégats. C. Le taux d'agrégats en fonction du nombre de séquences agrégogènes. D. Le taux maximal d'immunisation observé en clinique en fonction du nombre de séquences agrégogènes.

E. Troisième partie

Rôle des complexes immuns dans l'immunisation contre un anticorps anti-TNF- α

1) Objectifs

Dans la précédente partie de ce travail, nous avons observé que l'infliximab, malgré une absence totale d'agrégats détectables par SEC, figurait parmi les plus immunogènes sur le marché actuel, avec les autres anticorps anti-TNF- α (Bendtzen et al., 2006; Hanauer et al., 2002; Jani et al., 2014b; van Schouwenburg et al., 2013). Le cas des anticorps anti-TNF- α est particulier dans la mesure où ils sont indiqués dans des pathologies inflammatoires chroniques. Le TNF- α est une cytokine proinflammatoire. Il se trouve sous forme de trimère soluble ou membranaire, et est surexprimé dans des pathologies telles que la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante ou la maladie de Crohn. Le traitement de ces pathologies chroniques se fait sur plusieurs années voire décennies. L'apparition d'ADA contre ces anticorps pose des problèmes, car elle modifie leur PK jusqu'à mettre le patient en situation d'échec thérapeutique, ce qui impose un changement de ligne de traitement (Mulleman et al., 2010). Parmi les facteurs ayant été incriminés dans l'immunisation à l'encontre des anticorps anti-TNF- α se trouvent notamment des facteurs liés aux médicaments coprescrits. En effet, la coadministration d'immunomodulateurs tels que le méthotrexate limite la fréquence d'immunisation et augmente les concentrations résiduelles en anticorps, de façon dose-dépendante (Krieckaert et al., 2012; Pouw et al., 2015). Il a également été décrit que le protocole d'administration pouvait avoir un impact sur la fréquence d'immunisation. En particulier, les périodes d'abstention thérapeutique ou de sous-dosage favoriseraient l'apparition d'ADA (Mulleman et al., 2010). Le maintien de concentrations suffisantes d'anticorps anti-TNF- α favoriserait la tolérance au médicament, en « noyant » les complexes immuns immunogènes dans un flot d'anticorps monomérique tolérogène (Chaigne and Watier, 2015). Ainsi, selon cette hypothèse, les complexes immuns joueraient un rôle central dans l'immunogénicité des anticorps anti-TNF- α .

Ces complexes immuns sont composés de la cytokine, protéine du soi, et de l'anticorps thérapeutique. Ils sont capturés par des cellules à fonction phagocytaire, comme les macrophages, les polynucléaires ou les cellules dendritiques, *via* différents récepteurs ou molécules d'opsonisation. Dans la littérature, il est décrit l'implication des Fc γ R, du FcRn et même de la protéine C1q (Fanger et al., 1997; Ho et al., 2017) du complément dans l'immunisation et la réponse à l'antigène. Le rôle du FcRn dans la présentation antigénique, et en particulier la cross-présentation est décrit depuis une dizaine d'années seulement. Les immuns-complexes multimériques emprunteraient donc une voie de signalisation différente

des complexes monomériques, favorisant la cross-présentation et donc l'immunisation (Qiao et al., 2008). Le FcRn, en protégeant l'antigène de la dégradation dans le phagolysosome, lui permettrait d'être pris en charge par un système de transport l'amenant au cytoplasme pour qu'il soit pris en charge pour la cross-présentation (Baker et al., 2011). Le FcRn est donc décrit comme un « booster » de l'immunisation, permettant une prise en charge optimale par les cellules dendritiques et les macrophages pour une meilleure présentation aux L_T CD4 et CD8 (Regnault et al., 1999). Toutefois, certains auteurs remettent en cause son caractère indispensable, notamment Liu *et al.*, qui constatent qu'en l'absence de FcRn, la cross-présentation s'opère quand même dans les cellules dendritiques (Liu et al., 2011). Enfin, d'autres ont montré qu'en l'absence totale de FcRn et FcγR, la cross-présentation par les cellules dendritiques *in vivo* dans un modèle murin était maintenue tant que le C1q était exprimé (Ho et al., 2017). Dans le cas de l'administration d'un anticorps thérapeutique dirigé contre une molécule du soi, l'anticorps représente la molécule étrangère contre laquelle peut se monter une réponse immunitaire. En effet, bien qu'humanisé voire totalement humain, il existe une région totalement inconnue pour l'organisme. Il s'agit du paratope. Une réponse de type ADA neutralisante peut se produire à l'encontre de cette zone, et s'appelle alors réponse anti-idiotypique. L'apparition d'ADA modifie la cinétique d'élimination de l'anticorps thérapeutique et favorise les sous-dosages, ainsi que la survenue d'effets indésirables.

Notre hypothèse était donc que l'immunisation à l'encontre des anti-TNF- α était conditionnée par la formation de complexes immuns entre l'anticorps et sa cible. Nous souhaitions également clarifier le rôle du FcRn dans ce processus. Nous avons donc administré des anticorps anti-TNF- α à des souris sauvages et des souris déficientes en FcRn, qui ne présentent pas de pathologie inflammatoire chronique. Deux types d'anticorps anti-TNF- α ont été utilisés : des anticorps ne reconnaissant pas le TNF- α murin comme l'infliximab et le golimumab, et l'adalimumab, un anticorps reconnaissant le TNF- α murin et susceptible de former des complexes immuns avec ce dernier. Nous avons étudié la réponse immunitaire à suite à l'injection par voie intraveineuse de ces deux anticorps. Après une étude pharmacocinétique, nous avons étudié les réponses immunitaires humorales de type ADA dans le contexte d'anticorps croisant ou ne croisant pas avec le TNF- α murin. Ces analyses ont ensuite été complétées par une étude de la réponse cellulaire par cytométrie en flux sur les rates des souris.



ARE YOU A
**SCIENTIFIC
REBEL?**



Unleash your true potential
with the new **CytoFLEX LX**
Flow Cytometer

DARE TO EXPLORE





Crucial Role for Immune Complexes but Not FcRn in Immunization against Anti-TNF- α Antibodies after a Single Injection in Mice

This information is current as of June 5, 2017.

Christophe Arnoult, Guillaume Brachet, Diana Cadena Castaneda, Nicolas Azzopardi, Christophe Passot, Celine Desvignes, Gilles Paintaud, Nathalie Heuzé-Vourc'h, Hervé Watier and Valérie Gouilleux-Gruart

J Immunol published online 5 June 2017
<http://www.jimmunol.org/content/early/2017/06/02/jimmunol.1601246>

-
- | | |
|---------------------|---|
| Subscription | Information about subscribing to <i>The Journal of Immunology</i> is online at:
http://jimmunol.org/subscription |
| Permissions | Submit copyright permission requests at:
http://www.aai.org/About/Publications/JI/copyright.html |
| Email Alerts | Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at:
http://jimmunol.org/alerts |



Crucial Role for Immune Complexes but Not FcRn in Immunization against Anti-TNF- α Antibodies after a Single Injection in Mice

Christophe Arnoult,^{*} Guillaume Brachet,^{*,†} Diana Cadena Castaneda,^{*} Nicolas Azzopardi,^{*} Christophe Passot,^{*,‡} Celine Desvignes,[‡] Gilles Paintaud,^{*,‡} Nathalie Heuzé-Vourc'h,[§] Hervé Watier,^{*,†} and Valérie Gouilleux-Gruart^{*,†}

The immunogenicity of infliximab and adalimumab is a major concern because patients may develop Abs also called antidrug Abs (ADA), directed against these anti-TNF- α Abs after just a few weeks of treatment. These ADAs can lead to a decrease in biologic concentration, which is associated with lower treatment efficacy. Our aim was to study the involvement of immune complexes and neonatal Fc receptor (FcRn) in the emergence of ADAs in the case of anti-TNF- α Abs. Wild type and FcRn knockout mice were injected once with either infliximab or adalimumab, alone or preincubated with TNF- α . Adalimumab cross-reacts with murine TNF- α whereas infliximab is species specific. When injected alone, only adalimumab elicited a humoral response. By performing immune complexes with TNF- α , an anti-infliximab response was elicited. Surprisingly, both wild type and FcRn knockout mice were able to mount an immune response against anti-TNF- α Abs, suggesting that immune complexes are a major determinant of this immunization. *The Journal of Immunology*, 2017, 199: 000–000.

Anti-TNF- α Abs are widely used; some are even blockbuster biopharmaceuticals. Like adalimumab and infliximab, anti-TNF- α Abs are indicated in severe rheumatoid arthritis, in first-line treatment, or in mild cases when disease-modifying antirheumatic drugs or methotrexate alone have failed to control disease progression (1, 2). Yet immunization issues leading to interindividual variability tarnish their success, frequently forcing clinicians to switch to another treatment line.

The immunogenicity of infliximab and adalimumab is a major concern, because at least 14% and up to a third of the patients develop Abs also called antidrug Abs (ADA), directed against these anti-TNF- α Abs after just a few weeks of treatment (3, 4). These ADAs can lead to adverse effects during infusion or to a

decrease in biologic concentration, which was associated with lower treatment efficacy (4).

Many factors have been suspected to be involved in the immunization against therapeutic Abs. Even though some have been refuted, like the degree of Ab humanization (5), or discussed, such as IgG allotypes (6–8), several other factors have been shown to be involved, like the dosing and administration schedule, underexposure to the anti-TNF- α drug (9), coadministration of other drugs (10), and formation of aggregates (11). Complexes can be formed between several molecules of the therapeutic Ab (aggregates) or with its target Ag as in classical immune complexes (ICs) to constitute target-related ICs (TRICs) (12). It has been shown that mAbs are immunogenic in vivo when they form TRICs (13). This phenomenon can be understood in the light of the recent literature concerning IC presentation by immune cells via the neonatal Fc receptor (FcRn) and with the work of Foss et al. (14), who recently demonstrated that TRICs are more efficiently transcytosed than monomeric mAb via FcRn. These mechanisms bring into play the well-described functions of FcRn, extension of IgG half-life, IgG biodistribution, and involvement in humoral and antitumoral immune response through IC presentation by immune cells (15, 16).

The present work focuses on the ability of TRICs to trigger a primary immune response (i.e., after a single injection) against anti-TNF- α Abs in the presence or absence of FcRn. To investigate this, anti-TNF- α Abs were administered to wild type and FcRn knockout (KO) mice and the formation of ADA was measured. The first Ab, infliximab, specifically recognizes human TNF- α (hTNF- α) whereas the other, adalimumab, cross-reacts with mouse TNF- α (mTNF- α), allowing for the evaluation of the role of TRICs and FcRn in ADA formation.

Materials and Methods

Abs

The following mAbs were used: infliximab and golimumab (anti-TNF- α IgG1; MSD), adalimumab (anti-TNF- α IgG1; Abbvie), and rituximab (anti-CD20 IgG1; Roche).

^{*}Université François Rabelais de Tours, CNRS, UMR 7292, F-37032 Tours, France; [†]Laboratoire d'Immunologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours, F-37032 Tours, France; [‡]Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours, F-37032 Tours, France; and [§]Université François Rabelais de Tours, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, INSERM, UMR 1100, F-37032 Tours, France

ORCID: 0000-0003-3255-5214 (C.A.); 0000-0002-5256-1868 (G.B.); 0000-0002-2713-7192 (D.C.C.); 0000-0003-1915-9065 (N.A.); 0000-0003-0158-1356 (G.P.); 0000-0002-2139-4171 (H.W.).

Received for publication July 19, 2016. Accepted for publication May 6, 2017.

This work was supported by a public grant overseen by the French National Research Agency as part of the Investissements d'Avenir program (reference: ANR-10-LABX -53-01) and by European funds (Fonds Européen de Développement Régional Grant Agreement Presage 4940-37478; Outils Expression et Fonctions du FcRn). Measurement of infliximab serum concentrations was carried out within the Centre Pilote de suivi Biologique des traitements par Anticorps platform. Centre Pilote de suivi Biologique des traitements par Anticorps is cofinanced by the European Union. Europe is committed to the Region Centre with the European Regional Development Fund.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Valérie Gouilleux-Gruart, Université François Rabelais de Tours, CNRS UMR 7292, 10 boulevard Tonnellé, BP3223, 37032 Tours, Cedex 1, France. E-mail address: valerie.gouilleux@univ-tours.fr

Abbreviations used in this article: ADA, antidrug Ab; FcRn, neonatal Fc receptor; hTNF- α , human TNF- α ; IC, immune complex; KO, knockout; mTNF- α , mouse TNF- α ; TRIC, target-related IC; WT, wild type.

Copyright © 2017 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/17/\$30.00

Administration of anti-TNF- α mAb in wild-type and FcRn KO mice

Six- to eight-week old C57BL/6 wild-type (WT) mice were obtained from Janvier (Saint-Berthevin, France). The B6.129 $\times$ 1-Fcgrtm1 Dcr/DcrJ (*fcgrt*^{-/-}) mice were generated by the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). A targeting vector was designed to replace 1588 nucleotide fragments (encoding promoter sequence 5' of the transcriptional start site, exon 1, intron 2, and most of exon 2) with a PGK-Neor cassette. The vector was electroporated into 129 $\times$ 1/SvJ-derived ES/J-1182 embryonic stem cells. Correctly targeted embryonic stem cells were injected into recipient C57BL/6J blastocysts. The resulting chimeric animals were crossed to C57BL/6J mice. The mice were then backcrossed to C57BL/6J for 11 generations. All experiments were performed in accordance with national animal care guidelines (EC directive 86/609/CEE, French decree number 87-848), and were approved by the Val-de-Loire Animal Experiments Committee of Ethics (approval number 2012-04-09). Body weight was monitored throughout the study as an indicator of health status. After 1 wk of adaptation period in the same room, WT and FcRn KO mice were anesthetized with isoflurane 2.5% and intravenously injected by a retro-orbital route, with a single dose of 4 mg/kg adalimumab or infliximab. Blood samples were collected at 2 and 6 h, and on days 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, and 21 after adalimumab or infliximab injection. Blood samples were centrifuged at 1500 $\times$ g for 15 min, and sera were stored at -20°C until measurement of infliximab, adalimumab, or ADA levels.

Injection of hTNF- α /anti-TNF- α mAb immune complexes in WT and FcRn KO mice

ICs were generated in vitro by mixing anti-TNF- α Ab and hTNF- α (Peprotech, Neuilly-sur-Seine, France), respectively in a 1:2 molar ratio, and left for 1 h at room temperature. The final concentrations in PBS were 500 μ g/ml for anti-TNF- α Ab and 116 μ g/ml for hTNF- α . Next, 200 μ l were intravenously injected by a retro-orbital route. Blood samples were collected before mAb injection, and on days 5, 7, 10, and 21 for infliximab and adalimumab, or on days 3, 10, and 20 for golimumab.

Pharmacokinetic analysis

The serum concentrations of infliximab and adalimumab were measured using validated ELISA techniques (17, 18). Briefly, recombinant hTNF- α was coated on the solid phase and recognized by infliximab or adalimumab, and the therapeutic Ab was detected by an anti-human IgG Fc γ -specific Ab conjugated to HRP.

ADA and TNF- α ELISA

Briefly, 96-well flat-bottom plates were coated with 1 μ g per well of adalimumab, infliximab, or golimumab in 0.1 M NaCO₃/NaHCO₃ buffer (pH 9.6) in the case of ADA ELISA, or with 200 ng per well of human or murine TNF- α (Peprotech, Neuilly-sur-Seine, France) in TNF- α ELISA. The plates were incubated for 12 h at 4°C. Washing steps were performed with PBS, 0.1% tween 20, plus 5% casein in the blocking step or in mAb dilutions. Serum dilutions (1:100 unless otherwise specified) were incubated at room temperature for 1 h. Specific binding was detected by using either peroxidase-labeled donkey anti-mouse IgG (H+L) (Jackson Laboratory) for 1 h at room temperature in ADA ELISA, peroxidase-labeled goat anti-human IgG (H+L), peroxidase-labeled anti-IgG Ab (anti-Fc; Jackson Laboratory) or with a peroxidase-labeled anti-IgM Ab (anti-Fc; Jackson Laboratory). The reaction was developed by adding 100 μ l of tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) for 20 min and stopped with 50 μ l H₂SO₄ 0.5 M. Absorbance was measured at 450 nm with a Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies, Thoiry, France).

Flow cytometry analysis

Mice spleens were analyzed 2 or 6 d after Ab injection. Single-cell suspensions were isolated with Spleen Dissociation Kits (Miltenyi Biotec, Paris, France). Total leukocyte cell counts were performed and 1×10^6 cells were analyzed by flow cytometry. Fc γ R were first saturated by cell incubation with an anti-Fc γ RII/Fc γ RIII mAb (2.4G2; BD Pharmingen, San Diego, CA) for 20 min. Then cells were incubated with fluorochrome-conjugated specific Abs, in PBS containing 2% SVF and 0.1% sodium azide at 4°C for 60 min. Cells were analyzed using a FACS Gallios equipped with Kaluza software (Beckman Coulter, Villepinte, France). Anti-mouse CD3-FITC, Ly-6c PE-CF594, CD11c PerCP-Cy5.5, CD45R/B220 PE-Cy7, CD11b APC-Cy7, and corresponding control isotypes were purchased from BD Pharmingen.

Statistical analysis

Flow cytometry and ELISA data are expressed as mean and SD of independent experiments. The Mann-Whitney *U* test was used to determine significant differences unless otherwise specified. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5. The α risk was set at 5%. The level of significance is indicated on the figures as **p* $\leq$ 0.05, ***p* $\leq$ 0.01, and ****p* $\leq$ 0.001.

Results

Adalimumab and infliximab have different elimination profiles in WT mice

To measure the relation between anti-TNF- α mAb concentrations and the formation of ADA, adalimumab and infliximab concentrations were monitored for 21 d in the serum of WT and KO mice after a single 4 mg/kg mAb injection (Fig. 1). As expected, serum concentrations of both mAbs were undetectable after 7 d in FcRn KO mice. An acceleration of mAb elimination, with a nonlinear decrease, was observed especially for adalimumab in WT mice, suggesting the formation of ADA.

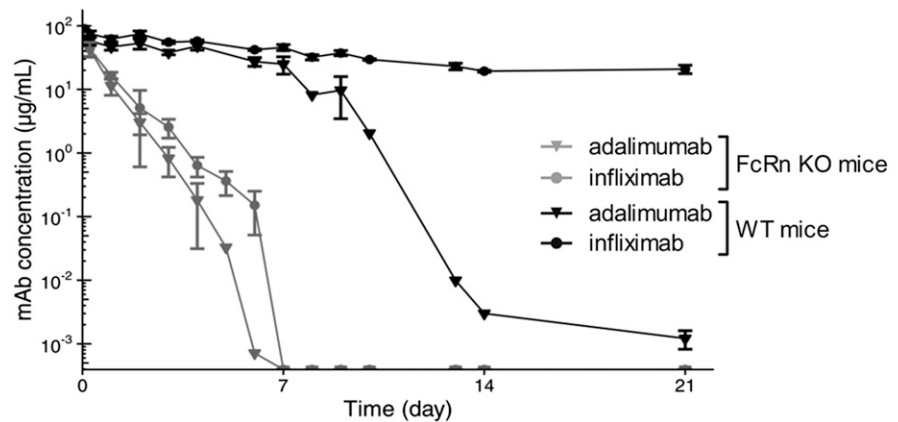
ADA follow-up formation reveals immunization against adalimumab but not infliximab in both WT and FcRn KO mice

ADA formation against adalimumab or infliximab was monitored in both WT and FcRn KO mice after a single mAb injection. The results, presented in Fig. 2, show that ADA are detected earlier in FcRn KO than in WT mice after adalimumab injection (day 4 and day 6 respectively). Even though ADAs occurred earlier in FcRn KO mice, the titers obtained in WT mice seem to be higher (Fig. 2C). The two main mechanistic explanations for this phenomenon are a booster role of FcRn in the humoral response, leading to increased Ab production in WT mice, and the protection of these IgGs from lysosomal degradation by FcRn. ADA detection with an anti-mouse-IgG-specific or an anti-mouse-IgM-specific Ab revealed that the response is mainly an IgG response with very low IgM levels. By contrast, infliximab did not induce any ADA response up to 21 d after injection in both WT and FcRn KO mice (data not shown).

TRICs are involved in ADA development

Our hypothesis was that infliximab did not induce ADA due to the lack of TRIC formation with the endogenous mTNF- α , whereas adalimumab cross-reacts with mTNF- α and therefore generates TRICs following injection. First, the species specificity of anti-TNF- α mAbs was assessed. As shown in Fig. 3, adalimumab binds both human and murine TNF- α whereas infliximab only binds hTNF- α . Rituximab, an anti-CD20 mAb, was used as a negative control. Then, infliximab-containing TRICs were constituted in vitro by mixing hTNF- α and infliximab prior to injection to WT and FcRn KO mice. No ADA could be detected by ELISA in WT or FcRn KO mice injected with infliximab alone. On the contrary, high amounts of infliximab ADA were measured in WT and FcRn KO mice injected with in vitro-formed infliximab-containing TRICs (Fig. 4). No anti-TNF- α Abs were detected in mice injected with recombinant hTNF- α alone. Altogether, these data showed that artificially formed TRICs are able to elicit an immune response to infliximab. In FcRn KO mice, ADA formation has different kinetics depending on the injected mAb, with anti-adalimumab Abs appearing more rapidly than anti-infliximab Abs, whereas ADA decreased more quickly in FcRn KO mice than in WT mice for both mAbs. We injected a 10-fold higher concentration of adalimumab (40 mg/kg), and showed that immunization occurred later in these mice, suggesting that dilution of the immune complexes in a tide of uncomplexed Abs delays ADA formation.

FIGURE 1. Pharmacokinetics of infliximab and adalimumab after a single 4 mg/kg injection. Median serum concentrations over time for adalimumab (triangles) and infliximab (circles) in WT mice (black) and KO mice (gray) for each Ab. Each data set ($n = 7$ per group) corresponds to mean $\pm$ SEM.



Degree of humanization is not responsible for adalimumab immunogenicity

The lack of immunogenicity of infliximab alone could be because its variable domains are murine, whereas adalimumab has human variable domains. To address this, a new set of experiments was

performed with golimumab, a fully human therapeutic anti-TNF- α mAb that is specific to hTNF- α , as shown in Fig. 5A. Golimumab was injected once, either alone or after in vitro IC generation by incubation of golimumab with hTNF- α . Golimumab alone did not elicit an ADA response in WT mice, in contrast to preformed

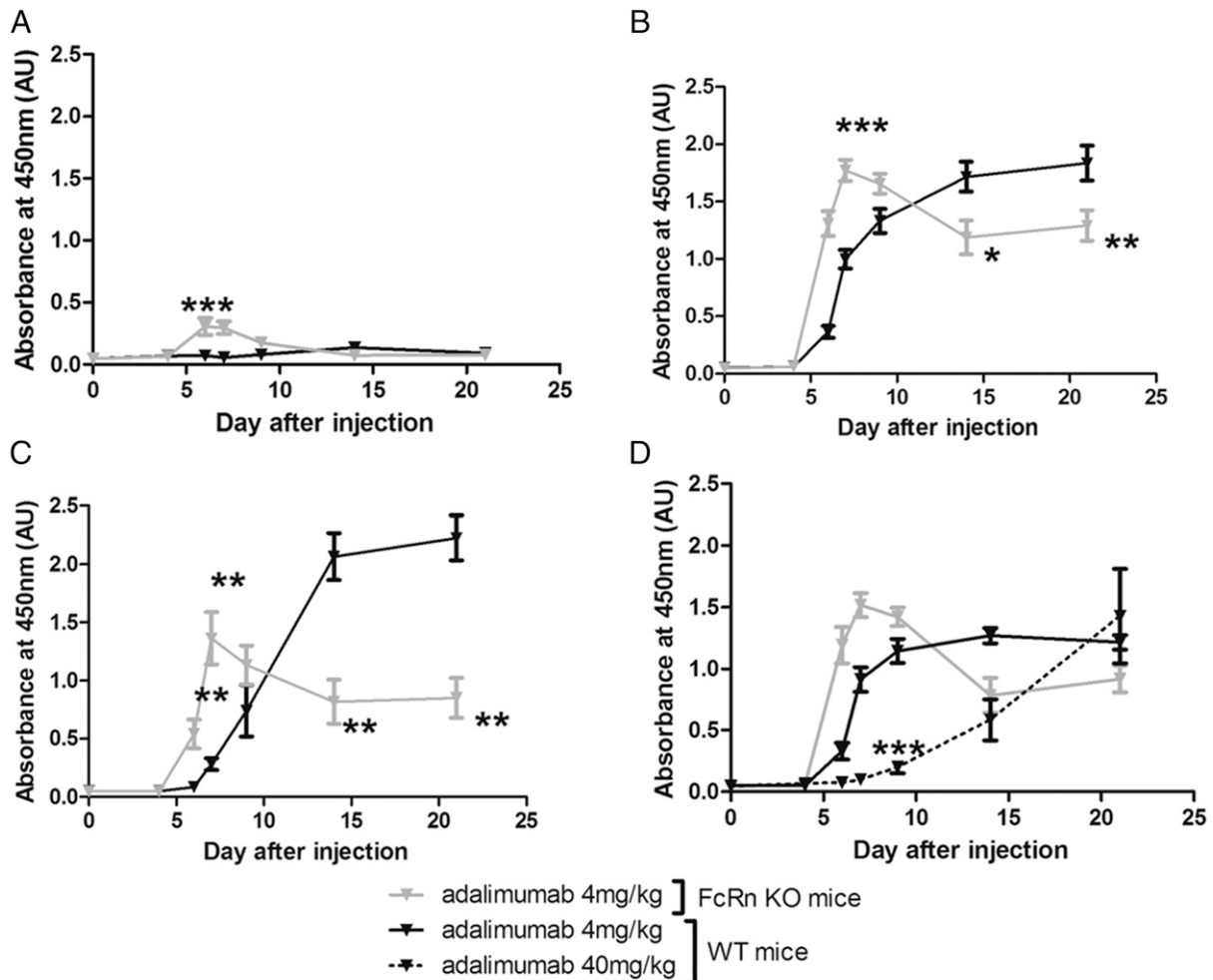


FIGURE 2. Detection of ADA against adalimumab and infliximab in WT (black lines) and FcRn KO (gray lines) mice. ADA formation was evaluated by blood sampling over 3 wk and measured by ELISA in the serum. Each data set corresponds to mean $\pm$ SEM of absorbance values in arbitrary units (AU). (A) Detection of IgM ADA against adalimumab in WT ($n = 7$) and FcRn KO mice ($n = 8$). ADA formation was evaluated by blood sampling over 3 wk and measured by ELISA in the serum (serum dilution 1:100). (B and C) Detection of IgG ADA against adalimumab in WT ($n = 7$) and FcRn KO mice ($n = 8$). ADA formation was evaluated by blood sampling over 3 wk and measured by ELISA in the serum, at two different serum dilutions [1:100 for (B) and 1:1000 for (C)]. (D) Detection of IgG ADA against adalimumab at 4 mg/kg in WT ($n = 7$) and FcRn KO mice ($n = 8$) or at 40 mg/kg in WT mice ($n = 7$). ADA formation was evaluated by blood sampling over 3 wk and measured by ELISA in the serum (diluted at 1:100). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

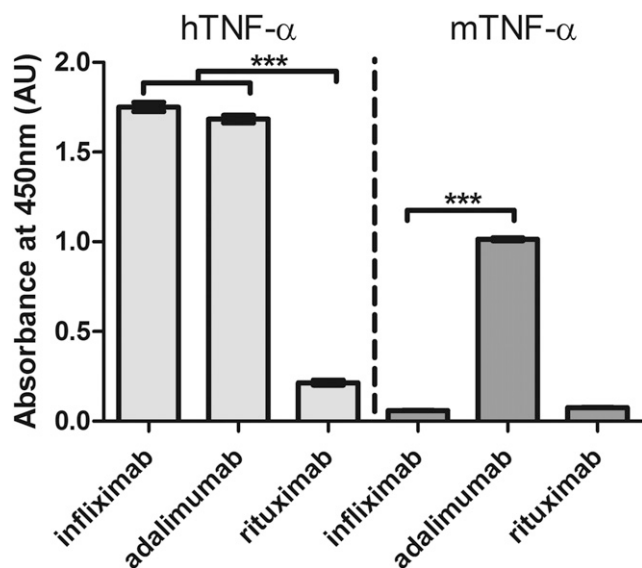


FIGURE 3. Analysis of anti-TNF- α mAb specificity by ELISA. Adalimumab and infliximab were tested in a human and murine TNF- α ELISA. The anti-CD20 rituximab was used as a negative control. Results of three independent experiments are presented as mean $\pm$ SEM of absorbance values in arbitrary units (AU). *** $p < 0.001$.

golimumab-TRICs (Fig. 5B). These results were confirmed by repeating the experiment and performing ELISA with an anti-IgG HRPO-labeled murine-Fc γ -specific Ab (data not shown).

TRICs induced a cellular immune response in both WT and FcRn KO mice

Spleens of WT and FcRn KO animals injected with adalimumab were harvested on day 2 or day 6 to examine the cellular population. Spleens from naive animals were used as control (day 0 in Fig. 6). As shown in Fig. 6A, the size of the spleen increased 2 d after adalimumab injection, with a largely more pronounced effect in FcRn KO mice. This phenomenon was described in all mice by total splenocyte count (Fig. 6A), and a return to a normal count was observed on day 6. Flow cytometry analysis revealed that the increase in cell count on day 2 after adalimumab injection was observed for B cells (B220⁺), T lymphocytes (CD3⁺), dendritic cells (Ly6c⁺/CD11b⁺), and neutrophils (CD11c⁺/CD11b⁺) with a 1.43–1.97 ratio (day 2/day 0) compiling all FcRn KO and WT mice data (Fig. 6B). As expected, ratios were higher in FcRn KO (1.73–2.24) as compared with WT mice (1.40–1.57) for all cell types. This increase in cell count was more pronounced for the B cell ratio (2.24 in FcRn KO versus 1.45 in WT mice), and dendritic cells (1.97 in FcRn KO versus 1.40 in WT mice), followed by a milder increase in neutrophils (1.84 in FcRn KO versus 1.43 in WT mice) and T cells (1.73 in FcRn KO versus 1.57 in WT mice).

Discussion

The immunogenicity of therapeutic mAbs is a complex phenomenon that can occur during treatment with them, leading to the formation of ADA-related ICs and a profound alteration in mAb pharmacokinetics in most patients (9, 19, 20). These ADA-related ICs are defined as complexes formed by the binding of ADA to mAbs, particularly to the mAb idiotypes, because paratopes remain immunogenic whatever the degree of humanization of mAbs (5). This phenomenon has been seen in patients treated with infliximab or adalimumab, and measure-

ment of ADA is often a warning sign of upcoming treatment failure after an initial response (9, 21, 22). To prevent immunization, it is necessary to understand the mechanisms leading to the formation of ADA. Our study shows that TRICs, but not FcRn, are essential to trigger an immune response (i.e., after a single injection) against anti-TNF- α Abs. Moreover, although the crucial role played by FcRn in the development of humoral immune responses has been demonstrated by several studies (23, 24), our data fit better with a booster role for FcRn (25). Most of these studies were carried out using OVA because the T epitopes are well characterized and can be followed up, but the specific case of anti-TNF- α Abs is different. In our study, the Ags are Abs that form TRICs that elicit an immune response after the first injection (or not in the case of infliximab). This point could modify the kinetics of the immune response. In our animal model, we first confirmed that the presence of ADA modifies the pharmacokinetics of therapeutic Abs. Adalimumab displayed a faster log-linear elimination than infliximab but, above all, an accelerated terminal elimination, characteristic of the development of ADA (26, 27). This acceleration was observed in all mice treated with adalimumab, independent of the FcRn status even if elimination was clearly faster in FcRn KO mice (28). Adalimumab binds mTNF- α as described by the European Medicines Agency (2) and confirmed by ELISA. We hypothesized that with adalimumab treatment TRICs would be formed and could in turn cause immunization. To address this, we incubated infliximab and TNF- α to form TRICs, which were able to induce anti-infliximab Abs after injection in both WT and FcRn KO mice.

The Abs used differ in several ways, and one could ask whether the results are biased due to confounding factors. Adalimumab is a fully human therapeutic mAb. To discard the possibility that immunization could be a result of the presence of human portions in the protein sequence, we performed similar experiments with golimumab, another fully human anti-TNF- α mAb very specific for hTNF- α . The absence of anti-golimumab Abs supports the idea that mAb humanization is not responsible for the development of ADA in our model. However, as observed with infliximab, golimumab-containing TRICs injected into mice were able to elicit an anti-golimumab response. Apart from the degree of humanization, allotypes have been suspected to participate in the immunization process in chronic inflammatory diseases, even though the results were negative

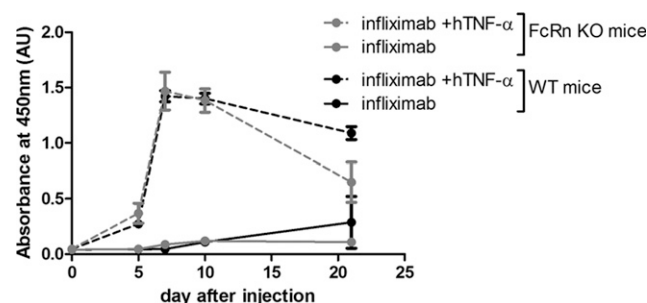


FIGURE 4. In vitro-formed infliximab containing TRICs leads to infliximab ADA development. WT and FcRn KO mice were injected either with the anti-TNF- α mAb alone (solid lines) or with in vitro-formed infliximab containing TRICs (dashed lines). Infliximab ADA were measured in the serum of mice (four mice per group) at indicated times after injection. The results correspond to mean $\pm$ SEM of absorbance values in arbitrary units (AU). On day 21, there was no statistically significant difference in the ADA titer between WT or FcRn-KO mice injected with preformed ICs ($p = 0.056$).

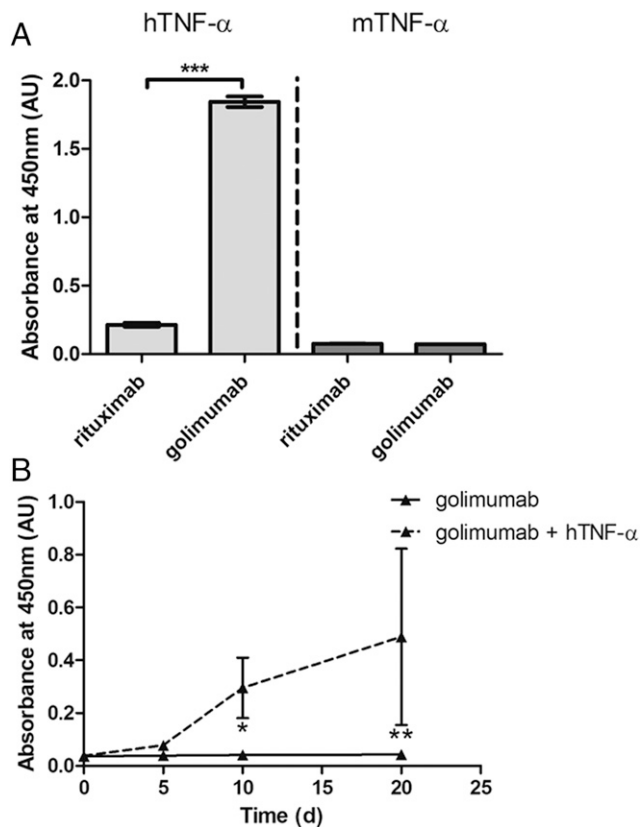


FIGURE 5. (A) Analysis of golimumab specificity for hTNF- α by ELISA. (B) Injection of WT mice with golimumab alone or with in vitro–formed TRICs with golimumab and hTNF- α . Golimumab ADA were measured in the serum of mice (four mice per group) at indicated times after injection. The results correspond to mean $\pm$ SEM of absorbance values in arbitrary units (AU). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

(6). All the Abs used in this study shared the same allotype (G1m17; 1), which discards this hypothesis. Finally, the intrinsic characteristics of the TRICs themselves, such as their size (25), are involved in their trafficking and condition the type of immune response elicited (29). But FcRn $^{-/-}$ mice also mount an immune response against these ICs, which discards this possibility. Moreover, infliximab incubated with hTNF- α also elicits an immune response. Altogether, these data confirmed that TRICs are necessary to elicit a primary immune response in the case of anti-TNF- α Abs.

FcRn is involved in the recycling and transcytosis of IgGs and monovalent immune complexes (30). But, surprisingly, ADAs were detected in both WT and KO FcRn mice, suggesting that FcRn is not necessary for immunization against anti-TNF- α Abs. In addition, anti-adalimumab Abs appeared more rapidly in FcRn KO mice than in WT animals. Several studies performed in FcRn KO models show that mAb pharmacokinetics are clearly impaired and that IgG biodistribution is affected differently depending on the organ tested (28, 31). We hypothesized that, in the absence of FcRn, adalimumab would not be recycled and that, its biodistribution outside the vascular compartment being altered, it would be fully available to form ICs with its target, especially in places such as mesenchymal lymph nodes, where ADA concentrations remain sufficient to form TRICs due to resident plasma cells as described by Baker et al. (16). TRICs would then be able to rapidly induce an immune response, characterized by IgG and

low IgM ADAs, probably via Fc γ R binding and MHC class II presentation (30, 32, 33). Another nonexclusive hypothesis is that the concentrations of free adalimumab are lower in FcRn $^{-/-}$ mice, and that their tolerogenic effect over TRICs is therefore shorter. Although dependence of Ab-mediated presentation of Ag on FcRn has been described in the case of secondary humoral response (15, 25), its absence could probably be overcome by other molecules for IC routing and MHC class II presentation as suggested in our model. The ADA response has a cellular component as observed by the increase in dendritic or monocyte counts as well as B or T cell counts in the spleen of immunized animals. This cellular immune response is necessary to lead to the humoral response and is proportional to the amount of ADA generated. Chen et al. (28) have shown that in the liver or the spleen, FcRn may exert its transcytosis function to transport IgGs out of the tissue. In the absence of FcRn, mAbs or TRICs might be retained in the spleen, thus participating in the increased immune response. Simultaneously, the absence of FcRn leading to accelerated clearance of adalimumab could also explain the faster clearance of ADA in FcRn KO mice as compared with WT. The involvement of this mechanism in ADA kinetic differences is sustained by the kinetics observed with preformed TRICs in our model. In this case, anti-infliximab Ab formation occurs without delay. The question remains as to which Fc γ Rs participate in this immune response. The cellular counts performed on the harvested spleens show an increase in multiple cell populations 2 d after the injection of preformed TRICs, which include dendritic cells (CD11c $^{+}$ /CD11b $^{+}$), neutrophils, and monocytes (LY6c $^{+}$ /CD11b $^{+}$). These cells express the activating murine Fc γ RI (monocytes, dendritic cells), Fc γ RIII, and Fc γ RIV (dendritic cells, neutrophils, and monocytes), which could all play a role in this process. However, because of the numerous differences between humans and mice in terms of Fc γ R (34), caution must be used for extrapolation to the clinical situation.

In humans, ADAs have been detected in a large number of patients treated with anti-TNF- α mAbs. Underexposure to mAbs has been clearly demonstrated in patients as a risk factor of immunization (19, 20). This approach does not take into account the evaluation of specific TRICs, which are known to skew the dosage of ADAs in the serum (35). The nature of the target may also participate in the formation of ICs. In that context, TNF- α is a good candidate because it is composed of a trimer and exists as a soluble Ag that is more prone to form multimeric ICs. The three Abs used in this study target TNF- α in different ways. Adalimumab and infliximab stabilize TNF- α as a trimer, whereas golimumab binding does not prevent monomer exchange with unbound trimers (36), which could explain the rather important variability observed in the anti-golimumab responses. This could explain the higher levels of ADA found with anti-TNF- α than with biologics directed against other molecules, along with the inflammatory profile of the pathologies involving high titers of TNF- α .

It is important to bear in mind that this study was performed using FcRn KO mice, meaning that the bioavailability of the TRICs is altered compared with WT mice, and that full FcRn deficiency has not been seen so far in humans.

It has been documented that low concentrations of anti-TNF- α Abs are associated with increased ADA formation in patients (21), and hypothesized that maintaining high concentrations of monomeric Ab could prevent the immunization process (12). In the case of anti-TNF- α therapy and primary immune response in mice, we show that this is true.

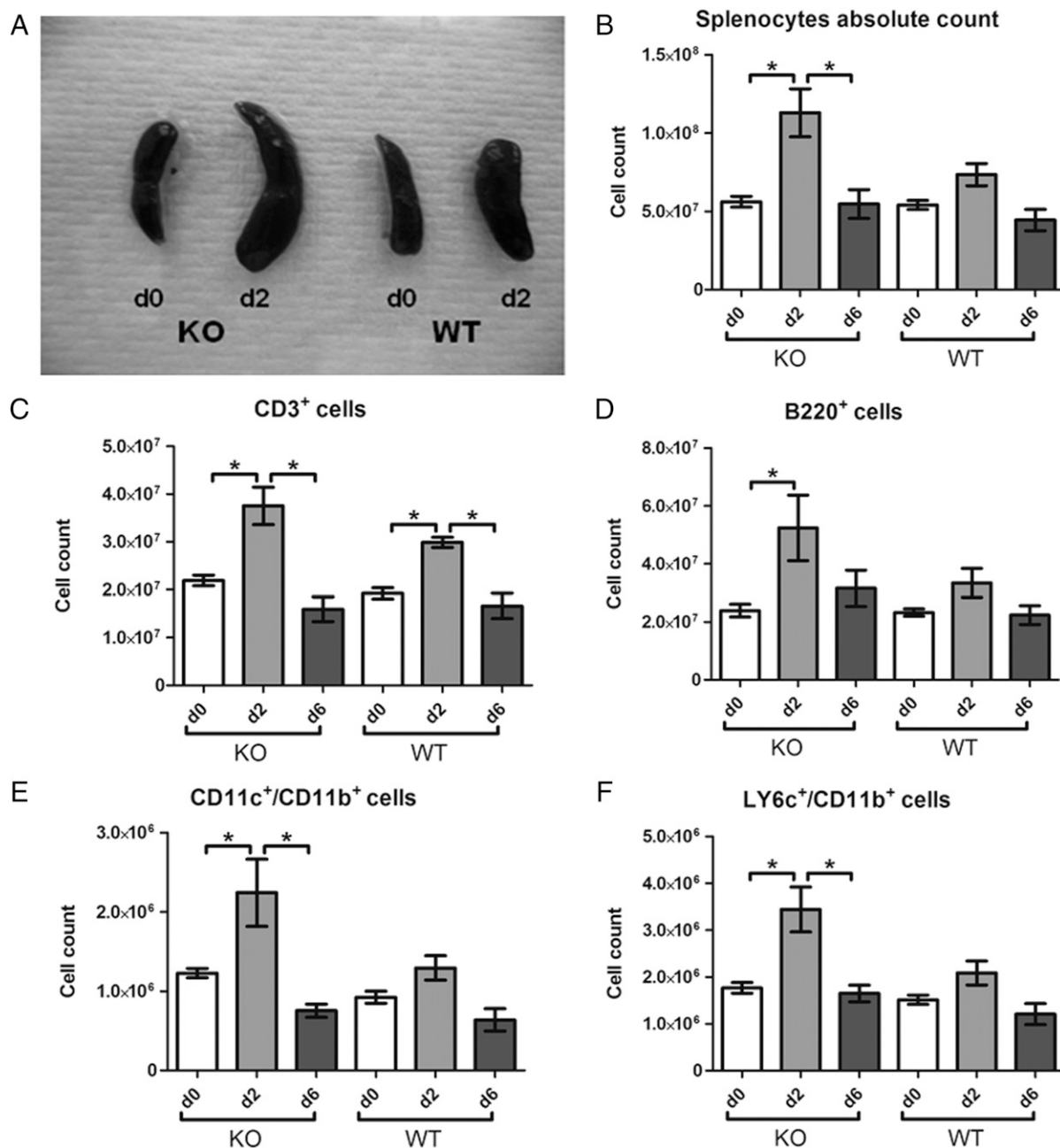


FIGURE 6. Cell content analysis of WT and KO FcRn mice spleens 2 d (d2) and 6 d (d6) post adalimumab injection by flow cytometry. Cells harvested from naive animals represent the time point d0. **(A)** Spleens from adalimumab-treated WT and FcRn KO mice are presented after 2 d of treatment (d2) and compared with spleens from naive mice (d0). Total splenocyte cell count was analyzed in four mice and results correspond to mean $\pm$ SEM. **(B)** CD3⁺ T lymphocytes **(C)**, B220⁺ B lymphocytes **(D)**, CD11b⁺/CD11c⁺ dendritic cells **(E)**, and LY6c⁺/CD11b⁺ monocytes or neutrophils **(F)** were estimated by specific cell count in four mice and results correspond to mean $\pm$ SEM. * p < 0.05.

Acknowledgments

We thank the animal facility of Université François Rabelais for kind help.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- European Medicines Agency. 2012. Remicade: summary of product characteristics, European Public Assessment Report Product Information WC500050888. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000240/WC500050883.pdf.
- European Medicines Agency. 2004. Humira scientific discussion, European Public Assessment Report Scientific Discussion WC500050867. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000481/WC500050867.pdf.
- Hanauer, S. B., B. G. Feagan, G. R. Lichtenstein, L. F. Mayer, S. Schreiber, J. F. Colombel, D. Rachmilewitz, D. C. Wolf, A. Olson, W. Bao, and P. Rutgeerts. 2002. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 359: 1541–1549.
- Schaeferbeke, T., M.-E. Truchetet, M. Kostine, T. Barnette, B. Bannwarth, and C. Richez. 2016. Immunogenicity of biologic agents in rheumatoid arthritis patients: lessons for clinical practice. *Rheumatology (Oxford)* 55: 210–220.
- van Meer, P. J. K., M. Kooijman, V. Brinks, C. C. Gispen-de Wied, B. Silva-Lima, E. H. M. Moors, and H. Schellekens. 2013. Immunogenicity of mAbs in non-human primates during nonclinical safety assessment. *mAbs* 5: 810–816.
- Bartelds, G. M., E. de Groot, M. T. Nurmohamed, M. H. L. Hart, P. H. van Eede, C. A. Wijbrandts, J. B. A. Crusius, B. A. C. Dijkmans, P. P. Tak, L. Aarden, and G. J. Wolbink. 2010. Surprising negative association between IgG1 allotype disparity and anti-adalimumab formation: a cohort study. *Arthritis Res. Ther.* 12: R221.
- Magdelaine-Beuzelin, C., S. Vermeire, M. Goodall, F. Baert, M. Noman, G. V. Assche, M. Ohresser, D. Degenne, J.-M. Dugoujon, R. Jefferis, et al. 2009. IgG1 heavy chain-coding gene polymorphism (G1m allotypes) and development of antibodies-to-infliximab. *Pharmacogenet. Genomics* 19: 383–387.

8. Montes, A., E. Perez-Pampin, F. Navarro-Sarabia, V. Moreira, A. R. de la Serna, B. Magallares, Y. Vasilopoulos, T. Sarafidou, A. Fernández-Nebro, Mdel. C. Ordóñez, et al. 2015. Rheumatoid arthritis response to treatment across IgG1 allotype - anti-TNF incompatibility: a case-only study. *Arthritis Res. Ther.* 17: 63.
9. Baert, F., M. Noman, S. Vermeire, G. Van Assche, G. D' Haens, A. Carbonez, and P. Rutgeerts. 2003. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 348: 601–608.
10. Krieckaert, C. L., M. T. Nurmohamed, and G. J. Wolbink. 2012. Methotrexate reduces immunogenicity in adalimumab treated rheumatoid arthritis patients in a dose dependent manner. *Ann. Rheum. Dis.* 71: 1914–1915.
11. Ahmadi, M., C. J. Bryson, E. A. Cloake, K. Welch, V. Filipe, S. Romeijn, A. Hawe, W. Jiskoot, M. P. Baker, and M. H. Fogg. 2015. Small amounts of sub-visible aggregates enhance the immunogenic potential of monoclonal antibody therapeutics. *Pharm. Res.* 32: 1383–1394.
12. Chaigne, B., and H. Watier. 2015. Monoclonal antibodies in excess: A simple way to avoid immunogenicity in patients? *J. Allergy Clin. Immunol.* 136: 814–816.
13. Jonker, M., and F. J. M. Nooij. 1987. The internal image-like anti-idiotypic response to a CD3-specific monoclonal antibody in primates is dependent on the T cell-binding properties of the injected antibody. *Eur. J. Immunol.* 17: 1519–1522.
14. Foss, S., A. Grevys, K. M. K. Sand, M. Bern, P. Blundell, T. E. Michaelsen, R. J. Pleass, I. Sandlie, and J. T. Andersen. 2016. Enhanced FcRn-dependent transendothelial delivery of IgG by Fc-engineering and polymerization. *J. Control. Release* 223: 42–52.
15. Baker, K., T. Rath, M. Pyzik, and R. S. Blumberg. 2014. The role of FcRn in antigen presentation. *Front. Immunol.* 5: 408.
16. Baker, K., T. Rath, M. B. Flak, J. C. Arthur, Z. Chen, J. N. Glickman, I. Zlobec, E. Karamitopoulou, M. D. Stachler, R. D. Odze, et al. 2013. Neonatal Fc receptor expression in dendritic cells mediates protective immunity against colorectal cancer. *Immunity* 39: 1095–1107.
17. Desvignes, C., S. R. Edupuganti, F. Darrouzain, A.-C. Duveau, A. Loercher, G. Paintaud, and D. Mulleman. 2015. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure adalimumab concentration. *Bioanalysis* 7: 1253–1260.
18. Termant, D., D. Mulleman, D. Degenne, S. Willot, J.-M. Guillaumin, H. Watier, P. Goupille, and G. Paintaud. 2006. An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of infliximab. *Ther. Drug Monit.* 28: 169–174.
19. Bendtsen, K., P. Geborek, M. Svenson, L. Larsson, M. C. Kapetanovic, and T. Saxne. 2006. Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor α inhibitor infliximab. *Arthritis Rheum.* 54: 3782–3789.
20. Ducourau, E., D. Mulleman, G. Paintaud, D. C. Miow Lin, F. Laufferon, D. Ternant, H. Watier, and P. Goupille. 2011. Antibodies toward infliximab are associated with low infliximab concentration at treatment initiation and poor infliximab maintenance in rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 13: R105.
21. Bartelds, G. M., C. L. M. Krieckaert, M. T. Nurmohamed, P. A. van Schouwenburg, W. F. Lems, J. W. R. Twisk, B. A. C. Dijkmans, L. Aarden, and G. J. Wolbink. 2011. Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. *JAMA* 305: 1460–1468.
22. Krintel, S. B., V. P. Grunert, M. L. Hetland, J. S. Johansen, M. Rothfuss, G. Palermo, L. Essioux, and U. Klause. 2013. The frequency of anti-infliximab antibodies in patients with rheumatoid arthritis treated in routine care and the associations with adverse drug reactions and treatment failure. *Rheumatology (Oxford)* 52: 1245–1253.
23. Liu, X., L. Lu, Z. Yang, S. Palaniyandi, R. Zeng, L.-Y. Gao, D. M. Mosser, D. C. Roopenian, and X. Zhu. 2011. The neonatal FcR-mediated presentation of immune-complexed antigen is associated with endosomal and phagosomal pH and antigen stability in macrophages and dendritic cells. *J. Immunol.* 186: 4674–4686.
24. Baker, K., S.-W. Qiao, T. T. Kuo, V. G. Aveson, B. Platzer, J.-T. Andersen, I. Sandlie, Z. Chen, C. de Haar, W. I. Lencer, et al. 2011. Neonatal Fc receptor for IgG (FcRn) regulates cross-presentation of IgG immune complexes by CD8-CD11b+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 9927–9932.
25. Qiao, S.-W., K. Kobayashi, F.-E. Johansen, L. M. Sollid, J. T. Andersen, E. Milford, D. C. Roopenian, W. I. Lencer, and R. S. Blumberg. 2008. Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 9337–9342.
26. Chen, X., T. Hickling, E. Kraynov, B. Kuang, C. Parng, and P. Vicini. 2013. A mathematical model of the effect of immunogenicity on therapeutic protein pharmacokinetics. *AAPS J.* 15: 1141–1154.
27. Ng, T., M. Chan, C. C. Khor, H. K. Ho, and A. Chan. 2014. The genetic variants underlying breast cancer treatment-induced chronic and late toxicities: a systematic review. *Cancer Treat. Rev.* 40: 1199–1214.
28. Chen, N., W. Wang, S. Fauty, Y. Fang, L. Hamuro, A. Hussain, and T. Prueksaritanont. 2014. The effect of the neonatal Fc receptor on human IgG biodistribution in mice. *MAbs* 6: 502–508.
29. Vidarsson, G., A. M. Stemerding, N. M. Stapleton, S. E. Splithoff, H. Janssen, F. E. Rebers, M. de Haas, and J. G. van de Winkel. 2006. FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Blood* 108: 3573–3579.
30. Baker, K., T. Rath, W. I. Lencer, E. Fiebigler, and R. S. Blumberg. 2013. Cross-presentation of IgG-containing immune complexes. *Cell. Mol. Life Sci.* 70: 1319–1334.
31. Guilleminault, L., N. Azzopardi, C. Arnoult, J. Sobilo, V. Hervé, J. Montharu, A. Guillon, C. Andres, O. Herault, A. Le Pape, et al. 2014. Fate of inhaled monoclonal antibodies after the deposition of aerosolized particles in the respiratory system. *J. Control. Release* 196: 344–354.
32. Amigorena, S., D. Lankar, V. Briken, L. Gapin, M. Viguier, and C. Bonnerot. 1998. Type II and III receptors for immunoglobulin G (IgG) control the presentation of different T cell epitopes from single IgG-complexed antigens. *J. Exp. Med.* 187: 505–515.
33. Simitsek, P. D., D. G. Campbell, A. Lanzavecchia, N. Fairweather, and C. Watts. 1995. Modulation of antigen processing by bound antibodies can boost or suppress class II major histocompatibility complex presentation of different T cell determinants. *J. Exp. Med.* 181: 1957–1963.
34. Bruhns, P., and F. Jönsson. 2015. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol. Rev.* 268: 25–51.
35. van Schouwenburg, P. A., G. M. Bartelds, M. H. Hart, L. Aarden, G. J. Wolbink, and D. Wouters. 2010. A novel method for the detection of antibodies to adalimumab in the presence of drug reveals “hidden” immunogenicity in rheumatoid arthritis patients. *J. Immunol. Methods* 362: 82–88.
36. van Schie, K. A., P. Ooijevaar-de Heer, L. Dijk, S. Kruithof, G. Wolbink, and T. Rispens. 2016. Therapeutic TNF inhibitors can differentially stabilize trimeric TNF by inhibiting monomer exchange. *Sci. Rep.* 6: 32747.

2) Principaux résultats

Dans ce travail, nous avons exploré le rôle des complexes immuns dans l'immunisation de souris contre des anticorps thérapeutiques anti-TNF- α . Nous avons administré de l'adalimumab et de l'infliximab à des souris exprimant le FcRn ou non. Dans les deux lignées de souris, apparaît une immunisation contre l'adalimumab. Ces résultats montrent que la présence du FcRn n'est pas nécessaire à l'immunisation contre les anti-TNF- α . Les ADA apparaissent plus tôt chez les souris déficientes en FcRn par rapport aux souris sauvages. Elles présentent également un infiltrat cellulaire splénique plus riche en cellules dendritiques, cellules de la lignée monocyttaire, polynucléaires neutrophiles, lymphocytes B et T.

Cette immunisation est observable suite à l'injection d'adalimumab, qui est capable de fixer le TNF- α murin, mais pas avec l'infliximab qui est spécifique du TNF- α humain. Lorsque l'infliximab est incubé avec du TNF- α humain avant injection chez la souris, il se forme des ADA anti-infliximab, montrant que l'immunisation est conditionnée à la présence des complexes immuns.

F. Discussion

Le FcRn est responsable de la longue demi-vie des IgG (Roopenian and Akilesh, 2007). Néanmoins, toutes les IgG ne présentent pas la même affinité pour ce récepteur, ce qui participe aux différences de PK observées entre des molécules de sous-classes différentes. Même au sein d'une unique sous-classe d'immunoglobulines, des modifications, y compris à distance du site d'interaction peuvent modifier la PK (Monnet et al., 2015; Schlothauer et al., 2013; Ternant et al., 2016).

Les ADC sont des biomédicaments utilisant un Fc fonctionnel, et donc les propriétés inhérentes à la liaison au FcRn, notamment le recyclage et la biodistribution. La bioconjugaison d'adduits, comme la védotine pour le brentuximab, peut se faire sur les cystéines libérées par réduction des ponts disulfures interchaînes, donc à distance du site de liaison au FcRn. La présence de ces adduits pourrait toutefois modifier la souplesse de la charnière, ou modifier l'affinité de l'ADC pour ce récepteur par des mécanismes de liaisons non covalentes, notamment en raison de l'hydrophobicité de la védotine. Cette augmentation de l'hydrophobicité à la surface de la molécule est d'ailleurs sensible, puisque c'est elle qui permet la purification des espèces présentant des DAR différents par HIC. Le couplage sur les ponts disulfures présente la particularité d'aboutir à une solution hétérogène d'espèces de DAR pair. Au sein de la solution commerciale d'Adcetris (brentuximab-védotine), se trouve un mélange d'anticorps présentant un DAR de 0 (E0), 2 (E2), 4 (E4), 6 (E6) et 8 (E8). Cette solution présente un DAR moyen de 4.

L'analyse de la PK de ces différentes espèces *in vivo* dans un modèle murin a montré une clairance plus élevée pour les ADC de DAR égal à 8. Les espèces les plus couplées présentaient à la fois une PK défavorable et une toxicité plus importante (Hamblett et al., 2004). Dans cette étude, la clairance d'E8 était trois fois supérieure à celle d'E4, ce qui nous a amenés à émettre l'hypothèse qu'E8 possédait une moins bonne affinité au FcRn à pH6 ou une affinité supérieure à pH7 par rapport à E4. Pour tester l'hypothèse de diminution d'affinité à pH6, nous avons utilisé un test de compétition pour la liaison au FcRn contre une IgG1 couplée à l'Alexa Fluor 488 par cytométrie en flux. Le rituximab et le panitumumab ont été utilisés comme IgG1 et IgG2 de référence. L'IgG2 sert de témoin « faible » puisque

l'affinité de cette sous-classe pour le FcRn est connue comme étant moins bonne que celle des IgG1. Le brentuximab-védotine « Adcetris » ne présentait pas de différence significative en termes de capacité de déplacement de l'anticorps fluorescent par rapport à l'IgG1 de référence. Les espèces E4 et E6 non plus, ce qui était attendu puisqu'elles représentent à elles deux plus de 50% de la quantité totale d'ADC. La réponse de la fraction E2 est plus faible que celle du brentuximab non conjugué (E0). À partir d'E2, les réponses en termes de compétition augmentent avec le DAR. La fraction E8 présente une liaison au FcRn à pH6 significativement supérieure à celle de toutes les autres espèces, ce qui était inattendu puisque notre hypothèse de départ était que les phénomènes d'encombrement stériques au niveau de la charnière gêneraient les interactions avec le FcRn, ce qui aurait expliqué la clairance plus importante de ces espèces chez la souris. Nous avons donc testé ces fractions en SPR, qui étaient cohérents avec ceux du test de compétition en cytométrie : les espèces avec un DAR plus élevé présentaient une plus grande affinité pour le FcRn à pH6.

Une augmentation de l'affinité à pH7 pourrait expliquer la clairance élevée des espèces à fort taux de couplage. Cependant, les analyses en SPR à pH7 ne montrent pas d'augmentation du niveau de liaison de ces espèces par rapport aux espèces moins voire pas couplées à la védotine. Le mécanisme responsable de l'augmentation de la clairance et de la toxicité n'est donc probablement pas directement lié à une diminution de la capacité des espèces les plus couplées à se lier ou à se dissocier du FcRn.

Le FcRn possède d'autres fonctions que le recyclage et la transcytose. Il est en effet impliqué dans l'élimination des complexes immuns et la présentation de l'antigène (Baker et al., 2013b). Cette fonction passe par un regroupement des molécules de FcRn, qui s'opère en présence de complexes présentant simultanément plusieurs Fc (Wang et al., 2017). FcRn ne reconnaît pas d'antigène, et la nature du complexe poly-Fc n'a donc pas d'importance. L'augmentation du taux de couplage augmente la quantité d'agrégats en solution. En effet, les espèces E6 et E8 présentaient un taux de dimères d'environ 6% et présentaient également un pic d'agrégats plus gros que des dimères. Nous avons cherché à savoir si ces taux d'agrégats étaient caractéristiques des espèces les plus fortement couplées, ou s'ils étaient causés par des stress survenus lors des étapes de purification. Cette information est capitale, puisque les agrégats sont des complexes d'anticorps, et peuvent biaiser les expériences d'affinité en ajoutant un phénomène d'avidité (Bajardi-Taccioli et al., 2015).

La purification par chromatographie d'interaction hydrophobe est une technique certes non dénaturante, mais utilise néanmoins de fortes concentrations de sel ainsi que des solvants organiques comme l'isopropanol, qui auraient pu augmenter artificiellement la proportion d'agrégats en solution (Bobaly et al., 2016; Rubin et al., 2013). Afin de vérifier que ce n'était pas le cas, nous avons comparé le taux d'agrégats présents dans la solution commerciale d'Adcetris à celui qui existerait dans une solution virtuelle recomposée à partir des espèces purifiées. Nous avons donc multiplié le taux d'agrégats de chaque espèce (E0, E2, E4, E6 et E8) par leur proportion respective dans la solution d'Adcetris. Dans la solution d'Adcetris, nous mesurons par SEC un taux de dimères de 2,4% et un taux d'oligomères de 3%. Par calcul, nous obtenons pour la solution virtuelle recomposée des taux de dimères et d'oligomères de 2,69% et 3,80% respectivement. Ces taux sont très proches, ce qui infirme l'hypothèse d'artefact. Une étude portant sur les conditions de purification a récemment confirmé qu'en maintenant un taux d'isopropanol inférieur à 15% et un pH neutre, le stress appliqué aux espèces était minime (Bobaly et al., 2016). Au plus fort du gradient, la quantité d'isopropanol atteint 16%, ce qui est tout à fait acceptable. En représentant sous forme de nuages de point les niveaux de réponse des tests de liaison au FcRn en fonction de la proportion d'agrégats, nous avons observé une corrélation de coefficient R^2 égal à 0,8363 pour la SPR contre 0,4498 pour le test de compétition en cytométrie en flux. La SPR semble donc dans ces conditions être plus sensible au phénomène d'avidité que le test cellulaire. Il a récemment été décrit que la densité de FcRn à la surface de la puce utilisée en SPR était importante pour la justesse des résultats (Abdiche et al., 2015). Nos conditions de saturation ne sont pas optimales, puisqu'elles font apparaître deux sites d'affinités distinctes alors que ces sites présentent physiologiquement la même affinité. Le test de compétition par cytométrie en flux présente l'avantage d'être réalisé sur du FcRn enchâssé dans une membrane cellulaire. Dans ces conditions, il dispose d'un ancrage physiologique, avec certains degrés de liberté. Néanmoins, ce test ne permet pas de calculer une constante d'affinité, puisqu'il se contente de mesurer l'intensité de fluorescence des cellules analysées. D'autres techniques d'évaluation de l'affinité au FcRn existent, comme par exemple les chromatographies d'affinité au FcRn, qui peuvent être effectuées en gradient de pH (Borrok et al., 2015; Schlothauer et al., 2013).

Si l'existence d'agrégats dans les solutions d'ADC et d'anticorps thérapeutiques en général ne constitue pas un artifice, leur impact sur les niveaux de réponse, comme dans le test de liaison au FcRn, par le biais du phénomène d'avidité qu'ils provoquent, est bien réel. Il a été montré

que dès le stade de dimères, les agrégats pouvaient présenter une fonctionnalité altérée, avec toutefois des variabilités en fonction du type de stress responsable de leur formation (Paul et al., 2012). De plus, ces dimères ont un autre effet, qui est de s'associer à d'autres molécules d'anticorps pour former des agrégats de taille plus grande (Bria et al., 2015). Les dimères d'anticorps monoclonaux peuvent être présents dans la solution mère, et altérer la qualité de cette dernière au cours de la période de stockage. Ces solutions sont destinées à une administration parentérale chez l'Homme, ce qui rend nécessaire une parfaite connaissance ainsi qu'une maîtrise totale de leur évolution qualitative lors du stockage. Or, dès l'opération de conditionnement pharmaceutique, il existe un certain niveau d'hétérogénéité, avec des formes présentant des modifications post-traductionnelles (Brorson and Jia, 2014; Liu, 2017).

Dans le meilleur des cas, ces modifications sont sans effet, ou diminuent seulement l'efficacité de la fraction d'anticorps concernée, comme c'est le cas pour les dimères. Au pire, certaines de ces impuretés peuvent provoquer des effets indésirables tels que des réactions à la perfusion, ou favoriser une immunisation à l'encontre de l'anticorps, ce qui peut aboutir là aussi à une perte d'efficacité ainsi qu'à des réactions à la perfusion, en plus d'altérations de la PK.

Nous avons étudié les proportions de dimères présentes dans des solutions d'anticorps thérapeutiques mises sur le marché. La proportion d'agrégats générée par une solution protéique dépend entre autres de certaines glycoformes, de la concentration en protéines, de la composition du tampon en surfactant et en termes d'osmolarité, du pH et de la température de stockage (Bickel et al., 2016; Kameoka et al., 2007; Kayser et al., 2011; Mahler et al., 2009; Zorrilla et al., 2004). Pour nous affranchir d'un maximum de facteurs de variabilité dans cette analyse, nous avons remplacé le solvant commercial par un tampon PBS neutre et ajusté la concentration de chaque solution à 1mg/mL. Les solutions ont toutes été stockées à +4°C avant utilisation et durant toute la durée des manipulations. Les glycoformes sont spécifiques à chaque système d'expression, ce biais aurait pu être corrigé par une déglycosylation préalable. Cette étape s'opère à 37°C pendant 24 à 48heures, et aurait pu constituer un biais, dans l'hypothèse où tous les anticorps n'auraient pas la même sensibilité au stress thermique. Les injections ont été réalisées en triplicat, trois fois, à J0, J7 et J14. Les quantités d'agrégats sont restées constantes sur la durée de l'étude, de même que les proportions par rapport au monomère. Ceci était attendu, puisqu'aucun stress n'est appliqué sur les solutions, et que la concentration d'1mg/mL est en règle générale une condition neutre pour la stabilité colloïdale.

Le protocole de remplacement du tampon par du PBS fait intervenir de la centrifugation sur membrane de 10kDa. En plus de constituer un stress pour les anticorps, cette technique n'élimine jamais totalement les excipients mais les dilue. En effectuant trois passages de centrifugation, on dilue entre 100 et 5000 fois les excipients, en fonction de la concentration initiale en anticorps. Pour le golimumab par exemple, la concentration dans le stylo d'injection est de 100g/L, et le facteur de dilution final est de 5000, le plus important de notre étude. Toutefois, cette formulation nécessite également de grandes quantités de surfactant pour rester stable (80mg de « polysorbate 80 » pour 100mL). Les concentrations résiduelles de polysorbate peuvent modifier la quantité d'agrégats, et ce produit absorbant à 280nm, pourraient être à l'origine de l'erreur de dosage en spectrophotométrie UV qui a conduit à surestimer la concentration d'anticorps dans la solution de travail, d'où la quantité systématiquement inférieure à 40µg vue en réfractométrie.

La proportion d'agrégats la plus importante mesurée est de 3%, pour le bévacizumab. Cet anticorps ne présente pas un taux d'immunisation élevé dans les essais cliniques où cette information a été documentée ("crp insert - Human-Anti-Avastin-Manual-200-810-ADG-Lifetech-India.pdf," n.d.). Ce chiffre reste inférieur au seuil de 5% de dimères proposé par certains auteurs comme limite à ne pas dépasser (Obrezanova et al., 2015). Pour mémoire, cet anticorps présentait une insertion dans le Fc. Il s'agit de la seule discordance entre les différents Fc des anticorps de cette étude mis à part le polymorphisme de l'allotype. Pour le basiliximab, l'infliximab et l'ipilimumab, aucun dimère n'a pu être détecté par cette technique.

L'analyse statistique sur les matrices de paramètres physicochimiques présente un unique résultat ayant une p-value inférieure à 0,05. Il s'agit du résidu en position 28 selon la numérotation IMGT (Lefranc et al., 2003). Cette position se situe dans le CDR de la chaîne légère. Dans le cas des anticorps présentant moins de 0,15% de dimères, elle est occupée dans 3 cas sur 6 par une sérine, acide aminé non chargé (charge) et neutre (hydrophilie), et dans les trois autres cas respectivement par une glycine, résidu non chargé et neutre, une phénylalanine, non chargée et hydrophobe, et un acide aspartique, chargé et hydrophile (Pommié et al., 2004). Le pertuzumab est un cas particulier, puisqu'il présente en position 28 un acide aspartique, qui est un résidu hydrophile et chargé retrouvé à la même position pour tous les anticorps du groupe présentant plus de 0,15% de dimères. En effet, pour ces derniers, cette position est occupée strictement par un acide aspartique. Ces résultats rappellent

l'importance de la séquence des CDR. Pour confirmer cette donnée, obtenue sur un échantillon de taille faible, il faudrait générer des mutants en mettant une sérine en position 28 sur la chaîne légère du trastuzumab, ou de l'élotuzumab (en évitant le bévacizumab à cause de l'insertion dans le Fc qui constitue un facteur de confusion). La manipulation inverse, consistant à mettre un acide aspartique en position 28 sur la chaîne légère de l'ipilimumab, de l'infliximab ou du basiliximab constituerait le contrôle inverse. La mutation d'un résidu contenu dans le CDR ne paraît cependant pas pertinente du fait du risque de perte d'affinité. La structure primaire est très étudiée car il a été montré qu'elle pouvait augmenter la propension à l'agrégation, notamment par la présence de motifs pro-agrégants (Chennamsetty et al., 2009; X. Wang et al., 2009). Il a également été montré que ces séquences constituaient des épitopes T, et leur abondance au sein de la séquence peptidique pourrait donc constituer à la fois un facteur de risque pour l'agrégation et l'immunogénicité des anticorps concernés (De Groot et al., 2005; Kumar et al., 2012). Le dénombrement des séquences contenues dans les chaînes légères et lourdes des anticorps thérapeutiques de l'étude ne permet pas de mettre en évidence d'association ni avec la proportion de dimères, ni avec les taux d'immunisation observés en clinique (tableau 6 et figure 15C et D). Parmi les autres facteurs de risque potentiels d'immunogénicité, ni les excipients, ni la présence d'oligomères plus gros que des dimères, ni l'agalactosylation terminale, la présence de formes high-mannose (ces données concernant les glycoformes n'étant pas disponibles pour l'intégralité des anticorps étudiés), ou la lignée d'expression, qui peut être synonyme de sucres étrangers pour le système immunitaire n'ont pu être clairement associés à des taux d'immunisation plus importants. En effet, les lignées murines transfèrent sur le glycanne des sucres immunogènes chez l'homme (Ghaderi et al., 2012).

Pourtant, parmi les quatre anticorps pour lesquels plus de 10% des patients s'immunisent en clinique, la moitié est fabriquée par des lignées de cellules de hamsters. Ces anticorps sont l'adalimumab, le basiliximab, l'infliximab et le rituximab. Le point commun entre ces quatre anticorps est d'être utilisé dans des conditions proinflammatoires. En effet, l'adalimumab et l'infliximab sont utilisés dans des pathologies inflammatoires chroniques. Le taux d'ADA anti-basiliximab de 43,6% est issu d'un essai clinique en vue d'un éventuel élargissement des indications à la rectocolite hémorragique, alors qu'il est de 1,18% dans la greffe rénale. Enfin, le rituximab induit 18 fois plus d'immunisations dans le pemphigus sévère que dans ses indications cancérologiques (McLaughlin et al., 1998; Schmidt et al., 2009).

Dans les pathologies inflammatoires chroniques, la molécule la plus ciblée est le TNF- α . Les anticorps dirigés contre le TNF- α se caractérisent en clinique par une importante proportion de patients présentant des ADA. L'apparition des ADA s'accompagne d'une altération importante de la PK de l'anticorps (Baert et al., 2003; Bendtzen et al., 2006; Ducourau et al., 2011). Cette immunisation est de type anti-idiotypique, elle est dirigée contre le paratope de l'anticorps thérapeutique et survient donc en dehors de toute problématique de degré d'humanisation du médicament. L'apparition d'ADA est un signe avant-coureur d'échec thérapeutique, qu'il est possible de prévenir en changeant d'anticorps (il n'est pas possible de remplacer par un biosimilaire qui sera également reconnu par les ADA) (Baert et al., 2003; Bartelds et al., 2011; Krintel et al., 2013). Dans la troisième partie de ce travail, nous nous sommes penchés sur les mécanismes à l'origine de l'apparition précoce d'ADA dirigés contre les anti-TNF- α . Nous montrons que la présence d'immuns complexes est nécessaire à l'apparition d'ADA après une injection unique chez la souris, et que cette immunisation survient même en l'absence de FcRn. Ce résultat paraît paradoxal dans la mesure où d'autres études prêtent au FcRn un rôle central dans l'immunisation à l'encontre de l'ovalbumine dans un modèle murin (Baker et al., 2011; Liu et al., 2011). D'autres études décrivent un rôle d'amplificateur du FcRn, compatible avec nos résultats (Qiao et al., 2008). Dans notre étude, les antigènes sont des anticorps, qui complexent le TNF- α , formant des complexes multimériques et induisant une réponse de type ADA. L'apparition de ces ADA s'accompagne d'une modification de la PK de l'anticorps thérapeutique, accélérant sa clairance (Chen et al., 2013; Ng et al., 2014). Ce phénomène se produit aussi bien dans la lignée de souris sauvage que chez les animaux déficients en FcRn.

Nous avons administré à ces souris une dose unique d'adalimumab ou d'infliximab. Le premier possède une cross-réactivité vis-à-vis du TNF- α murin contrairement au second, et induit bien l'apparition d'ADA dès la première injection. L'adalimumab étant toutefois plus humanisé que l'infliximab, il y avait un risque résiduel pour que l'immunisation soit liée à la différence de teneur en séquence humaine entre ces deux anticorps (l'adalimumab est totalement humain tandis que l'infliximab est chimérique et possède donc des F_V murins). Il existe également un anti-TNF- α totalement humain spécifique pour le TNF- α humain, le golimumab. Lorsque nous avons administré cet anticorps, sans préincubation avec du TNF- α humain, il n'y a pas eu d'apparition d'ADA, montrant que le degré d'humanisation n'avait pas d'impact sur l'immunisation précoce contre l'adalimumab. Néanmoins, pour le

golimumab comme pour l'infliximab, la préincubation avec le TNF- α humain restaurait l'immunogénicité, démontrant le rôle des immuns-complexes dans l'immunisation après la première injection.

De façon inattendue, cette immunisation était plus précoce chez les souris déficientes en FcRn, ce qui pourrait s'expliquer de plusieurs façons.

Il est avéré que l'absence de FcRn dans des modèles murins modifie profondément la biodistribution et la PK de l'anticorps (Chen et al., 2014; Guillemineault et al., 2014). Nous pensons qu'en l'absence de FcRn, l'anticorps stagnerait dans le compartiment plasmatique et serait immédiatement disponible pour la formation de complexes immuns avec le TNF- α murin, provoquant une présentation antigénique importante et rapide. Cette hypothèse va à l'encontre de celle selon laquelle le FcRn serait l'initiateur de la réponse immunitaire et relègue ce récepteur au rang de « booster ». De plus, l'absence de FcRn implique une demi-vie des anticorps monovalents amoindrie. Certains auteurs avancent l'hypothèse que l'anticorps monomérique joue un rôle de tolérogène (Chaigne and Watier, 2015). Pour tester cette hypothèse, nous avons administré une dose d'adalimumab décuplée aux souris déficientes en FcRn, déplaçant ainsi temporairement l'équilibre entre anticorps libre et complexes immuns. Nous observons que l'immunisation à l'encontre du médicament se trouvait effectivement retardée. Cette donnée soutient l'hypothèse d'un rôle tolérogénique de l'anticorps libre, ce qui constitue un rationnel pour effectuer un suivi thérapeutique individuel des concentrations résiduelles en anticorps anti-TNF- α et un ajustement posologique en fonction des résultats dans le but de prévenir l'apparition d'ADA contre ces médicaments.

Des taux d'immunisation importants sont retrouvés pour des anticorps lorsqu'ils sont utilisés dans des pathologies inflammatoires par rapport aux autres indications. C'est le cas du rituximab, pour lequel les taux d'ADA passent de moins de 1% dans le lymphome contre plus de 18% dans le pemphigus. Les anticorps ciblant le TNF- α présentent tous une immunogénicité supérieure à celle qui est classiquement observée pour les autres anticorps thérapeutiques, même si l'immunogénicité des anti-TNF- α n'a pas et ne sera probablement jamais étudiée dans des pathologies non inflammatoires. Ces anticorps sont utilisés dans des pathologies inflammatoires chroniques où le TNF- α est sécrété en grande quantité. Il a été formulé l'hypothèse que la complexation du TNF- α par un anticorps thérapeutique pourrait lui conférer une demi-vie artificiellement plus longue (van Schie et al., 2016). Ce faisant,

l'anticorps thérapeutique pourrait participer à conserver un environnement proinflammatoire, en augmentant la demi-vie de la cytokine *via* le recyclage FcRn-dépendant, ce qui serait contre-productif dans le traitement des pathologies chroniques à composante inflammatoire. De plus, sa nature trimérique favorise la formation de complexes immuns de grande taille, plus immunogènes. Une solution envisageable pour limiter l'immunogénicité des anti-TNF- α serait d'utiliser des anticorps de type « sweeping antibodies ». En provoquant un relargage du TNF- α dans les endosomes tardifs, un anticorps de ce type favoriserait à la fois la clairance de la cytokine et le recyclage du médicament. Ce faisant, la concentration d'anticorps libre en circulation resterait plus haute plus longtemps, favorisant ainsi la tolérance à son égard. De plus, en limitant la quantité de médicament passant à la voie endolysosomale, la présentation de séquences de l'anticorps thérapeutique serait limitée, et avec elle le risque d'immunisation contre le médicament.

G. Conclusion et perspectives

Les déterminants moléculaires de la PK des anticorps thérapeutiques sont nombreux. Certains sont immuables, comme les polymorphismes des FcγRs, la nature de la pathologie, ou la physiologie du patient. D'autres, au contraire, peuvent être modifiés par ingénierie moléculaire et constituent des pistes pour améliorer la PK, la tolérance ou l'efficacité des traitements par anticorps thérapeutiques.

Parmi ces déterminants, la composition moléculaire de l'anticorps lui-même peut être améliorée. En effet, la structure moléculaire de l'anticorps a un impact sur la présence et la formation de complexes, qui peuvent être formés d'anticorps seul, d'anticorps et d'antigènes, ou d'anticorps et d'ADA. Le choix de l'épitope ciblé va par exemple modifier la taille et la structure des complexes immuns résultant de l'action de l'anticorps sur son antigène, et modifier la réponse immunitaire à l'encontre de ces complexes. La séquence peptidique, y compris celle des CDR, va modifier la propension à l'agrégation de l'anticorps et donc favoriser ou limiter la présence d'agrégats qui ne sont pas souhaitables pour l'efficacité et la tolérance. Enfin, la présence d'adduits hydrophobes en trop grande quantité au sein d'un ADC va modifier à la fois la stabilité colloïdale, la PK et la PD.

Ainsi, toute modification de la structure moléculaire d'un anticorps comporte un risque de modification de sa PK, à travers une altération de son affinité pour une cible ou un effecteur, notamment le FcRn.

Les domaines immunoglobuliniques, les mutations, les adduits et de façon générale les anticorps, ne peuvent être perçus comme des « briques » que l'on colle ensemble et dont les effets sont additifs ou synergiques. La modification de la séquence peptidique et la conjugaison de molécules médicamenteuses, même lorsque ces modifications sont à distance du site de liaison au FcRn, peuvent altérer la prise en charge de l'anticorps par ce récepteur. Ces modifications peuvent se traduire par une plus faible demi-vie, mais aussi par une altération de la fonctionnalité ou même par l'apparition d'ADA et un échec thérapeutique.

Ce travail ouvre des perspectives pour l'amélioration de la tolérance et la limitation de l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques. En limitant au maximum la formation de complexes contenant de l'anticorps-médicament, l'apparition d'ADA devrait se trouver fortement diminuée. Ces complexes peuvent ne contenir que du médicament, comme dans le cas des agrégats, qui se forment notamment dans les solutions d'ADC, leur proportion

augmentant avec le DAR. Les adduits étant responsables d'une augmentation de l'hydrophobicité de surface, une étude de la corrélation entre temps de rétention en HIC, proportion d'agrégats et paramètres PK (clairance terminale notamment), permettrait d'envisager la HIC comme une technique de screening *in vitro* d'ADC, mais également d'évaluer de nouvelles technologies de bioconjugaison dans l'optique d'améliorer la PK.

L'autre grande famille de complexes d'anticorps est celle des complexes immuns. La génération de complexes immuns de taille relativement importante est connue comme un facteur d'immunisation. Néanmoins, l'internalisation de l'antigène en vue de son élimination passe par son incorporation dans ces complexes immuns. Par conséquent, une solution idéale permettrait la formation et le maintien d'immuns complexes du secteur plasmatique jusqu'au compartiment pré-endosomal, mais favoriserait l'évasion de l'anticorps thérapeutique avant l'étape de présentation antigénique.

La technologie des « sweeping antibodies » satisfait à ces critères, en permettant la formation de complexes immuns et leur dissociation dans le compartiment endosomal, évitant ainsi le catabolisme et la présentation de peptides issus de l'anticorps thérapeutique, et favorisant la tolérance à ce dernier en maintenant des concentrations d'anticorps libre plus élevées, concourant ainsi à une efficacité et une PK améliorées.

H.Bibliographie

- Abdiche, Y.N., Yeung, Y.A., Chaparro-Riggers, J., Barman, I., Strop, P., Chin, S.M., Pham, A., Bolton, G., McDonough, D., Lindquist, K., Pons, J., Rajpal, A., 2015. The neonatal Fc receptor (FcRn) binds independently to both sites of the IgG homodimer with identical affinity. *mAbs* 7, 331–343. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1008353>
- Ahmadi, M., Bryson, C.J., Cloake, E.A., Welch, K., Filipe, V., Romeijn, S., Hawe, A., Jiskoot, W., Baker, M.P., Fogg, M.H., 2015. Small amounts of sub-visible aggregates enhance the immunogenic potential of monoclonal antibody therapeutics. *Pharm. Res.* 32, 1383–1394. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1541-x>
- Alt, N., Zhang, T.Y., Motchnik, P., Taticek, R., Quarmby, V., Schlothauer, T., Beck, H., Emrich, T., Harris, R.J., 2016. Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles. *Biol. J. Int. Assoc. Biol. Stand.* 44, 291–305. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.06.005>
- Anderson, D.R., Hanna, N., Leonard, J.E., Newman, R.A., Rastetter, W.H., Reff, M.E., 2009. Chimeric anti-CD20 antibody. EP2000149 B1.
- Arnold, J.N., Wormald, M.R., Sim, R.B., Rudd, P.M., Dwek, R.A., 2007. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 21–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702>
- Attachment: Product Information: Nivolumab - auspar-nivolumab-160823-pi.pdf, n.d.
- Ayoub, D., Jabs, W., Resemann, A., Evers, W., Evans, C., Main, L., Baessmann, C., Wagner-Rousset, E., Suckau, D., Beck, A., 2013. Correct primary structure assessment and extensive glyco-profiling of cetuximab by a combination of intact, middle-up, middle-down and bottom-up ESI and MALDI mass spectrometry techniques. *mAbs* 5, 699–710. <https://doi.org/10.4161/mabs.25423>
- Azzopardi, N., Dupuis-Girod, S., Ternant, D., Fargeton, A.-E., Ginon, I., Faure, F., Decullier, E., Roux, A., Carette, M.-F., Gilbert-Dussardier, B., Hatron, P.-Y., Lacombe, P., Leguy-Seguin, V., Rivière, S., Corre, R., Bailly, S., Pintaud, G., 2015. Dose - response relationship of bevacizumab in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *mAbs* 7, 630–637. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1022693>
- Azzopardi, N., Lecomte, T., Ternant, D., Boisdron-Celle, M., Piller, F., Morel, A., Gouilleux-Gruart, V., Vignault-Desvignes, C., Watier, H., Gamelin, E., Pintaud, G., 2011. Cetuximab pharmacokinetics influences progression-free survival of metastatic colorectal cancer patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 6329–6337. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1081>
- Baert, F., Noman, M., Vermeire, S., Van Assche, G., D'Haens, G., Carbonez, A., Rutgeerts, P., 2003. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 348, 601–608. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020888>
- Baert, F.J., D'Haens, G.R., Peeters, M., Hiele, M.I., Schaible, T.F., Shealy, D., Geboes, K., Rutgeerts, P.J., 1999. Tumor necrosis factor alpha antibody (infliximab) therapy profoundly down-regulates the inflammation in Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology* 116, 22–28.

- Bai, S., Jorga, K., Xin, Y., Jin, D., Zheng, Y., Damico-Beyer, L.A., Gupta, M., Tang, M., Allison, D.E., Lu, D., Zhang, Y., Joshi, A., Dresser, M.J., 2012. A guide to rational dosing of monoclonal antibodies. *Clin. Pharmacokinet.* 51, 119–135. <https://doi.org/10.2165/11596370-000000000-00000>
- Bajardi-Taccioli, A., Blum, A., Xu, C., Sosic, Z., Bergelson, S., Feschenko, M., 2015. Effect of protein aggregates on characterization of FcRn binding of Fc-fusion therapeutics. *Mol. Immunol.* 67, 616–624. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.06.031>
- Baker, K., Qiao, S.-W., Kuo, T.T., Aveson, V.G., Platzer, B., Andersen, J.-T., Sandlie, I., Chen, Z., de Haar, C., Lencer, W.I., Fiebiger, E., Blumberg, R.S., 2011. Neonatal Fc receptor for IgG (FcRn) regulates cross-presentation of IgG immune complexes by CD8–CD11b+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9927–9932. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019037108>
- Baker, K., Rath, T., Lencer, W.I., Fiebiger, E., Blumberg, R.S., 2013a. Cross-presentation of IgG-containing immune complexes. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 70, 1319–1334. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1100-8>
- Baker, K., Rath, T., Lencer, W.I., Fiebiger, E., Blumberg, R.S., 2013b. Cross-presentation of IgG-containing immune complexes. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 70, 1319–1334. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1100-8>
- Baker, K., Rath, T., Pyzik, M., Blumberg, R.S., 2014. The Role of FcRn in Antigen Presentation. *Front. Immunol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00408>
- Barlow, N.L., Mohammed, P., Berg, J.D., 2016. Serum trough infliximab and anti-infliximab antibodies in a cohort of gastroenterology and rheumatology patients' infliximab therapeutic drug monitoring. *Ann. Clin. Biochem.* 53, 477–484. <https://doi.org/10.1177/0004563215604866>
- Bartelds, G.M., Krieckaert, C.L.M., Nurmohamed, M.T., van Schouwenburg, P.A., Lems, W.F., Twisk, J.W.R., Dijkmans, B.A.C., Aarden, L., Wolbink, G.J., 2011. Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. *JAMA* 305, 1460–1468. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.406>
- Baselga, J., Cortés, J., Kim, S.-B., Im, S.-A., Hegg, R., Im, Y.-H., Roman, L., Pedrini, J.L., Pienkowski, T., Knott, A., Clark, E., Benyunes, M.C., Ross, G., Swain, S.M., CLEOPATRA Study Group, 2012. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 366, 109–119. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal113216>
- Beckley, N.S., Lazzareschi, K.P., Chih, H.-W., Sharma, V.K., Flores, H.L., 2013. Investigation into temperature-induced aggregation of an antibody drug conjugate. *Bioconjug. Chem.* 24, 1674–1683. <https://doi.org/10.1021/bc400182x>
- Ben Mkaddem, S., Hayem, G., Jönsson, F., Rossato, E., Boedec, E., Boussetta, T., El Benna, J., Launay, P., Goujon, J.-M., Benhamou, M., Bruhns, P., Monteiro, R.C., 2014. Shifting FcγRIIA-ITAM from activation to inhibitory configuration ameliorates arthritis. *J. Clin. Invest.* 124, 3945–3959. <https://doi.org/10.1172/JCI74572>
- Bendtzen, K., Geborek, P., Svenson, M., Larsson, L., Kapetanovic, M.C., Saxne, T., 2006. Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor α inhibitor infliximab. *Arthritis Rheum.* 54, 3782–3789. <https://doi.org/10.1002/art.22214>
- Bertolotti-Ciarlet, A., Wang, W., Lownes, R., Pristatsky, P., Fang, Y., McKelvey, T., Li, Y., Li, Y., Drummond, J., Prueksaritanont, T., Vlasak, J., 2009. Impact of methionine oxidation on the binding of human IgG1 to Fc Rn and Fc gamma receptors. *Mol. Immunol.* 46, 1878–1882. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.02.002>

- Bibeau, F., Lopez-Crapez, E., Di Fiore, F., Thezenas, S., Ychou, M., Blanchard, F., Lamy, A., Penault-Llorca, F., Frébourg, T., Michel, P., Sabourin, J.-C., Boissière-Michot, F., 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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 1122–1129. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.0463>
- Bickel, F., Herold, E.M., Marrahi, A.S., Romeijn, S., Jiskoot, W., Kiefer, H., 2016. Reversible NaCl-Induced Aggregation of a Monoclonal Antibody at low pH: Characterization of Aggregates and Factors Affecting Aggregation. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV.* <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.07.020>
- Billiet, T., Dreesen, E., Cleynen, I., Wollants, W.-J., Ferrante, M., Van Assche, G., Gils, A., Vermeire, S., 2016. A Genetic Variation in the Neonatal Fc-Receptor Affects Anti-TNF Drug Concentrations in Inflammatory Bowel Disease. *Am. J. Gastroenterol.* <https://doi.org/10.1038/ajg.2016.306>
- Bobaly, B., Beck, A., Veuthey, J.-L., Guilleme, D., Fekete, S., 2016. Impact of organic modifier and temperature on protein denaturation in hydrophobic interaction chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 131, 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.08.019>
- Bookbinder, L.H., Hofer, A., Haller, M.F., Zepeda, M.L., Keller, G.-A., Lim, J.E., Edgington, T.S., Shepard, H.M., Patton, J.S., Frost, G.I., 2006. A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics. *J. Controlled Release, Third international Nanomedicine and Drug Delivery Symposium* 114, 230–241. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.05.027>
- Borrok, M.J., Wu, Y., Beyaz, N., Yu, X.-Q., Oganessian, V., Dall'Acqua, W.F., Tsui, P., 2015. pH-dependent binding engineering reveals an FcRn affinity threshold that governs IgG recycling. *J. Biol. Chem.* 290, 4282–4290. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.603712>
- Brachet, G., Bourquard, T., Gallay, N., Reiter, E., Gouilleux-Gruart, V., Poupon, A., Watier, H., 2016. Eculizumab epitope on complement C5: Progress towards a better understanding of the mechanism of action. *Mol. Immunol.* 77, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.07.016>
- Brader, M.L., Estey, T., Bai, S., Alston, R.W., Lucas, K.K., Lantz, S., Landsman, P., Maloney, K.M., 2015. Examination of thermal unfolding and aggregation profiles of a series of developable therapeutic monoclonal antibodies. *Mol. Pharm.* 12, 1005–1017. <https://doi.org/10.1021/mp400666b>
- Brambell, F.W., Hemmings, W.A., Morris, I.G., 1964. A Theoretical Model of Gamma-Globulin Catabolism. *Nature* 203, 1352.
- Breedveld, F., Agarwal, S., Yin, M., Ren, S., Li, N.F., Shaw, T.M., Davies, B.E., 2007. Rituximab pharmacokinetics in patients with rheumatoid arthritis: B-cell levels do not correlate with clinical response. *J. Clin. Pharmacol.* 47, 1119–1128. <https://doi.org/10.1177/0091270007305297>
- Bria, C.R.M., Jones, J., Charlesworth, A., Williams, S.K.R., 2015. Probing Submicron Aggregation Kinetics of an IgG Protein by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation. *J. Pharm. Sci.* <https://doi.org/10.1002/jps.24703>
- Brorson, K., Jia, A.Y., 2014. Therapeutic monoclonal antibodies and consistent ends: terminal heterogeneity, detection, and impact on quality. *Curr. Opin. Biotechnol.* 30, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.012>
- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D.A., Fernandez, N., Jorieux, S., Daëron, M., 2009. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic

- variants for human IgG subclasses. *Blood* 113, 3716–3725. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-179754>
- Bruhns, P., Jönsson, F., 2015. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol. Rev.* 268, 25–51. <https://doi.org/10.1111/imr.12350>
- Bruhns, P., Teillaud, J.-L., 2016. Inhibitory IgG Receptor-Expressing Cells: The Must-Have Accessory for Anti-CD40 Immunomodulatory mAb Efficacy. *Cancer Cell* 29, 771–773. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.009>
- Carter, P.J., Presta, L.G., 1992. Procédé de production d'anticorps humanisés. WO1992022653 A1.
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., Watier, H., 2002. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 99, 754–758.
- Cartron, G., Watier, H., 2017. Obinutuzumab: what is there to learn from clinical trials? *Blood* 130, 581–589. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-03-771832>
- Chaigne, B., Watier, H., 2015. Monoclonal antibodies in excess: A simple way to avoid immunogenicity in patients? *J. Allergy Clin. Immunol.* 136, 814–816. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.03.013>
- Chaudhury, C., Brooks, C.L., Carter, D.C., Robinson, J.M., Anderson, C.L., 2006. Albumin binding to FcRn: distinct from the FcRn-IgG interaction. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 4983–4990. <https://doi.org/10.1021/bi052628y>
- Chaudhury, C., Mehnaz, S., Robinson, J.M., Hayton, W.L., Pearl, D.K., Roopenian, D.C., Anderson, C.L., 2003. The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. *J. Exp. Med.* 197, 315–322.
- Chen, C., Constantinou, A., Chester, K.A., Vyas, B., Canis, K., Haslam, S.M., Dell, A., Epenetos, A.A., Deonarain, M.P., 2012. Glycoengineering approach to half-life extension of recombinant biotherapeutics. *Bioconjug. Chem.* 23, 1524–1533. <https://doi.org/10.1021/bc200624a>
- Chen, N., Wang, W., Fauty, S., Fang, Y., Hamuro, L., Hussain, A., Prueksaritanont, T., 2014. The effect of the neonatal Fc receptor on human IgG biodistribution in mice. *mAbs* 6, 502–508. <https://doi.org/10.4161/mabs.27765>
- Chen, X., Hickling, T., Kraynov, E., Kuang, B., Parng, C., Vicini, P., 2013. A mathematical model of the effect of immunogenicity on therapeutic protein pharmacokinetics. *AAPS J.* 15, 1141–1154. <https://doi.org/10.1208/s12248-013-9517-z>
- Chennamsetty, N., Helk, B., Voynov, V., Kayser, V., Trout, B.L., 2009. Aggregation-prone motifs in human immunoglobulin G. *J. Mol. Biol.* 391, 404–413. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.06.028>
- Chung, C.H., Mirakhur, B., Chan, E., Le, Q.-T., Berlin, J., Morse, M., Murphy, B.A., Satinover, S.M., Hosen, J., Mauro, D., Slebos, R.J., Zhou, Q., Gold, D., Hatley, T., Hicklin, D.J., Platts-Mills, T.A.E., 2008. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-α-1,3-galactose. *N. Engl. J. Med.* 358, 1109–1117. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa074943>
- Clarkson, S.B., Kimberly, R.P., Valinsky, J.E., Witmer, M.D., Bussel, J.B., Nachman, R.L., Unkeless, J.C., 1986. Blockade of clearance of immune complexes by an anti-Fc (γ) receptor monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 164, 474–489.
- 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, 443–446. <https://doi.org/10.1038/74704>
- Cragg, M.S., Glennie, M.J., 2004. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood* 103, 2738–2743. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-2031>

- crp insert - Human-Anti-Avastin-Manual-200-810-ADG-Lifetech-India.pdf, n.d.
- Dall'Ozzo, S., Tartas, S., Painsaud, G., Cartron, G., Colombat, P., Bardos, P., Watier, H., Thibault, G., 2004. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res.* 64, 4664–4669. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2862>
- Davis, J.A., Rock, D.A., Wienkers, L.C., Pearson, J.T., 2012. In vitro characterization of the drug-drug interaction potential of catabolites of antibody-maytansinoid conjugates. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 40, 1927–1934. <https://doi.org/10.1124/dmd.112.046169>
- Daydé, D., Ternant, D., Ohresser, M., Lerondel, S., Pesnel, S., Watier, H., Le Pape, A., Bardos, P., Painsaud, G., Cartron, G., 2009. Tumor burden influences exposure and response to rituximab: pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling using a syngeneic bioluminescent murine model expressing human CD20. *Blood* 113, 3765–3772. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-175125>
- de Goeij, B.E., Lambert, J.M., 2016. New developments for antibody-drug conjugate-based therapeutic approaches. *Curr. Opin. Immunol.* 40, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.02.008>
- de Goeij, B.E.C.G., Peipp, M., de Haij, S., van den Brink, E.N., Kellner, C., Riedl, T., de Jong, R., Vink, T., Strumane, K., Bleeker, W.K., Parren, P.W.H.I., 2014. HER2 monoclonal antibodies that do not interfere with receptor heterodimerization-mediated signaling induce effective internalization and represent valuable components for rational antibody-drug conjugate design. *mAbs* 6, 392–402. <https://doi.org/10.4161/mabs.27705>
- De Groot, A.S., Knopp, P.M., Martin, W., 2005. De-immunization of therapeutic proteins by T-cell epitope modification. *Dev. Biol.* 122, 171–194.
- Dekkers, G., Treffers, L., Plomp, R., Bentlage, A.E.H., de Boer, M., Koeleman, C.A.M., Lissenberg-Thunnissen, S.N., Visser, R., Brouwer, M., Mok, J.Y., Matlung, H., van den Berg, T.K., van Esch, W.J.E., Kuijpers, T.W., Wouters, D., Rispens, T., Wührer, M., Vidarsson, G., 2017. Decoding the Human Immunoglobulin G-Glycan Repertoire Reveals a Spectrum of Fc-Receptor- and Complement-Mediated-Effector Activities. *Front. Immunol.* 8, 877. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00877>
- Denoel, A., Dieude, P., Chollet-Martin, S., Grootenboer-Mignot, S., 2015. SAT0181 Immunogenicity of Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Kinetic Analysis. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 720–720. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-eular.4232>
- Detrez, I., Dreesen, E., Van Stappen, T., de Vries, A., Brouwers, E., Van Assche, G., Vermeire, S., Ferrante, M., Gils, A., 2016. Variability in Golimumab Exposure: A “Real-Life” Observational Study in Active Ulcerative Colitis. *J. Crohns Colitis* 10, 575–581. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv241>
- Ducourau, E., Mulleman, D., Painsaud, G., Miow Lin, D.C., Lauféron, F., Ternant, D., Watier, H., Goupille, P., 2011. Antibodies toward infliximab are associated with low infliximab concentration at treatment initiation and poor infliximab maintenance in rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 13, R105. <https://doi.org/10.1186/ar3386>
- Ducourau, E., Ternant, D., Lequerré, T., Fuzibet, P., Le Loët, X., Watier, H., Goupille, P., Painsaud, G., Vittecoq, O., Mulleman, D., 2014. Towards an individualised target concentration of adalimumab in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 1428–1429. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204971>
- Duggan, S.T., Keam, S.J., 2009. Certolizumab pegol: in rheumatoid arthritis. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* 23, 407–417. <https://doi.org/10.2165/11202800-000000000-00000>

- Fanger, N.A., Voigtlaender, D., Liu, C., Swink, S., Wardwell, K., Fisher, J., Graziano, R.F., Pfefferkorn, L.C., Guyre, P.M., 1997. Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor Fc gamma RI (CD64) expressed on human blood dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 158, 3090–3098.
- Flerlage, J.E., Metzger, M.L., Wu, J., Panetta, J.C., 2016. Pharmacokinetics, immunogenicity, and safety of weekly dosing of brentuximab vedotin in pediatric patients with Hodgkin lymphoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 78, 1217–1223. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3180-x>
- Gagez, A.-L., Cartron, G., 2014. Obinutuzumab: a new class of anti-CD20 monoclonal antibody. *Curr. Opin. Oncol.* 26, 484–491. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000107>
- Gahoual, R., Biacchi, M., Chicher, J., Kuhn, L., Hammann, P., Beck, A., Leize-Wagner, E., François, Y.N., 2014. Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry. *mAbs* 6, 1464–1473. <https://doi.org/10.4161/mabs.36305>
- Gatault, P., Brachet, G., Ternant, D., Degenne, D., Récipon, G., Barbet, C., Gyan, E., Gouilleux-Gruart, V., Bordes, C., Farrell, A., Halimi, J.M., Watier, H., 2015. Therapeutic drug monitoring of eculizumab: Rationale for an individualized dosing schedule. *mAbs* 7, 1205–1211. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1086049>
- Geboes, K., Dalle, I., Baert, F., D’Haens, G., Comillie, F., Rutgeerts, P., 2001. Mucosal distribution of infliximab in patients with Crohn’s disease (CD). *Gastroenterology* 120, A322.
- Getman, K.E., Balthasar, J.P., 2005. Pharmacokinetic effects of 4C9, an anti-FcRn antibody, in rats: implications for the use of FcRn inhibitors for the treatment of humoral autoimmune and alloimmune conditions. *J. Pharm. Sci.* 94, 718–729. <https://doi.org/10.1002/jps.20297>
- Ghaderi, D., Zhang, M., Hurtado-Ziola, N., Varki, A., 2012. Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 28, 147–175.
- Ghesquières, H., Cartron, G., Seymour, J.F., Delfau-Larue, M.-H., Offner, F., Soubeyran, P., Perrot, A., Brice, P., Bouabdallah, R., Sonet, A., Dupuis, J., Casasnovas, O., Catalano, J.V., Delmer, A., Jardin, F., Verney, A., Dartigues, P., Salles, G., 2012. Clinical outcome of patients with follicular lymphoma receiving chemoimmunotherapy in the PRIMA study is not affected by FCGR3A and FCGR2A polymorphisms. *Blood* 120, 2650–2657. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-431825>
- Ghirlando, R., Keown, M.B., Mackay, G.A., Lewis, M.S., Unkeless, J.C., Gould, H.J., 1995. Stoichiometry and thermodynamics of the interaction between the Fc fragment of human IgG1 and its low-affinity receptor Fc gamma RIII. *Biochemistry (Mosc.)* 34, 13320–13327.
- Giantonio, B.J., Catalano, P.J., Meropol, N.J., O’Dwyer, P.J., Mitchell, E.P., Alberts, S.R., Schwartz, M.A., Benson III, A.B., 2007. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J. Clin. Oncol.* 25, 1539–1544.
- Gorovits, B., Krinos-Fiorotti, C., 2013. Proposed mechanism of off-target toxicity for antibody-drug conjugates driven by mannose receptor uptake. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 62, 217–223. <https://doi.org/10.1007/s00262-012-1369-3>
- Gouilleux-Gruart, V., Chapel, H., Chevret, S., Lucas, M., Malphettes, M., Fieschi, C., Patel, S., Boutboul, D., Marson, M.-N., Gérard, L., Lee, M., Watier, H., Oksenhendler, E.,

- DEFI study group, 2013. Efficiency of immunoglobulin G replacement therapy in common variable immunodeficiency: correlations with clinical phenotype and polymorphism of the neonatal Fc receptor. *Clin. Exp. Immunol.* 171, 186–194. <https://doi.org/10.1111/cei.12002>
- Grevys, A., Bern, M., Foss, S., Bratlie, D.B., Moen, A., Gunnarsen, K.S., Aase, A., Michaelsen, T.E., Sandlie, I., Andersen, J.T., 2015. Fc Engineering of Human IgG1 for Altered Binding to the Neonatal Fc Receptor Affects Fc Effector Functions. *J. Immunol.* Baltim. Md 1950 194, 5497–5508. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401218>
- Guilleminault, L., Azzopardi, N., Arnoult, C., Sobilo, J., Hervé, V., Montharu, J., Guillon, A., Andres, C., Herault, O., Le Pape, A., Diot, P., Lemarié, E., Paintaud, G., Gouilleux-Gruart, V., Heuzé-Vourc'h, N., 2014. Fate of inhaled monoclonal antibodies after the deposition of aerosolized particles in the respiratory system. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 196, 344–354. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.10.003>
- Hamblett, K.J., Le, T., Rock, B.M., Rock, D.A., Siu, S., Huard, J.N., Conner, K.P., Milburn, R.R., O'Neill, J.W., Tometsko, M.E., Fanslow, W.C., 2016. Altering Antibody-Drug Conjugate Binding to the Neonatal Fc Receptor Impacts Efficacy and Tolerability. *Mol. Pharm.* 13, 2387–2396. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00153>
- Hamblett, K.J., Senter, P.D., Chace, D.F., Sun, M.M.C., Lenox, J., Cerveny, C.G., Kissler, K.M., Bernhardt, S.X., Kopcha, A.K., Zabinski, R.F., Meyer, D.L., Francisco, J.A., 2004. Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 7063–7070. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0789>
- Hamilton, S.R., Bobrowicz, P., Bobrowicz, B., Davidson, R.C., Li, H., Mitchell, T., Nett, J.H., Rausch, S., Stadheim, T.A., Wischnewski, H., Wildt, S., Gerngross, T.U., 2003. Production of complex human glycoproteins in yeast. *Science* 301, 1244–1246. <https://doi.org/10.1126/science.1088166>
- Han, T.H., Gopal, A.K., Ramchandren, R., Goy, A., Chen, R., Matous, J.V., Cooper, M., Grove, L.E., Alley, S.C., Lynch, C.M., O'Connor, O.A., 2013. CYP3A-mediated drug-drug interaction potential and excretion of brentuximab vedotin, an antibody-drug conjugate, in patients with CD30-positive hematologic malignancies. *J. Clin. Pharmacol.* 53, 866–877. <https://doi.org/10.1002/jcph.116>
- Hanauer, S.B., Feagan, B.G., Lichtenstein, G.R., Mayer, L.F., Schreiber, S., Colombel, J.F., Rachmilewitz, D., Wolf, D.C., Olson, A., Bao, W., Rutgeerts, P., ACCENT I Study Group, 2002. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet Lond. Engl.* 359, 1541–1549. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08512-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08512-4)
- Hansen, R.J., Balthasar, J.P., 2002. Intravenous immunoglobulin mediates an increase in anti-platelet antibody clearance via the FcRn receptor. *Thromb. Haemost.* 88, 898–899.
- Hernández-Jiménez, J., Salmerón-García, A., Cabeza, J., Vélez, C., Capitán-Vallvey, L.F., Navas, N., 2016. The Effects of Light-Accelerated Degradation on the Aggregation of Marketed Therapeutic Monoclonal Antibodies Evaluated by Size-Exclusion Chromatography With Diode Array Detection. *J. Pharm. Sci.* 105, 1405–1418. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.01.012>
- Ho, N.I., Camps, M.G.M., de Haas, E.F.E., Trouw, L.A., Verbeek, J.S., Ossendorp, F., 2017. C1q-Dependent Dendritic Cell Cross-Presentation of In Vivo-Formed Antigen-Antibody Complexes. *J. Immunol.* Baltim. Md 1950. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1602169>

- Hodoniczky, J., Zheng, Y.Z., James, D.C., 2005. Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc N-glycan remodeling in vitro. *Biotechnol. Prog.* 21, 1644–1652. <https://doi.org/10.1021/bp050228w>
- Hu, S., Liang, S., Guo, H., Zhang, D., Li, H., Wang, X., Yang, W., Qian, W., Hou, S., Wang, H., Guo, Y., Lou, Z., 2013. Comparison of the inhibition mechanisms of adalimumab and infliximab in treating tumor necrosis factor α -associated diseases from a molecular view. *J. Biol. Chem.* 288, 27059–27067. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.491530>
- Hutt, M., Färber-Schwarz, A., Unverdorben, F., Richter, F., Kontermann, R.E., 2012. Plasma half-life extension of small recombinant antibodies by fusion to immunoglobulin-binding domains. *J. Biol. Chem.* 287, 4462–4469. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.311522>
- Hwang, W.Y.K., Foote, J., 2005. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods, Humanized Antibodies and their Applications* 36, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.01.001>
- Idusogie, E.E., Presta, L.G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Wong, P.Y., Ultsch, M., Meng, Y.G., Mulkerrin, M.G., 2000. Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J. Immunol. Baltim. Md* 164, 4178–4184.
- Igawa, T., Haraya, K., Hattori, K., 2016. Sweeping antibody as a novel therapeutic antibody modality capable of eliminating soluble antigens from circulation. *Immunol. Rev.* 270, 132–151. <https://doi.org/10.1111/imr.12392>
- Igawa, T., Maeda, A., Haraya, K., Tachibana, T., Iwayanagi, Y., Mimoto, F., Higuchi, Y., Ishii, S., Tamba, S., Hironiwa, N., Nagano, K., Wakabayashi, T., Tsunoda, H., Hattori, K., 2013. Engineered monoclonal antibody with novel antigen-sweeping activity in vivo. *PloS One* 8, e63236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063236>
- Igawa, T., Tsunoda, H., Tachibana, T., Maeda, A., Mimoto, F., Moriyama, C., Nanami, M., Sekimori, Y., Nabuchi, Y., Aso, Y., Hattori, K., 2010. Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* 23, 385–392. <https://doi.org/10.1093/protein/gzq009>
- Iwahashi, M., Inoue, H., Matsubara, T., Tanaka, T., Amano, K., Kanamono, T., Nakano, T., Uchimura, S., Izumihara, T., Yamazaki, A., Karyekar, C.S., Takeuchi, T., 2014. Efficacy, safety, pharmacokinetics and immunogenicity of abatacept administered subcutaneously or intravenously in Japanese patients with rheumatoid arthritis and inadequate response to methotrexate: a Phase II/III, randomized study. *Mod. Rheumatol.* 24, 885–891. <https://doi.org/10.3109/14397595.2014.881954>
- Jackisch, C., Kim, S.-B., Semiglazov, V., Melichar, B., Pivot, X., Hillenbach, C., Stroyakovskiy, D., Lum, B.L., Elliott, R., Weber, H.A., Ismael, G., 2015. Subcutaneous versus intravenous formulation of trastuzumab for HER2-positive early breast cancer: updated results from the phase III HannaH study. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 26, 320–325. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu524>
- Jani, M., Barton, A., Warren, R.B., Griffiths, C.E.M., Chinoy, H., 2014a. The role of DMARDs in reducing the immunogenicity of TNF inhibitors in chronic inflammatory diseases. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 53, 213–222. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ket260>
- Jani, M., Barton, A., Warren, R.B., Griffiths, C.E.M., Chinoy, H., 2014b. The role of DMARDs in reducing the immunogenicity of TNF inhibitors in chronic inflammatory diseases. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 53, 213–222. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ket260>
- Jefferis, R., Lund, J., 2002. Interaction sites on human IgG-Fc for Fc γ R: current models. *Immunol. Lett.* 82, 57–65.

- Jefferis, R., Lund, J., Pound, J.D., 1998. IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunol. Rev.* 163, 59–76.
- Jonsson, E.N., Xie, R., Marshall, S.F., Arends, R.H., 2016. Population pharmacokinetics of tanezumab in phase 3 clinical trials for osteoarthritis pain. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 81, 688–699. <https://doi.org/10.1111/bcp.12850>
- Ju, M.-S., Na, J.-H., Yu, Y.G., Kim, J.-Y., Jeong, C., Jung, S.T., 2015. Structural consequences of aglycosylated IgG Fc variants evolved for FcγRI binding. *Mol. Immunol.* 67, 350–356. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.06.020>
- Jung, S.T., Reddy, S.T., Kang, T.H., Borrok, M.J., Sandlie, I., Tucker, P.W., Georgiou, G., 2010. Aglycosylated IgG variants expressed in bacteria that selectively bind FcγRI potentiate tumor cell killing by monocyte-dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 604–609. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908590107>
- Junttila, T.T., Akita, R.W., Parsons, K., Fields, C., Lewis Phillips, G.D., Friedman, L.S., Sampath, D., Sliwkowski, M.X., 2009. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell* 15, 429–440. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.020>
- Kadcyla, INN-trastuzumab emtansine - WC500158595.pdf, n.d.
- Kameoka, D., Masuzaki, E., Ueda, T., Imoto, T., 2007. Effect of Buffer Species on the Unfolding and the Aggregation of Humanized IgG. *J. Biochem. (Tokyo)* 142, 383–391. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm145>
- Karsten, C.M., Pandey, M.K., Figge, J., Kilchenstein, R., Taylor, P.R., Rosas, M., McDonald, J.U., Orr, S.J., Berger, M., Petzold, D., Blanchard, V., Winkler, A., Hess, C., Reid, D.M., Majoul, I.V., Strait, R.T., Harris, N.L., Köhl, G., Wex, E., Ludwig, R., Zillikens, D., Nimmerjahn, F., Finkelman, F.D., Brown, G.D., Ehlers, M., Köhl, J., 2012. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nat. Med.* 18, 1401–1406. <https://doi.org/10.1038/nm.2862>
- Kayser, V., Chennamsetty, N., Voynov, V., Forrer, K., Helk, B., Trout, B.L., 2011. Glycosylation influences on the aggregation propensity of therapeutic monoclonal antibodies. *Biotechnol. J.* 6, 38–44. <https://doi.org/10.1002/biot.201000091>
- Kenkre, V.P., Hong, F., Cerhan, J.R., Lewis, M., Sullivan, L., Williams, M.E., Gascoyne, R.D., Horning, S.J., Kahl, B.S., 2016. Fc Gamma Receptor 3A and 2A Polymorphisms Do Not Predict Response to Rituximab in Follicular Lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22, 821–826. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1848>
- Keytruda, INN-pembrolizumab - anx_132284_fr.pdf, n.d.
- Kijanka, G., Bee, J.S., Bishop, S.M., Que, I., Löwik, C., Jiskoot, W., 2016. Fate of Multimeric Oligomers, Submicron, and Micron Size Aggregates of Monoclonal Antibodies Upon Subcutaneous Injection in Mice. *J. Pharm. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.02.034>
- Kishore, U., Reid, K.B., 2000. C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology* 49, 159–170.
- Kiyoshi, M., Caaveiro, J.M.M., Kawai, T., Tashiro, S., Ide, T., Asaoka, Y., Hatayama, K., Tsumoto, K., 2015. Structural basis for binding of human IgG1 to its high-affinity human receptor FcγRI. *Nat. Commun.* 6, 6866. <https://doi.org/10.1038/ncomms7866>
- Klein, J., Nikolaidis, N., 2005. The descent of the antibody-based immune system by gradual evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 169–174. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408480102>

- Krieckaert, C.L., Nurmohamed, M.T., Wolbink, G.J., 2012. Methotrexate reduces immunogenicity in adalimumab treated rheumatoid arthritis patients in a dose dependent manner. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 1914–1915. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201544>
- Krintel, S.B., Grunert, V.P., Hetland, M.L., Johansen, J.S., Rothfuss, M., Palermo, G., Essioux, L., Klause, U., 2013. The frequency of anti-infliximab antibodies in patients with rheumatoid arthritis treated in routine care and the associations with adverse drug reactions and treatment failure. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 52, 1245–1253. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ket017>
- Kucherlapati, R., Jakobovits, A., Brenner, D.G., Capon, D.J., Klapholz, S., 2000. Human antibodies derived from immunized xenomice. US6150584 A.
- Kumar, S., Mitchell, M.A., Rup, B., Singh, S.K., 2012. Relationship between potential aggregation-prone regions and HLA-DR-binding T-cell immune epitopes: implications for rational design of novel and follow-on therapeutic antibodies. *J. Pharm. Sci.* 101, 2686–2701. <https://doi.org/10.1002/jps.23169>
- Kwekkeboom, J., 2012. Modulation of Dendritic Cells and Regulatory T Cells by Naturally Occurring Antibodies, in: *Naturally Occurring Antibodies (NAbs)*, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer, New York, NY, pp. 133–144. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3461-0_10
- Lajoie, L., Congy-Jolivet, N., Bolzec, A., Gouilleux-Gruart, V., Sicard, E., Sung, H.C., Peiretti, F., Moreau, T., Vié, H., Clémenceau, B., Thibault, G., 2014. ADAM17-mediated shedding of FcγRIIIA on human NK cells: identification of the cleavage site and relationship with activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 192, 741–751. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301024>
- Latvala, S., Jacobsen, B., Otteneider, M.B., Herrmann, A., Kronenberg, S., 2017. Distribution of FcRn Across Species and Tissues. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 65, 321–333. <https://doi.org/10.1369/0022155417705095>
- Lazar, G.A., Dang, W., Karki, S., Vafa, O., Peng, J.S., Hyun, L., Chan, C., Chung, H.S., Eivazi, A., Yoder, S.C., Vielmetter, J., Carmichael, D.F., Hayes, R.J., Dahiyat, B.I., 2006. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4005–4010. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508123103>
- Lecluse, L.L.A., Driessen, R.J.B., Spuls, P.I., de Jong, E.M.G.J., Stapel, S.O., van Doorn, M.B.A., Bos, J.D., Wolbink, G.-J., 2010. Extent and clinical consequences of antibody formation against adalimumab in patients with plaque psoriasis. *Arch. Dermatol.* 146, 127–132. <https://doi.org/10.1001/archdermatol.2009.347>
- Lee, C.-H., Romain, G., Yan, W., Watanabe, M., Charab, W., Todorova, B., Lee, J., Triplett, K., Donkor, M., Lungu, O.I., Lux, A., Marshall, N., Lindorfer, M.A., Goff, O.R.-L., Balbino, B., Kang, T.H., Tanno, H., Delidakis, G., Alford, C., Taylor, R.P., Nimmerjahn, F., Varadarajan, N., Bruhns, P., Zhang, Y.J., Georgiou, G., 2017. IgG Fc domains that bind C1q but not effector Fcγ receptors delineate the importance of complement-mediated effector functions. *Nat. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/ni.3770>
- Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V., Lefranc, G., 2003. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 55–77.
- Li, C., Piran, S., Chen, P., Lang, S., Zarpellon, A., Jin, J.W., Zhu, G., Rehem, A., van der Wal, D.E., Simpson, E.K., Ni, R., Gross, P.L., Ware, J., Ruggeri, Z.M., Freedman, J., Ni, H., 2011. The maternal immune response to fetal platelet GPIbα causes frequent

- miscarriage in mice that can be prevented by intravenous IgG and anti-FcRn therapies. *J. Clin. Invest.* 121, 4537–4547. <https://doi.org/10.1172/JCI57850>
- Li, F., Ulrich, M., Jonas, M., Stone, I.J., Linares, G., Zhang, X., Westendorf, L., Benjamin, D.R., Law, C.-L., 2017. Tumor associated macrophages can contribute to antitumor activity through FcγR-mediated processing of antibody-drug conjugates. *Mol. Cancer Ther.* <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0019>
- Li, N., Zhao, M., Hilario-Vargas, J., Prisanh, P., Warren, S., Diaz, L.A., Roopenian, D.C., Liu, Z., 2005. Complete FcRn dependence for intravenous Ig therapy in autoimmune skin blistering diseases. *J. Clin. Invest.* 115, 3440–3450. <https://doi.org/10.1172/JCI24394>
- Lin, T.S., Flinn, I.W., Modali, R., Lehman, T.A., Webb, J., Waymer, S., Moran, M.E., Lucas, M.S., Farag, S.S., Byrd, J.C., 2005. FCGR3A and FCGR2A polymorphisms may not correlate with response to alemtuzumab in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 105, 289–291. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0651>
- Liu, L., 2017. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Protein Cell.* <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0408-4>
- Liu, X., Lu, L., Yang, Z., Palaniyandi, S., Zeng, R., Gao, L.-Y., Mosser, D.M., Roopenian, D.C., Zhu, X., 2011. The neonatal FcR-mediated presentation of immune-complexed antigen is associated with endosomal and phagosomal pH and antigen stability in macrophages and dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 4674–4686. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003584>
- Loisel, S., Ohresser, M., Pallardy, M., Daydé, D., Berthou, C., Cartron, G., Watier, H., 2007. Relevance, advantages and limitations of animal models used in the development of monoclonal antibodies for cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 62, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2006.11.010>
- Louis, E., El Ghoul, Z., Vermeire, S., Dall'Ozzo, S., Rutgeerts, P., Paintaud, G., Belaiche, J., De Vos, M., Van Gossum, A., Colombel, J.-F., Watier, H., 2004. Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 19, 511–519.
- Lu, J., Chu, J., Zou, Z., Hamacher, N.B., Rixon, M.W., Sun, P.D., 2015. 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, 833–838. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418812112>
- Mahler, H.-C., Friess, W., Grauschopf, U., Kiese, S., 2009. Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis. *J. Pharm. Sci.* 98, 2909–2934. <https://doi.org/10.1002/jps.21566>
- Mahmoud, I.S., Loubser, J., Dower, S.K., Verhagen, A.M., Gleeson, P.A., 2017. Signal dependent transport of a membrane cargo from early endosomes to recycling endosomes. *Eur. J. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.06.005>
- Maloney, D.G., Liles, T.M., Czerwinski, D.K., Waldichuk, C., Rosenberg, J., Grillo-Lopez, A., Levy, R., 1994. Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood* 84, 2457–2466.
- McLaughlin, P., Grillo-López, A.J., Link, B.K., Levy, R., Czuczman, M.S., Williams, M.E., Heyman, M.R., Bence-Bruckler, I., White, C.A., Cabanillas, F., Jain, V., Ho, A.D., Lister, J., Wey, K., Shen, D., Dallaire, B.K., 1998. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 16, 2825–2833. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.8.2825>

- Mimura, Y., Church, S., Ghirlando, R., Ashton, P.R., Dong, S., Goodall, M., Lund, J., Jefferis, R., 2000. 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.
- Minard-Colin, V., Xiu, Y., Poe, J.C., Horikawa, M., Magro, C.M., Hamaguchi, Y., Haas, K.M., Tedder, T.F., 2008. Lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice is mediated by macrophage FcγRI, FcγRIII, and FcγRIV. *Blood* 112, 1205–1213. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-135160>
- Monnet, C., Jorieux, S., Urbain, R., Fournier, N., Bouayadi, K., De Romeuf, C., Behrens, C.K., Fontayne, A., Mondon, P., 2015. Selection of IgG Variants with Increased FcRn Binding Using Random and Directed Mutagenesis: Impact on Effector Functions. *Front. Immunol.* 6, 39. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00039>
- Montacir, O., Montacir, H., Eravci, M., Springer, A., Hinderlich, S., Saadati, A., Parr, M.K., 2017. Comparability study of Rituximab originator and follow-on biopharmaceutical. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 140, 239–251. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.03.029>
- Montes, A., Perez-Pampin, E., Joven, B., Carreira, P., Fernández-Nebro, A., Del Carmen Ordóñez, M., Navarro-Sarabia, F., Moreira, V., Vasilopoulos, Y., Sarafidou, T., Caliz, R., Ferrer, M.A., Cañete, J.D., de la Serna, A.R., Magallares, B., Narváez, J., Gómez-Reino, J.J., Gonzalez, A., 2015. FCGR polymorphisms in the treatment of rheumatoid arthritis with Fc-containing TNF inhibitors. *Pharmacogenomics* 16, 333–345. <https://doi.org/10.2217/pgs.14.175>
- Morita, J., Tanaka, M., Nomoto, M., Matsuki, S., Tsuru, T., Matsuguma, K., Shiramoto, M., 2016. Pharmacokinetic Bioequivalence, Safety, and Immunogenicity of DMB-3111, a Trastuzumab Biosimilar, and Trastuzumab in Healthy Japanese Adult Males: Results of a Randomized Trial. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* 30, 17–25. <https://doi.org/10.1007/s40259-015-0153-2>
- Mould, D.R., Green, B., 2010. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies: concepts and lessons for drug development. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* 24, 23–39. <https://doi.org/10.2165/11530560-000000000-00000>
- Mulleman, D., Chu Miow Lin, D., Ducourau, E., Emond, P., Ternant, D., Magdelaine-Beuzelin, C., Valat, J.-P., Painsaud, G., Goupille, P., 2010. Trough infliximab concentrations predict efficacy and sustained control of disease activity in rheumatoid arthritis. *Ther. Drug Monit.* 32, 232–236. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e3181cc6fef>
- Musolino, A., Naldi, N., Bortesi, B., Pezzuolo, D., Capelletti, M., Missale, G., Laccabue, D., Zerbini, A., Camisa, R., Bisagni, G., Neri, T.M., Ardizzoni, A., 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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 1789–1796. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.8957>
- Nelms, B., Dalomba, N.F., Lencer, W., 2017. A targeted RNAi screen identifies factors affecting diverse stages of receptor-mediated transcytosis. *J. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1083/jcb.201609035>
- Neuberger, M.S., Rabbitts, T.H., 1993. Production d'anticorps chimeriques. EP0194276 B1.
- Newton, E.E., Wu, Z., Simister, N.E., 2005. Characterization of basolateral-targeting signals in the neonatal Fc receptor. *J. Cell Sci.* 118, 2461–2469. <https://doi.org/10.1242/jcs.02367>

- Ng, T., Chan, M., Khor, C.C., Ho, H.K., Chan, A., 2014. The genetic variants underlying breast cancer treatment-induced chronic and late toxicities: a systematic review. *Cancer Treat. Rev.* 40, 1199–1214. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.10.001>
- Niwa, R., Satoh, M., 2015. The current status and prospects of antibody engineering for therapeutic use: focus on glycoengineering technology. *J. Pharm. Sci.* 104, 930–941. <https://doi.org/10.1002/jps.24316>
- Nixon, A.E., Chen, J., Sexton, D.J., Muruganandam, A., Bitonti, A.J., Dumont, J., Viswanathan, M., Martik, D., Wassaf, D., Mezo, A., Wood, C.R., Biedenkapp, J.C., TenHoor, C., 2015. Fully human monoclonal antibody inhibitors of the neonatal fc receptor reduce circulating IgG in non-human primates. *Front. Immunol.* 6, 176. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00176>
- Notkins, A.L., 2004. Polyreactivity of antibody molecules. *Trends Immunol.* 25, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.02.004>
- Obrezanova, O., Arnell, A., de la Cuesta, R.G., Berthelot, M.E., Gallagher, T.R.A., Zurdo, J., Stallwood, Y., 2015. Aggregation risk prediction for antibodies and its application to biotherapeutic development. *mAbs* 7, 352–363. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1007828>
- Oganesyan, V., Damschroder, M.M., Cook, K.E., Li, Q., Gao, C., Wu, H., Dall'Acqua, W.F., 2014. Structural insights into neonatal Fc receptor-based recycling mechanisms. *J. Biol. Chem.* 289, 7812–7824. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.537563>
- Ogata, A., Tanimura, K., Sugimoto, T., Inoue, H., Urata, Y., Matsubara, T., Kondo, M., Ueki, Y., Iwahashi, M., Tohma, S., Ohta, S., Saeki, Y., Tanaka, T., Musashi Study Investigators, 2014. Phase III study of the efficacy and safety of subcutaneous versus intravenous tocilizumab monotherapy in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res.* 66, 344–354. <https://doi.org/10.1002/acr.22110>
- Okazaki, A., Shoji-Hosaka, E., Nakamura, K., Wakitani, M., Uchida, K., Kakita, S., Tsumoto, K., Kumagai, I., Shitara, K., 2004. Fucose depletion from human IgG1 oligosaccharide enhances binding enthalpy and association rate between IgG1 and FcγRIIIa. *J. Mol. Biol.* 336, 1239–1249. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.01.007>
- Passot, C., Azzopardi, N., Renault, S., Baroukh, N., Arnoult, C., Ohresser, M., Boisdron-Celle, M., Gamelin, E., Watier, H., Paintaud, G., Gouilleux-Gruart, V., 2013. Influence of FCGRT gene polymorphisms on pharmacokinetics of therapeutic antibodies. *mAbs* 5, 614–619. <https://doi.org/10.4161/mabs.24815>
- Paul, R., Graff-Meyer, A., Stahlberg, H., Lauer, M.E., Rufer, A.C., Beck, H., Briguet, A., Schnaible, V., Buckel, T., Boeckle, S., 2012. Structure and function of purified monoclonal antibody dimers induced by different stress conditions. *Pharm. Res.* 29, 2047–2059. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0732-6>
- Petermann, M.L., 1946. The splitting of human gamma globulin antibodies by papain and bromelin. *J. Am. Chem. Soc.* 68, 106–113.
- Pisupati, K., Tian, Y., Okbazghi, S., Benet, A., Ackermann, R., Ford, M., Saveliev, S., Hosfield, C.M., Urh, M., Carlson, E., Becker, C., Tolbert, T.J., Schwendeman, S.P., Ruotolo, B.T., Schwendeman, A., 2017. A Multidimensional Analytical Comparison of Remicade and the Biosimilar Remsima. *Anal. Chem.* 89, 4838–4846. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04436>
- Plavina, T., Fox, E.J., Lucas, N., Muralidharan, K.K., Mikol, D., 2016. A Randomized Trial Evaluating Various Administration Routes of Natalizumab in Multiple Sclerosis. *J. Clin. Pharmacol.* 56, 1254–1262. <https://doi.org/10.1002/jcph.707>
- Pointreau, Y., Azzopardi, N., Ternant, D., Calais, G., Paintaud, G., 2016. Cetuximab Pharmacokinetics Influences Overall Survival in Patients With Head and Neck

- Cancer. Ther. Drug Monit. 38, 567–572. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000321>
- Pommié, C., Levadoux, S., Sabatier, R., Lefranc, G., Lefranc, M.-P., 2004. IMGT standardized criteria for statistical analysis of immunoglobulin V-REGION amino acid properties. *J. Mol. Recognit. JMR* 17, 17–32. <https://doi.org/10.1002/jmr.647>
- Pottier, J., Watier, H., 2014. Unexplained abuses of human IgG subclass denomination in antibody patents. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* 28, 327–329. <https://doi.org/10.1007/s40259-014-0095-0>
- Pouw, M.F., Krieckaert, C.L., Nurmohamed, M.T., van der Kleij, D., Aarden, L., Rispen, T., Wolbink, G., 2015. Key findings towards optimising adalimumab treatment: the concentration-effect curve. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 513–518. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204172>
- Qiao, S.-W., Kobayashi, K., Johansen, F.-E., Sollid, L.M., Andersen, J.T., Milford, E., Roopenian, D.C., Lencer, W.I., Blumberg, R.S., 2008. Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9337–9342. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801717105>
- Radaev, S., Motyka, S., Fridman, W.H., Sautes-Fridman, C., Sun, P.D., 2001. The structure of a human type III Fcγ receptor in complex with Fc. *J. Biol. Chem.* 276, 16469–16477. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100350200>
- Ramsland, P.A., Farrugia, W., Bradford, T.M., Sardjono, C.T., Esparon, S., Trist, H.M., Powell, M.S., Tan, P.S., Cendron, A.C., Wines, B.D., Scott, A.M., Hogarth, P.M., 2011. Structural basis for Fc γ₂RIIIa recognition of human IgG and formation of inflammatory signaling complexes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187, 3208–3217. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101467>
- Ravetch, J.V., Bolland, S., 2001. IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 275–290. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.275>
- Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Théry, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Amigorena, S., 1999. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 189, 371–380.
- Reilly, A.F., Norris, C.F., Surrey, S., Bruchak, F.J., Rappaport, E.F., Schwartz, E., McKenzie, S.E., 1994. Genetic diversity in human Fc receptor II for immunoglobulin G: Fc γ₂ receptor IIA ligand-binding polymorphism. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1, 640–644.
- Robbie, G.J., Criste, R., Dall’acqua, W.F., Jensen, K., Patel, N.K., Losonsky, G.A., Griffin, M.P., 2013. A novel investigational Fc-modified humanized monoclonal antibody, motavizumab-YTE, has an extended half-life in healthy adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 6147–6153. <https://doi.org/10.1128/AAC.01285-13>
- Roghanian, A., Teige, I., Mårtensson, L., Cox, K.L., Kovacek, M., Ljungars, A., Mattson, J., Sundberg, A., Vaughan, A.T., Shah, V., Smyth, N.R., Sheth, B., Chan, H.T.C., Li, Z.-C., Williams, E.L., Manfredi, G., Oldham, R.J., Mockridge, C.I., James, S.A., Dahal, L.N., Hussain, K., Nilsson, B., Verbeek, J.S., Juliusson, G., Hansson, M., Jerkeman, M., Johnson, P.W.M., Davies, A., Beers, S.A., Glennie, M.J., Frendéus, B., Cragg, M.S., 2015. Antagonistic human FcγRIIB (CD32B) antibodies have anti-tumor activity and overcome resistance to antibody therapy in vivo. *Cancer Cell* 27, 473–488. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.005>
- Roopenian, D.C., Akilesh, S., 2007. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 715–725. <https://doi.org/10.1038/nri2155>

- Roopenian, D.C., Christianson, G.J., Sproule, T.J., Brown, A.C., Akilesh, S., Jung, N., Petkova, S., Avanesian, L., Choi, E.Y., Shaffer, D.J., Eden, P.A., Anderson, C.L., 2003. The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs. *J. Immunol. Baltim. Md* 170, 3528–3533.
- Rosenberg, A.S., 2006. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J.* 8, E501–507. <https://doi.org/10.1208/aapsj080359>
- Rubin, J., Linden, L., Coco, W.M., Bommarius, A.S., Behrens, S.H., 2013. Salt-induced aggregation of a monoclonal human immunoglobulin G1. *J. Pharm. Sci.* 102, 377–386. <https://doi.org/10.1002/jps.23363>
- Ryan, A.M., Eppler, D.B., Hagler, K.E., Bruner, R.H., Thomford, P.J., Hall, R.L., Shopp, G.M., O'Neill, C.A., 1999. Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody. *Toxicol. Pathol.* 27, 78–86. <https://doi.org/10.1177/019262339902700115>
- Salar, A., Avivi, I., Bittner, B., Bouabdallah, R., Brewster, M., Catalani, O., Follows, G., Haynes, A., Hourcade-Potelleret, F., Janikova, A., Larouche, J.-F., McIntyre, C., Pedersen, M., Pereira, J., Sayyed, P., Shpilberg, O., Tumyan, G., 2014. Comparison of subcutaneous versus intravenous administration of rituximab as maintenance treatment for follicular lymphoma: results from a two-stage, phase IB study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 32, 1782–1791. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.52.2631>
- Sanderson, R.J., Hering, M.A., James, S.F., Sun, M.M.C., Doronina, S.O., Siadak, A.W., Senter, P.D., Wahl, A.F., 2005. In vivo drug-linker stability of an anti-CD30 dipeptide-linked auristatin immunoconjugate. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 843–852.
- Sands, B.E., Sandborn, W.J., Creed, T.J., Dayan, C.M., Dhanda, A.D., Van Assche, G.A., Greguš, M., Sood, A., Choudhuri, G., Stempien, M.J., Levitt, D., Probert, C.S., 2012. Basiliximab does not increase efficacy of corticosteroids in patients with steroid-refractory ulcerative colitis. *Gastroenterology* 143, 356–364.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.04.043>
- Saxena, A., Wu, D., 2016. Advances in Therapeutic Fc Engineering - Modulation of IgG-Associated Effector Functions and Serum Half-life. *Front. Immunol.* 7, 580. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00580>
- Sazinsky, S.L., Ott, R.G., Silver, N.W., Tidor, B., Ravetch, J.V., Wittrup, K.D., 2008. Aglycosylated immunoglobulin G1 variants productively engage activating Fc receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 20167–20172. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809257105>
- Schaefferbeke, T., Truchetet, M.-E., Kostine, M., Barnette, T., Bannwarth, B., Richez, C., 2015. Immunogenicity of biologic agents in rheumatoid arthritis patients: lessons for clinical practice. *Rheumatol. Oxf. Engl.* <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kev277>
- Schellekens, H., 2005. Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 20 Suppl 6, vi3–9. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfh1092>
- Schlothauer, T., Herter, S., Koller, C.F., Grau-Richards, S., Steinhart, V., Spick, C., Kubbies, M., Klein, C., Umaña, P., Mössner, E., 2016. Novel human IgG1 and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished immune effector functions. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS.* <https://doi.org/10.1093/protein/gzw040>
- Schlothauer, T., Rueger, P., Stracke, J.O., Hertenberger, H., Fingas, F., Kling, L., Emrich, T., Drabner, G., Seeber, S., Auer, J., Koch, S., Papadimitriou, A., 2013. Analytical FcRn affinity chromatography for functional characterization of monoclonal antibodies. *mAbs* 5, 576–586. <https://doi.org/10.4161/mabs.24981>

- Schmidt, E., Hennig, K., Mengede, C., Zillikens, D., Kromminga, A., 2009. Immunogenicity of rituximab in patients with severe pemphigus. *Clin. Immunol.* Orlando Fla 132, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.05.007>
- Schoch, A., Kettenberger, H., Mundigl, O., Winter, G., Engert, J., Heinrich, J., Emrich, T., 2015. Charge-mediated influence of the antibody variable domain on FcRn-dependent pharmacokinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 5997–6002. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408766112>
- Schwab, I., Nimmerjahn, F., 2013. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nat. Rev. Immunol.* 13, 176–189. <https://doi.org/10.1038/nri3401>
- Sengul, I., Akcay-Yalbuздag, S., Ince, B., Goksel-Karatepe, A., Kaya, T., 2015. Comparison of the DAS28-CRP and DAS28-ESR in patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* 18, 640–645. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.12695>
- Shah, D.K., Betts, A.M., 2013. Antibody biodistribution coefficients: inferring tissue concentrations of monoclonal antibodies based on the plasma concentrations in several preclinical species and human. *mAbs* 5, 297–305. <https://doi.org/10.4161/mabs.23684>
- Shefet-Carasso, L., Benhar, I., 2015. Antibody-targeted drugs and drug resistance—Challenges and solutions. *Drug Resist. Updat.* 18, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2014.11.001>
- Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J.A., Presta, L.G., 2001. 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, 6591–6604. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009483200>
- Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M., Hanai, N., Shitara, K., 2003. 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, 3466–3473. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210665200>
- Simister, N.E., 2003. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 21, 3365–3369.
- Simister, N.E., Mostov, K.E., 1989. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature* 337, 184–187. <https://doi.org/10.1038/337184a0>
- simulect.pdf, n.d.
- Sjögren, J., Cosgrave, E.F.J., Allhorn, M., Nordgren, M., Björk, S., Olsson, F., Fredriksson, S., Collin, M., 2015. EndoS and EndoS2 hydrolyze Fc-glycans on therapeutic antibodies with different glycoform selectivity and can be used for rapid quantification of high-mannose glycans. *Glycobiology* 25, 1053–1063. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv047>
- Stopforth, R.J., Cleary, K.L.S., Cragg, M.S., 2016. Regulation of Monoclonal Antibody Immunotherapy by FcγRIIB. *J. Clin. Immunol.* 36 Suppl 1, 88–94. <https://doi.org/10.1007/s10875-016-0247-8>
- Storz, U., 2016. Intellectual property issues of immune checkpoint inhibitors. *mAbs* 8, 10–26. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1107688>
- Stüber, E., Strober, W., 1996. The T cell-B cell interaction via OX40-OX40L is necessary for the T cell-dependent humoral immune response. *J. Exp. Med.* 183, 979–989.
- Suntharalingam, G., Perry, M.R., Ward, S., Brett, S.J., Castello-Cortes, A., Brunner, M.D., Panoskaltsis, N., 2006. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N. Engl. J. Med.* 355, 1018–1028. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa063842>

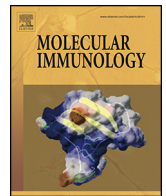
- Tamura, K., Shimizu, C., Hojo, T., Akashi-Tanaka, S., Kinoshita, T., Yonemori, K., Kouno, T., Katsumata, N., Ando, M., Aogi, K., Koizumi, F., Nishio, K., Fujiwara, Y., 2011. FcγR2A and 3A polymorphisms predict clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic settings in patients with HER2-positive breast cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 22, 1302–1307. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq585>
- Tebbey, P.W., Varga, A., Naill, M., Clewell, J., Venema, J., 2015. Consistency of quality attributes for the glycosylated monoclonal antibody Humira® (adalimumab). *mAbs* 7, 805–811. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1073429>
- Ternant, D., Arnoult, C., Pugnière, M., Dhommée, C., Drocourt, D., Perouzel, E., Passot, C., Baroukh, N., Mulleman, D., Tiraby, G., Watier, H., Pintaud, G., Gouilleux-Gruart, V., 2016. IgG1 Allotypes Influence the Pharmacokinetics of Therapeutic Monoclonal Antibodies through FcRn Binding. *J. Immunol.* 196, 607–613. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501780>
- Ternant, D., Ducourau, E., Fuzibet, P., Vignault, C., Watier, H., Lequerré, T., Le Loët, X., Vittecoq, O., Goupille, P., Mulleman, D., Pintaud, G., 2015. Pharmacokinetics and concentration-effect relationship of adalimumab in rheumatoid arthritis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 79, 286–297. <https://doi.org/10.1111/bcp.12509>
- Ternant, D., Pintaud, G., 2005. Pharmacokinetics and concentration-effect relationships of therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins. *Expert Opin. Biol. Ther.* 5 Suppl 1, S37-47. <https://doi.org/10.1517/14712598.5.1.S37>
- Thurlings, R.M., Teng, O., Vos, K., Gerlag, D.M., Aarden, L., Stapel, S.O., Laar, J.M. van, Tak, P.P., Wolbink, G.J., 2009. Clinical response, pharmacokinetics, development of human anti-chimeric antibodies, and synovial tissue response to rituximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* <https://doi.org/10.1136/ard.2009.109041>
- Torkashvand, F., Vaziri, B., Maleknia, S., Heydari, A., Vossoughi, M., Davami, F., Mahboudi, F., 2015. Designed Amino Acid Feed in Improvement of Production and Quality Targets of a Therapeutic Monoclonal Antibody. *PloS One* 10, e0140597. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140597>
- Tout, M., Casasnovas, O., Meignan, M., Lamy, T., Morschhauser, F., Salles, G., Gyan, E., Haioun, C., Mercier, M., Feugier, P., Boussetta, S., Pintaud, G., Ternant, D., Cartron, G., 2017a. Rituximab exposure is influenced by baseline metabolic tumor volume and predicts outcome of DLBCL patients: a Lymphoma Study Association report. *Blood* 129, 2616–2623. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-744292>
- Tout, M., Gagez, A.-L., Leprêtre, S., Gouilleux-Gruart, V., Azzopardi, N., Delmer, A., Mercier, M., Ysebaert, L., Laribi, K., Gonzalez, H., Pintaud, G., Cartron, G., Ternant, D., 2017b. Influence of FCGR3A-158V/F Genotype and Baseline CD20 Antigen Count on Target-Mediated Elimination of Rituximab in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia: A Study of FILO Group. *Clin. Pharmacokinet.* 56, 635–647. <https://doi.org/10.1007/s40262-016-0470-8>
- Tsuchida, D., Yamazaki, K., Akashi, S., 2016. Comprehensive Characterization of Relationship Between Higher-Order Structure and FcRn Binding Affinity of Stress-Exposed Monoclonal Antibodies. *Pharm. Res.* 33, 994–1002. <https://doi.org/10.1007/s11095-015-1845-5>
- Tudor, D., Bomsel, M., 2011. The broadly neutralizing HIV-1 IgG 2F5 elicits gp41-specific antibody-dependent cell cytotoxicity in a FcγRI-dependent manner. *AIDS Lond. Engl.* 25, 751–759. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32834507bd>

- Umaña, P., Jean-Mairet, J., Moudry, R., Amstutz, H., Bailey, J.E., 1999. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat. Biotechnol.* 17, 176–180. <https://doi.org/10.1038/6179>
- Unkeless, J.C., Shen, Z., Lin, C.W., DeBeus, E., 1995. Function of human Fc gamma RIIA and Fc gamma RIIB. *Semin. Immunol.* 7, 37–44.
- Usta, C., Turgut, N.T., Bedel, A., 2016. How abciximab might be clinically useful. *Int. J. Cardiol.* 222, 1074–1078. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.07.213>
- Van den Herik-Oudijk, I.E., Ter Bekke, M.W., Tempelman, M.J., Capel, P.J., Van de Winkel, J.G., 1995. Functional differences between two Fc receptor ITAM signaling motifs. *Blood* 86, 3302–3307.
- van der Pol, W., van de Winkel, J.G., 1998. IgG receptor polymorphisms: risk factors for disease. *Immunogenetics* 48, 222–232.
- van Meer, P.J.K., Kooijman, M., Brinks, V., Gispen-de Wied, C.C., Silva-Lima, B., Moors, E.H.M., Schellekens, H., 2013. Immunogenicity of mAbs in non-human primates during nonclinical safety assessment. *mAbs* 5, 810–816. <https://doi.org/10.4161/mabs.25234>
- van Schie, K.A., Ooijevaar-de Heer, P., Dijk, L., Kruithof, S., Wolbink, G., Rispen, T., 2016. Therapeutic TNF Inhibitors can Differentially Stabilize Trimeric TNF by Inhibiting Monomer Exchange. *Sci. Rep.* 6, 32747. <https://doi.org/10.1038/srep32747>
- van Schouwenburg, P.A., Krieckaert, C.L., Rispen, T., Aarden, L., Wolbink, G.J., Wouters, D., 2013. Long-term measurement of anti-adalimumab using pH-shift-anti-idiotypic antigen binding test shows predictive value and transient antibody formation. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 1680–1686. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202407>
- Vectibix, INN-panitumumab - WC500047710.pdf, n.d.
- Vega, M.I., Huerta-Yepe, S., Martinez-Paniagua, M., Martinez-Miguel, B., Hernandez-Pando, R., González-Bonilla, C.R., Chinn, P., Hanna, N., Hariharan, K., Jazirehi, A.R., Bonavida, B., 2009. Rituximab-mediated cell signaling and chemo/immunosensitization of drug-resistant B-NHL is independent of its Fc functions. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 6582–6594. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1234>
- Wang, Q., Chen, Y., Pelletier, M., Cvitkovic, R., Bonnell, J., Chang, C.-Y., Koksai, A.C., O'Connor, E., Gao, X., Yu, X.-Q., Wu, H., Stover, C.K., Dall'Acqua, W.F., Xiao, X., 2017. Enhancement of antibody functions through Fc multiplications. *mAbs* 9, 393–403. <https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1281505>
- Wang, Q., Chen, Y., Xie, F., Ge, Y., Wang, X., Zhang, X., 2009. A novel agonist anti-human OX40L monoclonal antibody that stimulates T cell proliferation and enhances cytokine secretion. *Hybrid.* 2005 28, 269–276. <https://doi.org/10.1089/hyb.2009.0013>
- Wang, W., Lu, P., Fang, Y., Hamuro, L., Pittman, T., Carr, B., Hochman, J., Prueksaritanont, T., 2011. Monoclonal antibodies with identical Fc sequences can bind to FcRn differentially with pharmacokinetic consequences. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 39, 1469–1477. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.039453>
- Wang, W., Wang, E., Balthasar, J., 2008. Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 84, 548–558. <https://doi.org/10.1038/clpt.2008.170>
- Wang, X., Das, T.K., Singh, S.K., Kumar, S., 2009. Potential aggregation prone regions in biotherapeutics: A survey of commercial monoclonal antibodies. *mAbs* 1, 254–267.
- Ward, E.S., Ober, R.J., 2017. Hepatic function of FcRn revealed: Implications for overcoming drug-mediated hepatotoxicity. *Hepatol. Baltim. Md.* <https://doi.org/10.1002/hep.29476>
- Warmerdam, P.A., van de Winkel, J.G., Gosselin, E.J., Capel, P.J., 1990. Molecular basis for a polymorphism of human Fc gamma receptor II (CD32). *J. Exp. Med.* 172, 19–25.

- Westermaier, Y., Veurink, M., Riis-Johannessen, T., Guinchard, S., Gurny, R., Scapozza, L., 2013. Identification of aggregation breakers for bevacizumab (Avastin®) self-association through similarity searching and interaction studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV 85*, 773–780. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.04.012>
- White, A.L., Beers, S.A., Cragg, M.S., 2014a. FcγRIIB as a key determinant of agonistic antibody efficacy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 382, 355–372. https://doi.org/10.1007/978-3-319-07911-0_16
- White, A.L., Dou, L., Chan, H.T.C., Field, V.L., Mockridge, C.I., Moss, K., Williams, E.L., Booth, S.G., French, R.R., Potter, E.A., Butts, C., Al-Shamkhani, A., Cragg, M.S., Verbeek, J.S., Johnson, P.W.M., Glennie, M.J., Beers, S.A., 2014b. Fcγ receptor dependency of agonistic CD40 antibody in lymphoma therapy can be overcome through antibody multimerization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 1828–1835. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303204>
- Winter, G.P., 1987. Recombinant antibodies and methods for their production. EP0239400 A2.
- Yervoy - FDA prescribing information, side effects and uses [WWW Document], n.d. . Drugs.com. URL <https://www.drugs.com/pro/yervoy.html> (accessed 8.9.17).
- Younes, A., Bartlett, N.L., Leonard, J.P., Kennedy, D.A., Lynch, C.M., Sievers, E.L., Forero-Torres, A., 2010. Brentuximab vedotin (SGN-35) for relapsed CD30-positive lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 363, 1812–1821. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1002965>
- Zalevsky, J., Chamberlain, A.K., Horton, H.M., Karki, S., Leung, I.W.L., Sproule, T.J., Lazar, G.A., Roopenian, D.C., Desjarlais, J.R., 2010. Enhanced antibody half-life improves in vivo activity. *Nat. Biotechnol.* 28, 157–159. <https://doi.org/10.1038/nbt.1601>
- Zhang, W., Gordon, M., Schultheis, A.M., Yang, D.Y., Nagashima, F., Azuma, M., Chang, H.-M., Borucka, E., Lurje, G., Sherrod, A.E., Iqbal, S., Groshen, S., Lenz, H.-J., 2007. 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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 3712–3718. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.08.8021>
- Zhao, H., Gulesserian, S., Malinao, M.C., Kumar-Ganesan, S., Song, J., Chang, M.S., Williams, M.M., Zeng, Z., Mattie, M., Mendelsohn, B.A., Stover, D.R., Doñate, F., 2017. A Potential Mechanism for ADC-Induced Neutropenia: Role of Neutrophils in Their Own Demise. *Mol. Cancer Ther.* <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0133>
- Zheng, K., Bantog, C., Bayer, R., 2011. The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. *mAbs* 3, 568–576. <https://doi.org/10.4161/mabs.3.6.17922>
- Ziakas, P.D., Poulou, L.S., Zintzaras, E., 2016. FcγRIIa-H131R variant is associated with inferior response in diffuse large B cell lymphoma: A meta-analysis of genetic risk. *J. BUON Off. J. Balk. Union Oncol.* 21, 1454–1458.
- Zorrilla, S., Rivas, G., Acuña, A.U., Lillo, M.P., 2004. Protein self-association in crowded protein solutions: a time-resolved fluorescence polarization study. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 13, 2960–2969. <https://doi.org/10.1110/ps.04809404>

I. Annexes

Annexe 1: Eculizumab epitope on complement C5: Progress towards a better understanding of the mechanism of action



Eculizumab epitope on complement C5: Progress towards a better understanding of the mechanism of action

Guillaume Brachet (MS)^{a,b,c}, Thomas Bourquard (PhD)^d, Nathalie Gallay^d,
Eric Reiter (PhD)^d, Valérie Gouilleux-Gruart (PhD)^{a,b,c}, Anne Poupon (PhD)^d,
Hervé Watier (MD, PhD) (Prof.)^{a,b,c,*}

^a CHRU de Tours, Laboratoire d'Immunologie, 2 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours Cedex 1, France

^b Université François-Rabelais de Tours, France

^c CNRS UMR 7292 Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer, Faculté de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours Cedex 1, France

^d PRC, INRA, CNRS, IFCE, Université de Tours, 37380, Nouzilly, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2016

Received in revised form 25 July 2016

Accepted 26 July 2016

Keywords:

Eculizumab

Complement C5

Molecular docking

Conformational epitope

Mechanism of action

Therapeutic antibody

ABSTRACT

Eculizumab is an anti-complement C5 monoclonal antibody which has greatly improved the prognosis and outcomes of nocturnal paroxysmal hemoglobinuria and atypical hemolytic and uremic syndromes. It is also known to be very species-specific for human C5, despite an important degree of conservation of the targeted macroglobulin domain, MG7, with that of other primates. However, the published eculizumab linear epitope does not explain this species specificity. Sequence analysis, *in silico* docking and reverse phase protein array were implemented to fully characterize the eculizumab epitope on human complement C5.

Several residues potentially involved in the species specificity were identified outside the known epitope by sequence analysis. *In silico* docking confirmed the implication of a beta-hairpin located between residues 913 and 922, outside the known epitope, in the binding of eculizumab to C5. This beta-hairpin spreads from S913 to I922 and contains a tryptophan residue on position 917 which is unique to humans. The contribution of both this peptide and the already known one epitope, which spreads between residues C883 and S891, was validated by reverse phase protein assay, clearly demonstrating the discontinuous nature of the epitope. Two residues in particular, Arg885 and Trp917, were defined as major participants in the interaction of C5 and eculizumab. Their important role was confirmed by the recent publication of a crystal structure of eculizumab Fab bound to C5. The beta-hairpin not only explains the fine species specificity of eculizumab but is also an important site at the C5/C5 convertase interface, revealing how eculizumab acts as a competitor of C5 convertases.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: aHUS, atypical hemolytic and uremic syndrome; C5, complement protein C5; CDR, complementarity determining region; CVF, cobra venom factor; DMSO, dimethylsulfoxide; ECZ, eculizumab; Fab, fragment antigen binding; Fv, fragment variable; mAb, monoclonal antibody; MG, macroglobulin; NPH, nocturnal paroxysmal hemoglobinuria; PBST, phosphate buffer saline added with tween; RPPA, reverse phase protein assay; RT, room temperature; VH, heavy chain variable fragment; VL, light chain variable fragment.

* Correspondence author at: Laboratoire d'immunologie, CHRU Bretonneau, 2 Boulevard Tonnellé 37044, Tours Cedex 9, France.

E-mail addresses:

guillaume.brachet-8@etu.univ-tours.fr (G. Brachet), thomas.bourquard@gmail.com (T. Bourquard), neta.langonne@sfr.fr (N. Gallay), eric.reiter@tours.inra.fr (E. Reiter), valerie.gouilleux@univ-tours.fr (V. Gouilleux-Gruart), anne.poupon@tours.inra.fr (A. Poupon), watier@med.univ-tours.fr (H. Watier).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2016.07.016>

0161-5890/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Eculizumab (ECZ) is an anti-complement C5 monoclonal antibody (mAb) indicated in nocturnal paroxysmal hemoglobinuria (NPH) and in atypical hemolytic and uremic syndromes (aHUS). It has greatly improved the life quality of NPH patients (Hillmen et al., 2004; Wong and Kavanagh, 2015), and the outcome of aHUS (Gruppo and Rother, 2009; Wong et al., 2013; Zuber et al., 2012). However, cases of primary non-responses to this treatment have been described in a small proportion of patients (Burwick et al., 2014; Nishimura et al., 2014), and were attributed to a point mutation in C5. This mutation lies in the MG7 domain, where the epitope of ECZ was located using overlapping peptide blot binding analyses (Evans et al., 2002; Nishimura et al., 2014). Unfortunately, this “KSSKC” epitope, encompassing residues 874–890, is included in

the 871–882 sequence, whose structure was precisely unresolved in the only available crystal of native C5 (Fredslund et al., 2008).

ECZ is known to be very specific for human C5. Indeed, it is unable to inhibit complement-mediated hemolysis of sensitized red blood cells in the presence of serum from chimpanzee, baboon, rhesus and cynomolgus monkeys, suggesting that ECZ does not bind to the C5 of these species (European Medicines Agency, 2015). Surprisingly, chimpanzee C5 only differs from human C5 by two aminoacids in the MG7 domain, and these residues are located outside the known ECZ “KSSKC” epitope, suggesting that additional residues contribute to ECZ binding.

In order to demonstrate this hypothesis and to revisit the ECZ epitope, a set of orthogonal techniques were implemented, combining sequence analysis, protein-protein docking studies and targeted peptide mapping of ECZ epitope. We demonstrate that the ECZ epitope is conformational and involves two discontinuous segments of the C5 MG7 domain.

2. Methods

2.1. Bioinformatics analyses

All complement C5 protein sequences were obtained from the NCBI Database. They were aligned using the ClustalO multiple sequence alignment tool using the default settings (Sievers et al., 2011). The two crystals of C5 in complex with various inhibitors or stabilizing molecules were found in the Protein Data Bank, under the accession numbers 3PRX and 3CU7 (Fredslund et al., 2008; Laursen et al., 2011). The structure published by Fredslund et al. is a complex comprising native C5 in a relaxed form and a C5 inhibitor from a tick, with a missing loop between aminoacid residues 871 and 882. The structure 3PRX, published by Laursen et al. is a complex between a tense form of native C5, the cobra venom factor and an inhibitor from *Staphylococcus aureus* called SSL7, comprising the conformational information for the 871–882 loop. These structures were analyzed and the 3D representations were made using PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC).

2.2. Protein-protein docking

The structure of ECZ was modeled by homology using Protein Data Bank (PDB) structures 1IT9 (77% sequence identity) for VH and 4KMT (85% sequence identity) for VL. The structure 3CU7 was used for complement C5 (Fredslund et al., 2008). The missing loop in the 3CU7 C5 structure was modeled using the conformation of this loop in the structure 3PRX. In both cases, the software Modeller was used (Webb and Sali, 2014). The method PRIOR was used for docking (Bourquard et al., 2014).

2.3. Reverse phase protein arrays

Peptides (sequences: ⁹¹³SLETWFGKE⁹²¹, C5-pep1; ⁸⁸³CVRQKVEGS⁸⁹¹, C5-pep2; and VSYQTKVNLL as irrelevant peptide (irr-pep)) were designed from docking results and synthesized by custom services (GeneCust). Serial 4-fold dilutions were done in Protein Printing buffer (Arrayit® corporation, Sunnyvale, CA, USA) and aliquoted into 384-well plates. A serial 4-fold dilution of C5 (ref. A403, Quidel, San Diego, CA, USA) was used as a positive control. Desiccated nitrocellulose-coated slides (Fast®Slides, Scienion, ref: 10485320) were printed with samples using a SpotBot® 3 Extreme Protein Edition arrayer (Arrayit®) following the manufacturer's instructions and desiccated again overnight. Then, slides were immunodetected as described previously with some minor changes in the procedure (Dupuy et al., 2009). Briefly, after rehydration with PBS-Tween 20 0.1% (PBST), slides were

blocked for 3 h at room temperature (RT) with 0.5% Western Blast® blocking reagent (Perkin Elmer, ref. NEL761001KT) in PBST. Slides were then probed overnight at 4 °C with ECZ (0.02 mg/mL) or PBST as a negative control. After three washes, peroxidase-conjugated goat anti-human F(ab')₂ (1:2000) (Jackson ImmunoResearch Europe, ref: 715-166-151) was added for 1 h at RT. For signal amplification, they were incubated for 15 min at RT with Western Blast® amplification reagent, followed by six rinses and one wash in PBST 20% DMSO and two supplementary washes in PBST. Slides were then probed for 1 h at RT with streptavidin AlexaFluor® 680 conjugate at 0.5 µg/mL (Molecular Probes, S32358) and washed three times in PBST before air-drying by centrifugation (2500 rpm, 25 min). Acquisition was performed by scanning slides at 700 nm with an InnoScan® 710-IR (Innopsys). Images were analyzed with Mapix software (Innopsys) and the median value of fluorescence intensity at 700 nm (F700) was quantified for two duplicated spots for each condition. Local background intensity (B700) was subtracted and signals were considered significant when the F700/B700 ratio was >1.8. Then signal obtained with the secondary antibody alone was subtracted from signals with ECZ, that were expressed as F700 median intensity mean ± SEM of duplicates in GraphPad Prism 5 software.

3. Results

3.1. C5 MG7 domain sequence analysis

Sequences of the MG7 domains from human and non-human primates (NHP) C5 were aligned (Fig. 1.). The sequence of marmoset, a new world monkey (platyrrhini), showed the lowest degree of identity (88%). A higher level of conservation is observed amongst old world primates (Catarrhini), with a low number of mutations as compared with the human sequence: only two for chimpanzee C5 (98% identity), four for gibbon, macaque and baboon C5 (96% identity), and six for orangutans (94% identity), which is surprising since Ponginae are closer to Homininae than are Hylobates (gibbon) and Cercopithecids (macaque and baboon). For example, positions 825, 885, 886 and 911 are unique to orangutans, although position 885 is known to be polymorphic in humans (black arrow in Fig. 1, Nishimura et al., 2014). Position 898 is unique to gibbons, position 904 unique to chimpanzees and position 917 unique to humans. The latter residue therefore appears as an ideal candidate to explain the extreme species specificity of ECZ, as no difference distinguishing human C5 from that of all other primates can be seen within the “KSSKC” epitope (framed in Fig. 1). However, this does not exclude a more subtle hypothesis. Indeed, the lack of efficacy of ECZ in NHP could also be due to variations of close residues, like 904 (inefficacy to block complement-mediated lysis in chimpanzees) and 908 (inefficacy in baboons and macaques).

Altogether, the majority of the species-specific differences were concentrated inside three areas of the MG7 domain, among which two loops (between residues 867–873 and 877–886 respectively), and more interestingly, inside the 904–917 sequence, corresponding to a beta-hairpin in MG7. The study by Laursen et al. describes thirteen positions involved in the binding of C5 convertases to the human C5 (depicted in red in Fig. 1). Of them, two are subjected to variations: position 885, in the “KSSKC” epitope, which is polymorphic in humans and divergent in orangutans, and position 917 which is specific to humans.

In summary, the MG7 domain of complement C5 is very conserved across primates, especially those from the old world, apart from a few positions, including residue 917 which is common to all primates but human. Using sequence alignment, we hypothesized that the exquisite species specificity of ECZ could be due to residues 904 and 908, and/or residue 917.

Human	F	K	D	V	F	L	E	M	N	I	P	Y	S	V	V	R	G	E	Q	I	Q	L	K	G	T	V	Y	N	Y	R	T	S	G	M	Q	F	C	V	K	M	
Chimpanzee	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Orang utan	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gibbon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macaque	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Baboon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Marmoset	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	

Human	S	A	V	E	G	I	C	T	S	E	S	P	V	I	D	H	Q	G	T	K	S	S	K	C	V	R	Q	K	V	E	G	S	S	S	H	L	V	T	F	T	
Chimpanzee	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Orang utan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gibbon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macaque	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Baboon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Marmoset	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	

Human	V	L	P	L	E	I	G	L	H	N	I	N	F	S	L	E	T	W	F	G	K	E	I																		
Chimpanzee	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Orang utan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Gibbon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Macaque	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Baboon	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Marmoset	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922																		

Fig. 1. Alignment of the MG7 domains of C5 from human, and non-human primate species. Numbering was performed according to prenumbering of human C5. MG7 domain spreads from aminoacid 820–922. Hyphens indicate an aminoacid identity to human sequence. Pale yellow background is used for substitutions of minor chemical consequence and/or respecting the phylogeny. Bright yellow background is used for other substitutions. The framed aminoacids are those of the KSSKC epitope described in Evans et al. (2002). The underlined peptides in human MG7 are those identified as composing the discontinuous epitope. Red numbers indicate the residues in human C5 potentially interacting with C5 convertases according to the Supplementary data from Laursen et al. (Laursen et al., 2011). A black arrow points to position 885, which has been described to be mutated either to a histidine or a cysteine in the rare cases of primary non-responses to eculizumab by Nishimura et al. (Nishimura et al., 2014). Identity rates to human C5 are as follows: chimpanzee, 98%; orangutan, 94%; gibbon, macaque, and baboon, 96%; and marmoset, 88%. The sequences used were the following: human: NP.001726; chimpanzee: XP.520228.2; orangutan: XP.009243099.1; gibbon: XP.003264119.1; macaque: XP.001095750; baboon: XP.009186435.1; and marmoset: XP.002743307.1.

3.2. Docking of ECZ on complement C5

The 3D structure of ECZ being unresolved so far, it was modeled by homology. The template structures for heavy and light chains variable domains modeling were chosen as the ones with highest homology amongst the 3D structures presenting at most one insertion/deletion in at most one of the CDRs. The structure of complement C5 is known (PDB code 3CU7, Fredslund et al., 2008), although the 871–882 loop is absent in this structure (Fredslund et al., 2008). Since this loop overlaps with the published “KSSKC” epitope, 3CU7 could not be used as-is for docking. In the 3D structure of the C5 complement in complex with cobra venom factor and superantigen-like protein 7 (code 3PRX, Laursen et al.), the 871–882 loop is resolved (Laursen et al., 2011). Because of the large conformational rearrangement triggered by the complex formation, 3PRX could not be used for docking. Consequently, we modeled the 871–882 loop in 3CU7 based on its conformation in 3PRX. The docking of ECZ on C5 complement was then done using the PRIOR method and imposing that ECZ interacts with C5 complement at least through the CDRs of the VH domain, and that the interaction region on 3CU7 was within the MG7 domain (Bourquard et al., 2014).

The model obtained for the complex predicts that the epitope consists in two short peptides of complement C5: ⁸⁸⁴VRQKV⁸⁸⁸, which is included in the 17-residue epitope called “KSSKC”, and ⁹¹³SLETWFGKE⁹²². Inside the 884–890 peptide is included R885, which is polymorphic in humans and interacts with several atoms from the backbone of VL CDR 1 and 2 of ECZ in our model (Fig. 2C). The second peptide is part of the beta-hairpin which contains W917, the unique human-specific residue. In the co-crystal structure model, this W917 interacts with the phenol group of Y99 in the CDR3 of ECZ VH domain, and is located at less than 7 Å from the KSSKC-containing loop, and being surrounded by it, as shown in Fig. 2.

3.3. In vitro validation of the epitope

In order to validate the model of the ECZ–C5 complement interaction, two potentially interfering peptides were designed, corresponding to the two peptides of the epitope: ⁹¹³SLETWFGKE⁹²² (C5-pep1) and ⁸⁸³VRQKVEGS⁸⁹¹ (C5-pep2). One non-relevant peptide was also used as a control. Because of the very high affinity of ECZ for C5 complement (120 pM) and the usually low affinity of short peptides for antibodies (in the high micromolar range), our attempts to use competition experiments failed (Rother et al., 2007). We thus chose to use Reverse Phase Protein Array (RPPA), a very sensitive and robust technique (Dupuy et al., 2009). In this assay, ECZ binds both peptides, although with considerably reduced affinity as compared to the C5 complement itself, and does not bind to the irrelevant peptide (Fig. 3), therefore confirming the predicted epitope.

4. Discussion

Despite the undeniable clinical activity of ECZ, its epitope remains poorly characterized. Moreover, an inconsistency persists about the linear epitope that has been described, which fits with mutations observed in rare cases of primary non-responses to ECZ, but does not explain its extreme species-specificity. Using sequence alignment, we hypothesized that this specificity could be due to residues 904 and 908, and/or residue 917. Docking was used to predict the epitope of ECZ and resulted in the design of two peptides (913–922 and 884–890), which were shown to specifically bind ECZ in RPPA. Within this epitope, we thus identified W917 as the key species-specific residue.

The ECZ conformational epitope is therefore composed of a β-strand (884–890) and a β-hairpin (913–922). The 884–890 β-strand, or “VRQKV epitope” overlaps with the previously described “KSSKC” linear epitope in its C-terminal region. This VRQKV epitope contains the polymorphic R885 residue (R885C or R885H), that has been associated with primary non-responses to ECZ (Nishimura et al., 2014). This single mutation is therefore sufficient to abolish

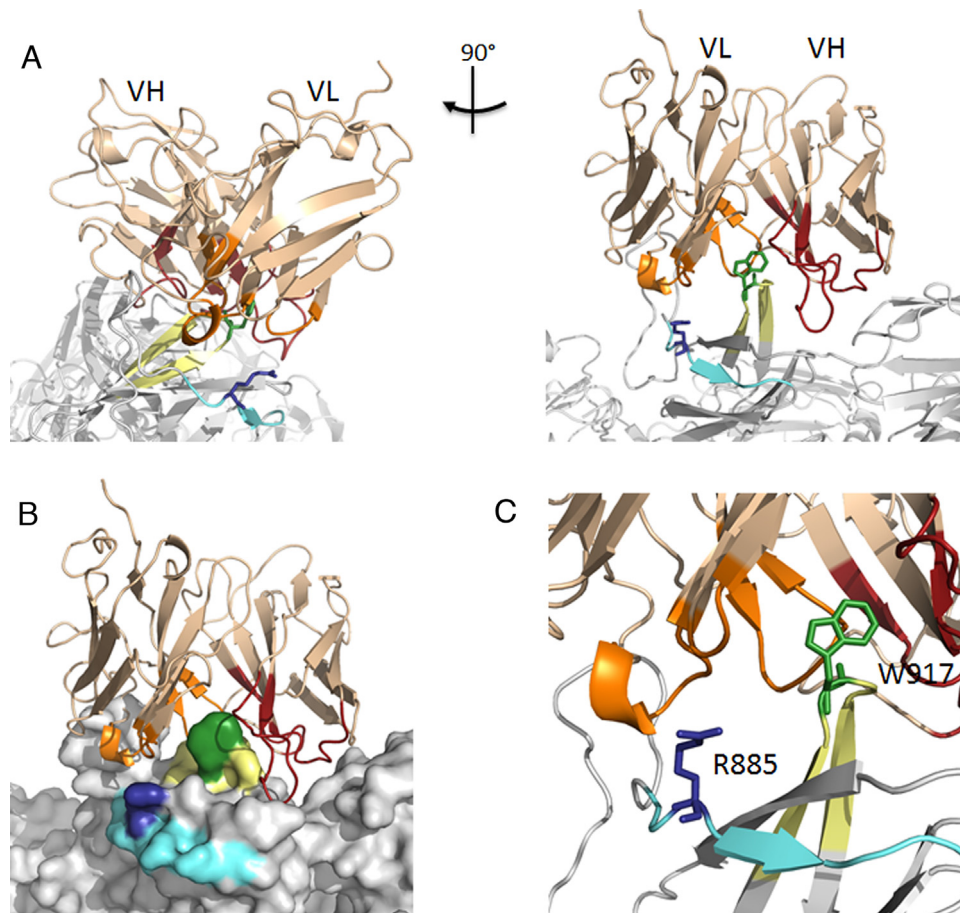


Fig. 2. Model of eculizumab bound to complement C5. The right part of 2A, 2B and 2C are screenshots taken from the same perspective. (A) C5 is represented in grey. The two major peptides of the epitope are shown: 913-SLETWFGKE-921 in green and 883-CVRQKVEGS-891 in blue. The eculizumab is represented in wheat, with the VL CDRs in orange and VH CDRs in red. (B) Surface representation of the interaction region with W917 highlighted in bright green and R885 in blue. (C) Close-up on the contact area between eculizumab and C5.

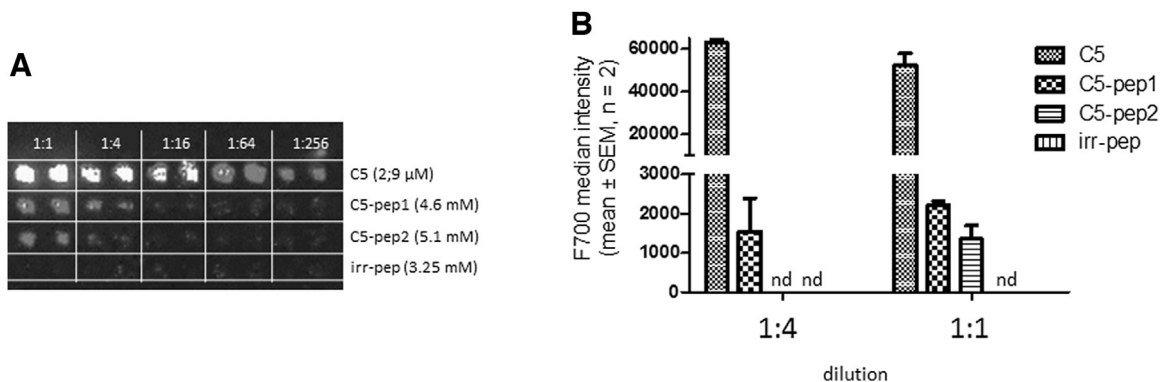


Fig. 3. (A) Representative image of a slide spotted with serial dilutions of C5 and peptides and hybridized with ECZ as described in Materials & methods. (B) Quantification of the fluorescence signal F700 median intensity obtained with ECZ (0.02 mg/mL) *minus* the signal obtained with secondary antibody alone, using Mapix software. Data are mean $\pm$ SEM of two duplicated spots (nd, not detectable).

the efficacy of ECZ in these patients. The other part of ECZ epitope (residues 913–922), described here, is a β -hairpin centered on W917. This residue is predicted to establish a stacking interaction with tyrosine 99 of the CDR3 of ECZ VH. The substitution of W917 by a serine, which is not aromatic, is likely to explain the unique species specificity of ECZ.

The present study also illustrates that peptide mapping only gives approximate prediction of the epitope, which is often insufficient to explain experimental results and observations. Mass

spectrometry analysis following mild digestion of the antibody-antigen complex is an alternative; however unsuccessful in our case (C. Larroque, *personal communication*). The gold-standard technique for this purpose remains co-crystallization of the Fab-antigen complex, but this technique is tedious, requires large quantities of proteins and is not always successful. We presently show that PRIOR, an *in silico* prediction method of the Fv-antigen complex represents an easy alternative, which can be readily validated by an RPPA *in vitro* assay. Further confirmation of the predicted epitope

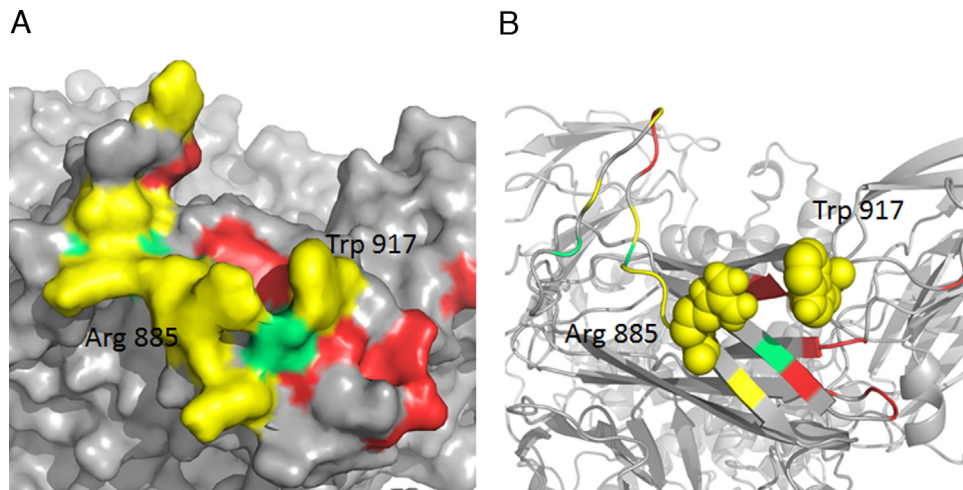


Fig. 4. Comparison of predicted and published epitope. Residues correctly predicted in our model are shown in yellow. Those predicted in our model but not involved in the epitope are in red, and those unpredicted but involved are in green. (A) Surface representation. (B) Ribbon representation showing Arg885 and Trp917 in spheres.

was provided by the defective ECZ binding characterizing the polymorphisms R885H and R885C in humans, and mutation W917F in chimpanzees (Nishimura et al., 2014; Schatz-Jakobsen et al., 2016).

Alignment of C5 MG7 domains from various primates did not perfectly fit the phylogenetic tree and revealed a significant number of species-specific substitutions. Indeed, the C5 MG7 domain of baboon and macaque show a higher identity to human MG7 than does that of orang utan, which is a great ape from Asia. Of the species-specific orang utan residues, H885 is also a rare allele in Asiatic patients, raising the hypothesis of a convergent evolution by selective pressure. This residue was described as potentially critical inside the interaction interface between C5 and C5 convertase by Laursen et al. (Laursen et al., 2011). Several predators, parasites or infectious agents have developed molecular inhibitors or activators that bind to this interface, either to exploit complement as a virulence factor or to avoid complement-mediated lysis. Selection of protective C5 variants could have occurred similarly in humans and great apes. Cobra venom factor (CVF) is a C5 convertase with important homology to endogenous convertases, and binds to the C5 MG7 domain, notably at position 885 (Laursen et al., 2011). Interestingly, the venom of endemic species of cobras, like *Naja sumatrana* possesses several CVFs (Yap et al., 2014).

The discontinuous eculizumab epitope centered around residues 885 and 917 also overlaps 2 out of the 3 MG7 areas required for C5 convertase binding, residues 885 and 917 being themselves directly involved (Laursen et al., 2011; Fig. 2C). Therefore, eculizumab probably competes and prevents full C5–C5 convertase association and consequently access of the latter to the C5 cleavage site. This is also supported by the studies of Jore et al. and Schatz-Jakobsen et al.

In conclusion, these new findings explain the species-specificity of ECZ for human C5, and give a better insight into the mechanism of action of ECZ. This will have to be taken into account for the development of new anti-complement biopharmaceuticals, with distinct activities, or with an activity profile less dependent on genetic polymorphisms.

After completion of our paper, the structure of the complex between C5 and ECZ has been modeled by electron microscopy 3D reconstruction (Jore et al., 2016) and determined by X-ray crystallography (Schatz-Jakobsen et al., 2016). The comparison of our predicted epitope with the published one (MMDB ID: 515K) shows that 9 out of the 15 residues of the epitope are correctly predicted, notably R885 and the critical W917 residue, which has also been described by Schatz-Jakobsen et al. as involved in the

exquisite species specificity (Fig. 4). The main difference is that in our model the antibody is slightly tilted towards the MG6 domain. Thus, although the orientation of the antibody in our model was only partly correct, the published 3D structure demonstrates the validity of our epitope prediction.

Conflict of interest

The authors have no competing financial interests to declare.

Funding sources

This publication was funded with support from the French National Research Agency under the program “Investissements d’avenir” Grant Agreement LabEx MablImprove: ANR-10-LABX-53.

Acknowledgements

The authors thank Marc Ohresser for initially raising the question of the eculizumab epitope.

References

- Bourquard, T., Landomiel, F., Jégot, G., Decourtye, J., Maurel, M., Reiter, E., Crépieux, P., Ritchie, D., Azé, J., Poupon, A., 2014. Predicting the 3D structure of macromolecular assemblies using PRIOR. In: Presented at the International Conference on Gonadotropins & Receptors, Tours, France, p. 22.
- Burwick, R.M., Burwick, N.R., Feinberg, B.B., 2014. Eculizumab fails to inhibit generation of C5a in vivo. *Blood* 124, 3502–3503, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-07-589366>.
- Dupuy, L., Gauthier, C., Durand, G., Musnier, A., Heitzler, D., Herledan, A., Sakanyan, V., Crépieux, P., Reiter, E., 2009. A highly sensitive near-infrared fluorescent detection method to analyze signalling pathways by reverse-phase protein array. *Proteomics* 9, 5446–5454, <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200900209>.
- European Medicines Agency, 2015. SOLIRIS—Scientific Discussion [WWW Document], URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Scientific_Discussion/human/000791/WC500054212.pdf.
- Evans, M.J., Matis, L.A., Mueller, E.E., Nye, S.H., Rollins, S., Rother, R.P., Springhorn, J.P., Squinto, S.P., Thomas, T.C., Wilkins, J.A., et al., 2002. C5-specific antibodies for the treatment of inflammatory diseases. 6, 355, 245.
- Fredslund, F., Laursen, N.S., Roversi, P., Jenner, L., Oliveira, C.L.P., Pedersen, J.S., Nunn, M.A., Lea, S.M., Discipio, R., Sottrup-Jensen, L., Andersen, G.R., 2008. Structure of and influence of a tick complement inhibitor on human complement component 5. *Nat. Immunol.* 9, 753–760, <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1625>.
- Gruppo, R.A., Rother, R.P., 2009. Eculizumab for congenital atypical hemolytic-uremic syndrome. *N. Engl. J. Med.* 360, 544–546, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc0809959>.
- Hillmen, P., Hall, C., Marsh, J.C.W., Elebute, M., Bombara, M.P., Petro, B.E., Cullen, M.J., Richards, S.J., Rollins, S.A., Mojcik, C.F., Rother, R.P., 2004. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with

- paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N. Engl. J. Med.* 350, 552–559, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa031688>.
- Jore, M.M., Johnson, S., Sheppard, D., Barber, N.M., Li, Y.L., Nunn, M.A., Elmlund, H., Lea, S.M., 2016. Structural basis for therapeutic inhibition of complement C5. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 378–386, <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.3196>.
- Laursen, N.S., Andersen, K.R., Braren, I., Spillner, E., Sottrup-Jensen, L., Andersen, G.R., 2011. Substrate recognition by complement convertases revealed in the C5-cobra venom factor complex. *EMBO J.* 30, 606–616, <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2010.341>.
- Nishimura, J., Yamamoto, M., Hayashi, S., Ohyashiki, K., Ando, K., Brodsky, A.L., Noji, H., Kitamura, K., Eto, T., Takahashi, T., Masuko, M., Matsumoto, T., Wano, Y., Shichishima, T., Shibayama, H., Hase, M., Li, L., Johnson, K., Lazarowski, A., Tamburini, P., Inazawa, J., Kinoshita, T., Kanakura, Y., 2014. Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab. *N. Engl. J. Med.* 370, 632–639, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1311084>.
- Rother, R.P., Rollins, S.A., Mojcić, C.F., Brodsky, R.A., Bell, L., 2007. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat. Biotechnol.* 25, 1256–1264, <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1344>.
- Schatz-Jakobsen, J.A., Zhang, Y., Johnson, K., Neill, A., Sheridan, D., Andersen, G.R., 2016. Structural basis for eculizumab-mediated inhibition of the complement terminal pathway. *J. Immunol. (Baltim. Md.)* 1950, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1600280>.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539, <http://dx.doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
- Webb, B., Sali, A., 2014. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr. Protoc. Bioinf.* 47 (5.6), 1–32, <http://dx.doi.org/10.1002/0471250953.bi0506s47>.
- Wong, E.K.S., Kavanagh, D., 2015. Anticomplement C5 therapy with eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and atypical hemolytic uremic syndrome. *Transl. Res.* 165, 306–320, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2014.10.010>.
- Wong, E.K.S., Goodship, T.H.J., Kavanagh, D., 2013. Complement therapy in atypical haemolytic uraemic syndrome (aHUS). *Mol. Immunol.* 56, 199–212, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2013.05.224>.
- Yap, M.K.K., Fung, S.Y., Tan, K.Y., Tan, N.H., 2014. Proteomic characterization of venom of the medically important Southeast Asian Naja sumatrana (Equatorial spitting cobra). *Acta Trop.* 133, 15–25, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.01.014>.
- Zuber, J., Fakhouri, F., Roumenina, L.T., Loirat, C., Frémeaux-Bacchi, V., 2012. French Study Group for aHUS/C3G. Use of eculizumab for atypical haemolytic uraemic syndrome and C3 glomerulopathies. *Nat. Rev. Nephrol.* 8, 643–657, <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2012.214>.

Annexe 2: Séquences d'anticorps thérapeutiques

Adalimumab

Source : Brevet US8034906

>adalimumab_heavy_chain

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNS
GHIDYADSVETRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

>adalimumab_light_chain

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGV
PSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Trastuzumab

Source : INN7637, IMGT Mab database (<http://www.imgt.org/mAb-DB/>)

>7637H|trastuzumab

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGY
TRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>7637L|trastuzumab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Infliximab

Source : Therapeutic Antibodies Database > Sequence > Infliximab

(<http://tabs.craic.com/>)

>Infliximab_Heavy_chain_Fab

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCLVASGFIFSNHWMNWVRQSPEKGLEWVAE
IRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDSKSAVYLQMTDLRTEDTGVIYCSRNYYGSTYD
YWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKT

>Infliximab_Light_chain

DILLTQSPAILSVPGERVVSFSCRASQFVGSSIHWHYQQRNTGSPRLLIKYASEMSGIPS
RFSGSGSGTDFTLISINTVESEDIADYYCQQSHSWPFTFGSGTNLEVKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Rituximab

Source : INN 7609, IMGT Mab database (<http://www.imgt.org/mAb-DB/>)

>7609H|rituximab

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGN
GDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNV
WGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>7609L|rituximab

QIVLSQSPAILSASPGKEVTMTTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPV
RFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cétuximab

Source : INN 7906, IMGT Mab database (<http://www.imgt.org/mAb-DB/>)

>7906H|cetuximab

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNT
DYNTPTFSTRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTL
VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>7906L|cetuximab

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSR
FSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Bevacizumab

Source : Therapeutic Antibodies Database > Sequence > Bevacizumab

(<http://tabs.craic.com/>)

>Bevacizumab heavy

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYT
GEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGGSSHWYFD
VWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>Bevacizumab light

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Basiliximab

Source : Therapeutic Antibodies Database > Sequence > Basiliximab

(<http://tabs.craic.com/>)

>basiliximab_heavy_chain

QLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYSFTRYWMHWIKRPGQGLEWIGAIYPGNSDT
SYNQKFEGKAKLTAVTSASTAYMELSSLTHEDSAVYYCSRDYGYDFWGGQTTLT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP

>basiliximab_light_chain

QIVSTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSRSYMQWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLASGV
PARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQRSSYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE

Pertuzumab

Source : Brevet US 20060018899

>pertuzumab_heavy_chain

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNS
GGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

>pertuzumab_light_chain

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTG
PSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Elotuzumab

Source : INN 9074, IMGT Mab database (<http://www.imgt.org/mAb-DB/>)

>9074H|elotuzumab

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDGFRYWMWVRQAPGKGLEWIGEINPDSST
INYAPSLKDKFIISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPDGNYWYFDVWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSFGSFLYSLKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>9074L|elotuzumab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRHTG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQYSSYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Annexe 3: Résultats de chromatographie d'exclusion stérique

Anticorps	Date	Monomère (pic 1)				Oligomères (pic 2)			
		Masse moléculaire	Incertitude	Masse calculée (µg)	fraction (%m/m)	Masse moléculaire	Incertitude	Masse calculée (µg)	fraction (%m/m)
Adalimumab	14-avr	150,70	0,03	44,48	99,90	0,00		0,06	0,10
		150,30	0,03	44,63	99,90	0,00		0,06	0,10
		151,10	0,03	45,11	99,60	0,00		0,20	0,40
		153,90	0,02	44,05	99,90	0,00		0,03	0,10
	20-avr	154,30	0,02	39,76	99,90	4181,10	0,75	0,04	0,10
		150,20	0,01	43,64	99,90	1939,20	0,32	0,03	0,10
		151,80	0,01	43,89	99,90	1000,10	0,72	0,04	0,10
		150,50	0,01	43,80	99,90	0,00		0,06	0,10
	27-avr	152,90	0,04	42,67	100,00				
		153,70	0,05	42,73	100,00				
Basiliximab	14-avr	156,20	0,05	43,01	100,00				
		150,10	0,01	37,19	100,00				
		150,50	0,02	42,23	100,00				
		149,70	0,01	41,81	100,00				
	20-avr	149,60	0,01	42,08	100,00				
		148,50	0,01	42,00	100,00				
		157,00	0,03	41,53	97,10	378,00	0,37	1,23	2,90
		153,60	0,01	41,46	97,20	315,40	0,22	1,21	2,80
		155,10	0,03	42,47	96,40	383,20	0,43	1,56	3,60
		159,60	0,02	40,25	97,10	357,30	0,14	1,19	2,90
Bevacizumab	14-avr	156,40	0,01	36,33	97,10	277,10	0,13	1,08	2,90
		157,80	0,01	39,72	96,90	352,00	0,10	1,26	3,10
		156,60	0,01	39,55	97,10	354,60	0,06	1,19	2,90
		155,40	0,01	39,55	97,10	294,10	0,05	1,20	2,90
	20-avr	156,80	0,03	43,71	99,80	0,00		0,08	0,20
		154,50	0,02	43,76	99,90	0,00		0,06	0,10
		157,70	0,02	43,80	99,90	0,00		0,05	0,10
		157,80	0,02	20,91	99,90	0,00		0,02	0,10
	27-avr	156,70	0,03	28,05	99,90	1118,90	0,70	0,03	0,10
		156,50	0,01	43,00	99,80	950,30	0,19	0,08	0,20
Cetuximab	14-avr	156,60	0,01	43,15	99,80	379,60	0,97	0,07	0,20
		155,50	0,01	43,20	99,80	457,80	0,66	0,08	0,20
		149,00	0,03	41,62	99,10	269,70	0,68	0,37	0,90
		148,50	0,02	41,59	99,20	285,00	0,48	0,35	0,80
	20-avr	146,40	0,02	41,71	98,90	220,90	0,68	0,46	1,10
		150,00	0,02	28,86	99,10	367,20	0,56	0,25	0,90
		149,90	0,01	45,11	99,20	397,20	0,47	0,38	0,80
		147,80	0,01	44,89	99,10	418,90	0,14	0,39	0,90
	27-avr	149,20	0,01	44,71	99,40	342,40	0,20	0,28	0,60
		148,40	0,01	44,72	99,20	364,00	0,21	0,34	0,80
Elotuzumab	14-avr	153,00	0,02	36,76	99,30	429,60	0,81	0,26	0,70
		155,50	0,03	36,80	99,30	301,30	0,84	0,26	0,70
		157,80	0,03	36,83	98,90	253,50	0,90	0,41	1,10
		156,30	0,02	30,84	99,40	278,90	0,76	0,18	0,60
	20-avr	157,50	0,02	36,32	99,40	319,00	0,61	0,23	0,60
		158,30	0,01	35,83	99,20	541,30	0,28	0,28	0,80
		158,00	0,01	35,80	99,40	290,20	0,35	0,21	0,60
		156,20	0,01	35,71	99,40	388,40	0,27	0,23	0,60
	27-avr	151,20	0,03	43,99	100,00				
		155,50	0,03	44,01	100,00				
Golimumab	14-avr	156,70	0,04	44,29	100,00				
		158,10	0,02	37,99	100,00				
		153,50	0,02	43,10	100,00				
		155,40	0,02	39,91	100,00				
	20-avr	153,60	0,01	40,87	100,00				
		152,90	0,01	40,06	100,00				
		151,20	0,03	42,34	100,00				
		154,60	0,04	42,49	100,00				
	27-avr	155,00	0,03	42,60	100,00				
		152,10	0,01	38,90	100,00				
Ipilimumab	14-avr	153,40	0,02	41,25	100,00				
		155,00	0,01	39,76	100,00				
		148,70	0,01	40,79	100,00				
		151,90	0,01	39,99	100,00				
	20-avr	152,00	0,03	41,68	99,90	0,00		0,04	0,10
		152,00	0,02	41,62	99,90	0,00		0,04	0,10
		152,10	0,02	42,06	99,60	0,00		0,17	0,40
		151,10	0,01	33,50	100,00	0,00		0,01	0,00
	27-avr	152,60	0,02	41,18	99,90	0,00		0,03	0,10
		150,90	0,01	40,46	99,90	1396,50	0,61	0,05	0,10
Pertuzumab	14-avr	150,60	0,01	40,58	99,90	315,00	0,84	0,03	0,10
		149,40	0,01	40,49	99,90	519,70	0,95	0,04	0,10
		148,10	0,03	48,46	99,50	0,00		0,03	0,10
		155,20	0,04	48,67	99,70	0,00		0,02	0,10
	20-avr	149,50	0,03	49,88	98,50	0,00		0,32	0,60
		150,70	0,02	45,33	99,90	0,00		0,02	0,10
		148,20	0,01	48,72	99,90	0,00		0,05	0,10
		149,00	0,01	47,67	99,90	203,30	0,30	0,03	0,10
	27-avr	149,80	0,01	47,69	99,90	476,00	0,83	0,04	0,10
		149,50	0,01	47,69	99,90	192,70	0,52	0,06	0,10
Rituxumab	14-avr	152,50	0,02	44,83	99,80	0,00		0,07	0,20
		152,90	0,03	45,03	99,80	0,00		0,08	0,20
		155,40	0,02	44,87	99,90	0,00		0,05	0,10
		152,50	0,01	42,08	99,80	538,60	0,92	0,07	0,20
	20-avr	152,50	0,01	44,33	99,90	325,60	0,96	0,04	0,10
		152,80	0,01	43,48	99,80	861,80	0,40	0,10	0,20
		152,00	0,01	44,11	99,80	264,10	0,50	0,08	0,20
		151,20	0,01	44,10	99,80	230,80	0,55	0,09	0,20
	27-avr								

Annexe 4: Alignements de séquences protéiques

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

Inflximab_Heavy_chain_Fab      EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVAGSFIFSNHMMNWRVKQSPKGLEWVAEIRSKINSAT      60
basiliximab_heavy_chain       --LQQQSGTVLARPAQSVAMKSCASGYSTFTYMMHWIKQRPQGGLWIGAIYPT--NSDT      56
pertuzumab_heavy_chain        EVOLVEGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTFDYMDWVRQAPGKLEWVADVNPEN--SGGS      58
7906H|cetuximab              QVQLVQSGEGLVQPGSQTLSITCTVSGFSLTNVGHVWRQSPGKGLEWLGVIWVSG--GNT      57
7609H|rituximab              EVQLQQLPQGAELVLPKQSVAMKSCASGYFTFTSYNMMHWKQTPGKLEWIGAIYPT--NGDT      58
7637H|trastuzumab            EVOLVEGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTKDTYTHHWVRQAPGKLEWVARIYPT--NGYT      58
Bevacizumab                   EVOLVEGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTFTNVMNWRQAPGKLEWVWINTY--TGEPT      58
adalimumab_heavy_chain        EVOLVESGGGLVQPGSRRLSCAASGYFTFDYAMHWVRQAPGKLEWVSAITWN--SGHI      58
9074H|elotuzumab             EVOLVEGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFDSRYWMSWVRQAPGKLEWIGINPD--SSTII      58

```

```

Inflximab_Heavy_chain_Fab      HYAESVKGRTFISRDDSKSAVLQMTDLRTEDTGVYYCSRNY-----GSTYDWGGGTT 118
basiliximab_heavy_chain      YSNQKFEFGAKLTAVTASATAYMELSSLTHSDSAVYCSRNDVG-----YFFDFWGGGTT 119
pertuzumab_heavy_chain       IYMQKFGKRTLSVDRSMTLYLQMLNSLRAEDTAVYCAKNLIG-----PSFFYDWGGGTT 110
7906HG|cetuximab             DYNTPTFSLRSINKDNSKQVFFMNSLQSDNTAIYYCARLITY-----DYEFAVWGGGTT 114
7609HG|rituximab             YSNQKFGKGAITLADGSSSTAYMQLSLSTNSDAVYCARSTYYGG-----DGFVNWGGGTT 116
7637HG|trastuzumab          RYADSVMKGRFTISADTSKNTAYLQMLNSLRAEDTAVYYCSRW-----GGDFYAMDWGGGTT 115
Bevacizumab                  TYAADFKRRFTFLSDTKSTAYLQMLNSLRAEDTAVYCAKYPHYGSSSHWYFDVWGGGTT 118
adalimumab_heavy_chain       DYADSVEGRFTISDNKNSLYLQMLNSLRAEDTAVYCAKVS-----YLTASSLDWGGGTT 116
9074HG|elotzumab            NYAPSLKGRFTISDNKNSLYLQMLNSLRAEDTAVYCAKPD-----G-----NYWYFDVWGGGTT 119

```

Infliximab_Heavy_chain_Fab	LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTGGGTAAALGCLVKDYFPEPPTVSWNSGALTSGVHTFFPA	175
basiliximab_heavy_chain	LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTGGGTAAALGCLVKDYFPEPPTVSWNSGALTSGVHTFFPA	175
pertuzumab_heavy_chain	VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTGGGTAAALGCLVKDYFPEPPTVSWNSGALTSGVHTFFPA	174
7906H cetuximab	VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTGGGTAAALGCLVKDYFPEPPTVSWNSGALTSGVHTFFPA	174
7609H rituximab	VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTGGGTAAALGCLVKDYFPEPPTVSWNSGALTSGVHTFFPA	176
7637H trastuzumab	VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTGGGTAAALGCLVKDYFPEPPTVSWNSGALTSGVHTFFPA	176
Bevacizumab	VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTGGGTAAALGCLVKDYFPEPPTVSWNSGALTSGVHTFFPA	178
adalimumab_heavy_chain	VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTGGGTAAALGCLVKDYFPEPPTVSWNSGALTSGVHTFFPA	176
9074H elotuzumab	VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTGGGTAAALGCLVKDYFPEPPTVSWNSGALTSGVHTFFPA	174

Infliximab_Heavy_chain_Fab	VLOSSGLYLSLSSVTVPSSSSLGTQTYICNVNKKPSNTKVDKKVPEPKSCDKT-----	226
basiliximab_heavy_chain	VLOSSGLYLSLSSVTVPSSSSLGTQTYICNVNKKPSNTKVDKKVPEPKSCDKT-----	215
pertuzumab_heavy_chain	VLOSSGLYLSLSSVTVPSSSSLGTQTYICNVNKKPSNTKVDKKVPEPKSCDKT-----	226
7906H cetuximab	VLOSSGLYLSLSSVTVPSSSSLGTQTYICNVNKKPSNTKVDKKVPEPKSCDKTH-----	234
7609H rituximab	VLOSSGLYLSLSSVTVPSSSSLGTQTYICNVNKKPSNTKVDKKVPEPKSCDKTHCPCFPAP	236
7637H trastuzumab	VLOSSGLYLSLSSVTVPSSSSLGTQTYICNVNKKPSNTKVDKKVPEPKSCDKTHCPCFPAP	235
Bevacizumab	VLOSSGLYLSLSSVTVPSSSSLGTQTYICNVNKKPSNTKVDKKVPEPKSCDKTHCPCFPAP	238
adalimumab_heavy_chain	VLOSSGLYLSLSSVTVPSSSSLGTQTYICNVNKKPSNTKVDKKVPEPKSCDKTHCPCFPAP	236
9074H elotuzumab	VLOSSGLYLSLSSVTVPSSSSLGTQTYICNVNKKPSNTKVDKKVPEPKSCDKTHCPCFPAP	234

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

Infliximab_Light_chain      DILLTQSPAILSVPGERVFSFCRASQVGSIIHWYQQRNGSPRLLIKAYASESMGIPS      60
7906L|cetuximab            DILLTQSPVILSVSPGERVFSFCRASQIGNIIHWYQQRNGSPRLLIKAYASESTGIPS      60
7637L|trastuzumab          DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQDVNTAVAWYQQRKPGKAPKLLIYASAFLYSGVPS  60
pertuzumab_light_chain     DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQDVYIGVAWYQQRKPGKAPKLLIYASARYTGVPS  60
9074L|elotuzumab          DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQDVGLAVAWYQQRKPGKVPLKLIYWASTRHGTGPD  60
adalimumab_light_chain     DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQGGIRNYLAWYQQRKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPS  60
Bevacizumab                DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQDINSYLNWYQQRKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPS  60
7609L|rituximab            QIVLTQSPAILSPSGEKVMTTCRASSSVSYIHWFGQKPGSSPKPIIYATSNLSSGVFPV  59
basiliximab_light_chain    QIVSTQSPALMSASPGEKVMTTCASASSRSYMWQWYQQRKPGTSPKRNIYDTSKLASGVPA  59

```

```
Inflximab_Light_chain      RFSGSGSGTDFTLISNTVSEDIADYYCQQSHSWPFFGSGTNLEVKRTVAAPSVFIFPP    120
7906|cetuximab           RFSGSGSGTDFTLISNSVSEDIADYYCCQNNWPFIFGGGTGLEIKRRTVAAPSVFIFPP    120
7637|trastuzumab        RFSGRSGTDFDTLTSSIQPEDFATTCYCOQHYPPTFGQGTVKVEIKRRTVAAPSVFIFPP    120
pertuzumab_light_chain   RFSGSGSGTDFTLTSSIQPEDFATTCYCOQYIYPTFGQGTQKVEIKRRTVAAPSVFIFPP    120
9074|elotuzumab         RFSGSGSGTDFTLTSSIQPEDVATTCYCOQYSVPYTFGGGTQKVEIKRRTVAAPSVFIFPP    120
adalimumab_light_chain   RFSGSGSGTDFTLTSSIQPEDVATTCYCYNRAPYTFGGGTQKVEIKRRTVAAPSVFIFPP    120
Bevacizumab             RFSGSGSGTDFTLTSSIQPEDFATTCYCOQSTVPWFIFGGGTQKVEIKRRTVAAPSVFIFPP    120
7609|riltuximab         RFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDDAATTCYCOQWSNPPIFGGQTGLEIKRRTVAAPSVFIFPP    119
basiliximab_light_chain  RFSGSGSGTSYSLTSSMEAEADAATTCYCHQRS--SYTFGGGTGLEIKRRTVAAPSVFIFPP    117
*****          *          *****          ****          *****          *****
```

Inflximab_Light_chain	SDEQLKSGTASVVCLLNNFFYPRAAKVQWQVVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYISLSSTLL	180
7906L certuximab	SDEQLKSGTASVVCLLNNFFYPRAAKVQWQVVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYISLSSTLL	180
7637L trastruzumab	SDEQLKSGTASVVCLLNNFFYPRAAKVQWQVVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYISLSSTLL	180
pertuzumab_light_chain	SDEQLKSGTASVVCLLNNFFYPRAAKVQWQVVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYISLSSTLL	180
9074L elotuzumab	SDEQLKSGTASVVCLLNNFFYPRAAKVQWQVVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYISLSSTLL	180
adalimumab_light_chain	SDEQLKSGTASVVCLLNNFFYPRAAKVQWQVVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYISLSSTLL	180
Bevacizumab	SDEQLKSGTASVVCLLNNFFYPRAAKVQWQVVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYISLSSTLL	180
7609L rituximab	SDEQLKSGTASVVCLLNNFFYPRAAKVQWQVVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYISLSSTLL	179
basiliximab_light_chain	SDEQLKSGTASVVCLLNNFFYPRAAKVQWQVVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYISLSSTLL	179

```
Inflximab_Light_chain      LS>KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 214
7906L|cetuximab          LS>KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 214
7637L|trastuzumab        LS>KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 214
9074L|elotuzumab         LS>KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 214
adallimumab_light_chain  LS>KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 214
Bevacizumab              LS>KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 214
7609L|rituximab          LS>KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 213
basiliximab_light_chain  LS>KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE- 210
*****
```

Annexe 5: Matrices d'analyse physicochimique

Chaînes Lourdes																											
Séquence				Hydrophathie				Volume				Charge				Polarité				Hydrogène							
Ada	Ttz	Ifx	Rtx	Ctx	Bcz	Bsx	Ptz	Etz	Ada	Ttz	Ifx	Rtx	Ctx	Bcz	Bsx	Ptz	Etz	Ada	Ttz	Ifx	Rtx	Ctx	Bcz	Bsx	Ptz	Etz	
1	E	E	Q	Q	E	-	E	E	1	3	3	3	3	3	-	3	3	1	2	2	3	3	2	-	2	2	
3	Q	Q	K	Q	Q	Q	Q	Q	3	3	4	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	
5	V	E	K	V	Q	V	V	S	5	1	3	3	3	4	3	3	3	5	2	2	1	1	2	1	2	2	
7	S	S	P	S	S	S	S	S	7	1	1	2	1	1	1	1	1	7	1	1	2	1	1	1	1	1	
13	Q	Q	K	Q	Q	R	Q	R	13	3	3	4	3	4	3	3	3	13	3	3	1	1	1	1	1	1	
19	R	K	K	S	R	K	R	R	19	4	4	4	4	4	4	4	4	19	1	1	1	1	1	1	1	1	
23	A	V	T	A	K	A	A	A	23	1	1	3	4	2	1	1	1	23	3	3	1	3	3	1	3	3	
28	T	N	I	S	T	S	T	D	28	2	3	1	2	2	2	2	2	28	3	3	3	3	3	3	3	2	
42	G	E	G	G	G	G	G	G	42	2	2	3	2	2	2	2	2	42	1	1	1	1	1	1	1	1	
64	D	E	Q	T	A	Q	Q	P	64	3	3	3	2	1	3	3	3	64	1	1	1	1	2	1	1	2	
65	S	S	K	P	D	K	R	S	65	2	2	3	2	3	3	2	1	65	3	3	1	1	2	1	1	1	
67	E	K	K	T	K	E	K	K	67	3	3	3	2	3	3	3	3	67	1	1	1	1	1	1	1	1	
75	D	D	D	D	D	V	D	D	75	3	3	3	3	3	3	3	3	75	2	2	2	2	2	2	2	2	
77	A	S	S	S	S	S	S	A	77	1	1	2	2	2	2	2	1	77	3	3	3	3	3	3	3	3	
78	K	K	S	K	K	A	K	K	78	3	3	2	3	3	1	3	1	78	1	1	1	1	1	1	1	2	
89	R	R	T	Q	R	T	R	R	89	4	4	4	2	3	4	2	4	89	1	1	1	1	1	1	1	1	
90	A	T	S	A	H	A	A	A	90	1	1	2	2	1	1	1	1	90	3	3	3	3	3	1	3	1	
91	E	E	N	E	E	E	E	E	91	3	3	3	3	2	3	3	3	91	2	2	2	3	2	2	2	2	
95	V	V	V	V	V	V	V	V	95	1	1	1	1	1	1	1	1	95	2	2	2	2	2	2	2	2	
123	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	123	3	3	3	1	3	3	3	3	123	1	1	2	1	1	1	1	1	
126	L	T	L	T	L	T	L	T	126	1	2	2	1	2	2	1	2	126	2	1	1	2	2	1	2	2	
131	S	S	A	A	S	S	S	S	131	1	1	1	1	1	1	1	1	131	3	3	3	3	3	3	3	3	
228	K	K	K	K	K	R	K	K	228	3	3	3	3	3	3	3	3	228	1	1	1	1	1	1	1	1	
Chaînes Légères																											
Séquence				Hydrophathie				Volume				Charge				Polarité				Hydrogène							
Ada	Ttz	Ifx	Rtx	Ctx	Bcz	Bsx	Ptz	Etz	Ada	Ttz	Ifx	Rtx	Ctx	Bcz	Bsx	Ptz	Etz	Ada	Ttz	Ifx	Rtx	Ctx	Bcz	Bsx	Ptz	Etz	
1	D	D	Q	D	Q	D	D	D	1	2	2	3	2	2	3	2	2	1	2	2	3	2	2	3	2	2	
3	Q	L	V	L	V	Q	Q	S	3	3	3	4	3	4	3	3	3	3	3	1	2	2	2	1	2	1	
9	S	A	P	V	A	S	A	S	9	1	1	1	3	1	1	1	1	9	1	2	2	1	2	1	1	1	
15	V	P	P	P	V	P	V	V	15	3	3	2	2	3	2	3	3	15	3	3	3	3	3	3	3	3	
18	R	R	K	R	K	R	R	R	18	4	4	4	4	4	4	4	4	18	1	1	1	1	1	1	1	1	
24	R	R	R	R	S	S	K	K	24	3	3	3	2	3	2	3	3	24	4	4	4	1	4	4	4	4	
28	G	F	S	D	S	D	S	D	28	3	1	2	2	3	2	3	2	28	3	3	3	3	3	2	3	2	
40	K	R	K	R	K	K	K	K	40	3	3	3	3	3	3	3	3	40	4	4	4	4	4	4	4	4	
41	P	T	P	T	P	P	P	P	41	2	2	2	2	2	2	2	2	41	3	3	3	3	3	3	3	3	
42	G	N	G	N	G	G	G	G	42	2	2	3	2	2	2	2	2	42	3	3	3	3	3	3	3	3	
43	K	G	S	G	K	T	K	K	43	4	4	1	1	4	2	4	4	43	1	1	2	1	1	1	1	1	
46	K	R	K	R	K	K	K	K	46	4	4	4	4	4	4	4	4	46	1	1	1	1	1	1	1	1	
55	L	S	L	S	L	L	R	R	55	1	2	2	1	1	3	3	3	55	4	4	1	4	4	4	4	4	
57	S	S	S	S	S	S	S	T	57	2	2	2	2	2	2	2	2	57	1	1	1	1	1	1	1	1	
61	S	S	V	S	A	S	D	D	61	2	2	1	2	1	2	3	61	1	1	3	1	1	1	1	2	1	
67	G	R	G	G	G	G	G	G	67	2	3	2	2	2	2	2	2	67	1	4	1	1	1	1	1	1	
71	D	D	S	D	S	D	D	D	71	3	3	2	3	2	3	3	3	71	2	2	1	2	2	2	2	2	
77	S	N	S	N	S	S	S	S	77	2	2	3	2	2	2	2	2	77	1	2	1	2	1	1	1	1	
78	S	T	R	S	T	R	S	S	78	1	2	4	1	1	1	1	1	78	3	3	1	3	3	3	3	3	
80	Q	E	E	Q	E	Q	Q	Q	80	3	3	3	3	3	3	3	3	80	3	3	3	3	3	3	3	3	
102	Q	S	G	A	Q	G	Q	Q	102	3	2	2	1	3	2	3	3	102	3	2	1	1	2	2	2	2	
105	K	N	K	K	K	K	K	K	105	3	3	3	3	3	3	3	3	105	1	1	1	1	1	1	1	1	

Annexe 6: *curriculum vitae*

Guillaume Brachet

Docteur en Pharmacie, doctorant en Sciences
Assistant Hospitalo-Universitaire en Immunologie
guillaume.brachet@univ-tours.fr
+33665134258



• **Formation**

2014-2017 Doctorat en Sciences, Equipe « Anticorps, Récepteurs Fc et Réponses Cliniques » Unité Mixte de Recherche CNRS 7292 Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer

2012-2016 Interne Innovation Pharmaceutique et Recherche, CHRU de Tours

2013-2014 Master 2 Immunologie Cellulaire, Moléculaire et Vaccinologie (Tours)

2008-2016 Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie et Diplôme d'Etudes Supérieures en Innovation Pharmaceutique et Recherche

• **Expérience professionnelle**

2017-2018 Intervenant pour des formations internes sur les anticorps (Amgen, Sanofi)

2016-2017 Intervenant extérieur pour le cours « Anticorps thérapeutiques » (IUT de Tours)

2013-2016 Tuteur en immunologie (Facultés de Pharmacie de Tours et Angers)

• **Principaux articles scientifiques**

2017 *Crucial role for immune complexes but not FcRn in immunization against anti-TNF- α antibodies* C. Arnoult, G. Brachet et al. *in* Journal of Immunology

2016 *Ecilizumab epitope on complement C5: progress towards a better understanding of the mechanism of action*, G. Brachet et al. *in* Molecular Immunology

2016 *Screening the low molecular weight fraction of human serum using ATR-IR spectroscopy*, F. Bonnier, G. Brachet et al. *in* Journal of Biophotonics

2016 *Increment in drug loading on an antibody drug conjugate increases its binding to the human Neonatal Fc Receptor in vitro*, G. Brachet et al. *in* Molecular Pharmaceutics

2015 *An ion-pairing, reversed-phase liquid chromatography method to assess the cross-contamination of cancer chemotherapy infusions prepared in a dual-operator aseptic isolator*, G. Brachet et al. *in* Drug Testing and Analysis

2015 *Therapeutic drug monitoring of ecilizumab: rationale for an individualized schedule*, P. Gatault, G. Brachet et al. *in* mAbs

• **Activités personnelles et bénévolat**

Nage avec palmes, course à pied, ULM, terrariophilie, guitare, bénévolat (sauvetage aquatique, Hellfest, festival du « Thé Vert », festival international de l'ULM, Société protectrice des Animaux, Bureau des Internes en Pharmacie de Tours), philosophie.

Déterminants moléculaires de la pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques

Résumé

La pharmacocinétique (PK) des anticorps monoclonaux (mAbs) est sujette à d'importantes variations interindividuelles. Le récepteur néonatal au Fc des IgG (FcRn) et le statut immunitaire à l'encontre de ces mAbs sont des déterminants de cette PK. La bioconjugaison des mAbs à des cytotoxiques entraîne une altération de leur PK. Nous montrons que le taux de couplage modifie l'affinité de ces espèces pour le FcRn à pH6. La proportion d'agrégats au sein des solutions d'anticorps armés augmente avec le taux de couplage et pourrait entraîner une altération de leur PK. Par ailleurs, cette agrégation est impliquée dans l'immunogénicité des mAbs, et nous avons donc cherché à identifier des acides aminés impliqués dans l'agrégation de mAbs indiqués en clinique. Il apparaît que la nature biochimique de résidus des paratopes pourrait augmenter cette agrégation. Les anti-TNF- α présentent très peu d'agrégats et figurent pourtant parmi les plus immunogènes chez l'Homme. Nous avons donc exploré le rôle des complexes immuns dans leur immunogénicité chez la souris. Il apparaît que la présence du FcRn n'est pas à l'origine de l'immunisation contre ces mAbs, contrairement à celle des complexes immuns.

Ces résultats donnent des pistes pour la production de mAbs plus efficaces et mieux tolérés.

Mots-clés : Pharmacocinétique ; anticorps monoclonaux thérapeutiques ; anticorps armés ; récepteur néonatal au Fc des IgG ; agrégats ; complexes immuns

Résumé en anglais

The pharmacokinetic (PK) profile of monoclonal antibodies (mAbs) shows interindividual variability. The neonatal Fc receptor (FcRn) and the immunogenicity of these mAbs are determinative factors of mAb PK. Generation of antibody-drug-conjugates alters their PK profile. We show that the affinity for FcRn at pH6 increases with the drug-to-mAb ratio, as does the amount of aggregates inside the mAb-drug-conjugate. The amount of aggregates could be responsible for an avidity effect towards FcRn. These aggregates are known to cause immunogenicity, so we studied biochemical determinants inside the amino acid sequence of marketed mAbs. We show that the biochemical nature of some amino acids inside the paratope has an impact on the amount of aggregation. Anti-TNF- α mAbs show very little aggregation but are very immunogenic in humans. We studied the role of the formation of immune complexes in the immunization against anti-TNF- α mAbs in mice, and showed that immune complexes, but not FcRn are essential in the immunization process against anti-TNF- α mAbs.

These results give leads towards the generation of more efficient, better tolerated mAbs.

Keywords: pharmacokinetics ; therapeutic monoclonal antibodies ; antibody-drug-conjugates ; neonatal Fc receptor ; aggregates ; immune complexes.