THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche U1194 – Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier

DIFFUSION DES ANTICORPS DANS LES TUMEURS SOLIDES : ROLE CLE DE L'AFFINITE/AVIDITE DANS LE « ON TARGET OFF TUMOR »

Présentée par Matthieu GRACIA
Le 16 décembre 2022

Sous la direction du Dr. Bruno ROBERT
et du Dr. Emmanuel DESHAYES

Devant le jury composé de

Élisabeth MIOT-NOIRAULT, MCU, INSERM U1240	Rapportrice
Michel CHEREL, PU-PH, INSERM U1232	Président du Jury
Nathalie HEUZE-VOURC'H, DR, INSERM U1100	Examinatrice
Isabelle NAVARRO-TEULON, CR, INSERM U1194	Examinatrice
Bruno ROBERT, CR, INSERM U1194	Directeur de Thèse
Emmanuel DESHAYES, MCU-PH, INSERM U1194	Co-Directeur de Thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury le Dr. Elisabeth Miot-Noirault, le Pr. Michel Cherel, le Dr. Nathalie Heuzé-Vourc'h et le Dr. Isabelle Navarro-Teulon d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie également le Dr. Martin Villalba et le Dr. David Kryza d'avoir suivi l'évolution de mon projet de thèse lors des différents comités de thèse.

Je remercie mes deux directeurs de thèse Bruno et Emmanuel. Merci Bruno de m'avoir permis de prendre mes marques dans ce domaine qui m'était assez inconnu au début il faut bien l'avouer, d'avoir toujours été disponible et dévoué sur l'avancée du projet. Merci Emmanuel d'avoir accepté de co-diriger mon projet comme première expérience d'encadrement de thèse de science. Merci de ton implication sans faille dans le projet. J'ai été très content de vous avoir comme co-directeurs de thèse et je pense être assez chanceux d'avoir eu l'opportunité de mener ce projet à vos côtés. Nos réunions du Mercredi après-midi à 16h30 dans ton bureau Emmanuel vont me manquer.

Je remercie le CHU de Montpellier pour m'avoir permis d'effectuer mon internat IPR dans ces conditions d'autonomie et sans contraintes de stages.

Je remercie également le LabEx MabImprove pour les conférences, retraites et congrès organisés qui m'ont permis d'étoffer ma connaissance scientifique et de créer des liens professionnels.

Je remercie bien évidemment Pierre de m'avoir si gentiment accueilli dans l'équipe « PM ». Un tel dévouement scientifique malgré un emploi du temps très souvent surchargé témoigne de tout l'amour que vous portez à votre travail. Vous avez toujours su trouver quelques minutes pour répondre à mes interrogations et je ne vous en remercierais jamais assez.

Je remercie bien entendu tout l'équipe PM avec qui j'ai pu parler boulot mais pas que. Une équipe aussi impliquée professionnellement et humainement parlant est une chose rare que j'ai eu la chance de côtoyer quotidiennement. Merci à Tristan pour m'avoir épaulé et aidé pour la mise en route de mon projet et pour les moments extérieurs passés ensemble. Merci Margaux pour les interactions professionnelles, les ref à Astérix et Obélix Mission Cléopâtre ou au Flambeau et les duos endiablés au labo et au Labex. Merci à Célestine, Anais, VRP, Vincent, Eve, Marie, Coco ou encore Laurence pour les

moments partagés au labo et/ou au Labex. Bon courage à toi Diego pour ton projet. Une thèse effectuée dans une autre équipe n'aurait pas eu la même saveur j'en suis persuadé.

Je remercie le reste du « Bureau des Stars » faisant parti de l'équipe CG avec Mathilde, Candice et Alex pour tous les moments partagés au sein du labo et en dehors. Merci aussi aux autres doctorants et en particulier à Pénélope pour l'organisation de la JET, pour les pauses café, les soirées, les jeux et la bonne humeur quotidienne qui m'ont permis de m'épanouir pendant ces trois années de thèse.

Je remercie également la plateforme GenAc avec Myriam, Madeline, Laurine et Audrey pour les discussions scientifiques et l'aide précieuse lors des productions d'anticorps.

Je remercie la plateforme PP2I et particulièrement Martine et Corinne pour le BIACORE et les explications techniques sur la méthode SPR.

Je remercie l'animalerie, Adeline, Isabelle, Salima, Florie et Lucie pour leur aide quotidienne sur les manips *in vivo*, tant sur la gestion des souris que sur les greffes ou injections d'anticorps.

Je remercie également le plateau RHEM et particulièrement Nelly, Hanane et Alicia pour les formations à l'IHC, à 100LIMS et pour les analyses de mes lames d'IHC.

Je remercie la plateforme IPAM et particulièrement Sophie et Yann pour leur aide précieuse lors de la manip PET-CT tant sur la bioconjugaison, le radiomarquage et l'injection de nos anticorps que sur les images PET et leur analyse sur logiciel.

Merci aux services administratifs et de gestion de l'IRCM, spécialement Nadia, Daniela et Deborah pour leur aide lors de l'organisation de la JET ou la gestion de tous les problèmes administratifs inhérent à une thèse (dieu sait qu'il y en a beaucoup).

Je remercie l'ensemble des personnes de l'IRCM que j'ai pu côtoyer ou juste croiser ainsi que la direction de l'IRCM, anciennement Claude Sardet et actuellement Nathalie Bonnefoy pour leur accueil au sein de leur institut.

Je tiens à remercier mes copains interne qui ont contribué au bon déroulement de ces années mais bon je vous ai déjà tout dit dans la thèse de Pharmacie.

Je remercie tous mes copains de plus longue date, Alexis, Mégane, Clément, Morgane, Sylvain, Elsa, Jojo, Cloé, MHB, Maxime, Laurie, Julien, qui ont toujours su trouver les mots pour me changer les idées et qui m'ont toujours soutenu dans ma démarche pendant ces trois ans.

Merci à ma belle-famille qui m'a accueillie et épaulée de façon tellement naturelle que je n'aurais pas pu trouver mieux. La rem's family ne cessera jamais de m'étonner.

Enfin, je tiens à remercier ma famille qui s'est toujours intéressée à mon projet et qui a été d'un soutien sans faille comme depuis le début de ma vie et, je le sais, encore pour longtemps. Merci à mes grands-parents Yvon, Jacqueline, Padri et Natou, à mes oncles et tantes Véro, Manelle, Amandine et Laurent, à mes cousins Emma, Llucia et David, à mes parents Olivia et François et à ma sœur Lisa et Greg. Je souhaite remercier le petit nouveau de la famille, mon neveu Giulian, qui a su égayer la 3 dernières semaines de ma thèse alors que j'étais « dans le dur ». Merci à vous tous pour votre soutien exceptionnel, au-delà de mes espérances.

Enfin, je veux remercier ma femme, Julie, qui comble ma vie depuis des années. Je pense que cette thèse est un peu la tienne aussi en réalité. Tu as toujours su me redonner confiance en moi et m'épauler à chaque épreuve de cette thèse. Je ne te remercierai jamais assez mais comme tu sais combien Je t'aime les mots ne sont plus assez forts pour décrire ce qui nous lie. Vivement les prochaines échéances (un mini nous) qui vont arriver bien plus vite qu'on ne le pense...

Table des matières

Liste figures et tableaux 1
Liste des abréviations 6
PREAMBULE 6
INTRODUCTION 7
1. Immunothérapie et utilisation thérapeutique 8
1.1. Les anticorps monoclonaux 8
1.1.1. Structure globale 8
1.1.2. Différents formats 10
1.1.3. Voies d'administration 13
1.2. Nouvelles immunothérapies 16
1.2.1. Anticorps Conjugué à une drogue cytotoxique (ADC) 16
1.2.2. Anticorps bispécifique classique et ceux engageant les cellules T (BiTE) 17
1.2.3. Lymphocytes T modifiés avec un récepteur antigénique chimérique (CAR-T) 18
1.2.4. Radioimmunothérapie (RIT) 18
1.3. Mécanismes d'action 20
1.3.1. Action par fixation du Fab 21
1.3.2. Action par fixation du Fc 25
1.4. Toxicité des immunothérapies 27
1.4.1. Liée à la cible dit « on target » 27
1.4.2. Indépendant de la cible dit « off target » 28
1.5. Suivi de la distribution des anticorps monoclonaux 30
1.5.1. Immunohistochimie (IHC) 30
1.5.2. Imagerie isotopique 30
1.5.3. Dosage plasmatique 31
2. Voies d'optimisations des anticorps monoclonaux 32
2.1. Fragment antigen binding ou Fab 32
2.2. Fragment cristallisable ou Fc 34
2.3. Masquage paratope 37
2.4. pH dépendance 39
3. La cible choisie : Récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) 42
3.1. Structure membranaire et facteur soluble 42
3.2. Rôle physiologique 43
3.3. Intérêt thérapeutique en cancérologie 44
4. Développement d'anticorps d'affinité diminuée pour réduire le « on target off tumor » 44
4.1. Un anticorps d'affinité réduite en cancérologie 44
4.2. Réduction du ciblage du tissu sain 45

4.3. Augmentation de la diffusion 48
RESULTATS 50
1. Sélection par phage display et mise au format IgG1 51
1.1. Phage display sur EGFR 51
1.2. Sélection des clones d'intérêts 53
1.3. Mise au format IgG1 54
2. Caractérisation *in vitro* des clones choisis au format IgG1 56
2.1. ELISA 56
2.2. Dose réponse 57
2.3. BIACORE 60
3. Validation *in cellulo* des anticorps au format IgG1 63
3.1. Lignées cellulaires choisies 63
3.2. Quantification nombre récepteurs 63
3.3. Cytométrie des anticorps mutés Fc-LALAPG sur la lignée THP1 64
3.4. Cytométrie des anticorps anti hEGFR 65
4. Tests complémentaires des anticorps produits 70
4.1. Fixation/Internalisation des anticorps 70
4.1.1. Principe de l'étude 70
4.1.2. Résultats préliminaires 70
4.2. HEK-FcTM pour modèle cellulaire d'expression de mEGFR 71
4.2.1. Mise au point du modèle 71
4.2.2. Validation du modèle 73
5. Études *in vivo* de la fixation et diffusion de nos anticorps anti EGFR 75
5.1. Modèle d'étude 75
5.1.1. Choix des lignées cellulaires et du modèle murin 75
5.1.2. Choix des anticorps à injecter 75
5.2. Analyse en IHC des résultats 76
6. TEP-TDM 79
6.1. Choix des lignées cellulaires et du modèle murin 79
6.2. Choix des anticorps, bioconjugaison, radiomarquage et injection 79
6.3. Quantification par imagerie TEP-TDM 81
6.4. Biodistribution conventionnelle des anticorps 86
CONCLUSION ET DISCUSSION 88
MATERIELS ET METHODES 95
1. Sélection des clones spécifiques et mise au format Immunoglobuline G 96
1.1. Sélection des séquences VH/VL 96
1.2. Réactions de Golden Gate 96
1.2.1. Clonage des VH/VL dans le vecteur pEF-hu-IgG1 96

1.2.2. Clonage des VH/VL dans le vecteur pEF-hu-IgG1-LALAPG 97
1.2.3. Clonage mEGFR-ECD dans le vecteur pEF-huFc-6His 97
1.3. Amplification bactérienne de la construction Golden Gate 97
1.4. Criblage PCR, séquençage et production d'ADN 98
1.4.1. Contrôle clonage VH/VL dans les vecteurs pEF-hu-IgG1 et pEF-hu-IgG1-LALAPG 98
1.4.2. Contrôle clonage mEGFR-ECD dans le vecteur pEF-huFc-6His 99
2. Production au format IgG en Cellules Embryonnaires Humaines de rein (HEK 293T) : 99
2.1. Culture et transfection en cellule HEK 293T 99
2.2. Récupération du surnageant 100
2.3. Purification des protéines recombinantes d'intérêt 100
3. Caractérisation in vitro des clones 101
3.1. Le tampon phosphate 101
3.2. ELISA 102
3.3. BIACORE 102
4. Analyse cellulaire des anticorps 103
4.1. Culture cellulaire 103
4.2. Expression de la protéine mEGFR-pEF-huFc-6His en transmembranaire 103
4.3. Quantification du nombre de récepteurs à l'EGF sur les lignées cellulaires 104
4.4. Cytométrie des anticorps mutés Fc-LALAPG sur la lignée THP1 105
4.5. Cytométrie et fixation des anticorps sur les lignées 105
4.6. Test fixation/internalisation des anticorps 105
5. Tests *in vivo* 106
5.1. Immunohistochimie (IHC) 106
5.1.1. Culture cellulaire, xénogreffe et suivi de taille 106
5.1.2. Injection des anticorps 106
5.1.3. Sacrifice et quantification IHC 107
5.2. Tomographie par Émission de Positons (TEP) 107
5.2.1. Culture cellulaire, xénogreffe et suivi de taille 107
5.2.2. Bioconjugaison des anticorps 108
5.2.3. Radiomarquage et injection des anticorps 109
5.2.4. Imagerie TEP-TDM 109
5.2.5. Sacrifice et biodistribution conventionnelle 110
BIBLIOGRAPHIE 111
ANNEXE 143

Liste figures et tableaux

Figure 1: Structure d'une Immunoglobuline G de type 1. 10
Figure 2: Isotype IgG, monomère IgGA et IgD (A) ; Sous-classe IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C), IgG4 (D) ; Isotype monomère IgE et monomère IgM (E) ; Pentamère IgM (F) ; Dimère IgA sécrétrice (G). Les ponts disulfures sont matérialisés en rouge, la chaîne J en noire et la pièce sécrétoire en jaune. 11
Figure 3: Anticorps murin, chimérique, humanisé et humain au format IgG1. Les zones bleues sont murines et celles vertes sont humaines. 12
Figure 4: Représentation du Trastuzumab Emtansine (KADCYLA®) avec un DAR de 3 en moyenne. 16
Figure 5: Pont du Blinatumomab entre la cellule tumorale (CD19) et la cellule T (CD3) (A) ; 17
Figure 6: Récepteur des cellules T à gauche ciblé par les TCE. Au milieu un scFv (CAR) chargé sur un lymphocyte T. Sur la droite, un autre type de CAR avec une structure Fc + ligand. 18
Figure 7 : Ibritumomab tiuxétan (ZEVALIN®) constitué d'un anticorps murin anti CD20, d'un linker isothiocyanatobenzyl, d'un chélateur DTPA et d'un radionucléide l'Yttrium 70. 19
Figure 8: Nombre d'anticorps thérapeutiques approuvés par l'Union Européenne ou les États-Unis depuis 1997 selon leurs indications cliniques (d'après Antibodysociety.org). 21
Figure 9: Schéma modifié de la publication de Okazaki et al. Mécanisme d'action des anticorps anti PD-1 et anti PDL-1 (A) et des anticorps anti CTLA-4 (B). 23
Figure 10: Cytotoxicité médiée par le Fc par ADCP (phagocytose via macrophage), CDC via IgG1 en héxamère (système du complément) et ADCC (Natural Killer par enzymes protéolytiques). 26
Figure 11 : Schéma diabody simple chaîne (scDb) ciblant le CD3 et le HLA-p53 muté R175H (Hsiue et al. 2021). 33
Figure 12 : Schéma explicatifs des anticorps masqués. Anticorps anti EGFR protégé par un peptide protecteur (triangle rouge) et un linker clivable (orange) (Desnoyers et al. 2013) (A) ; Anticorps anti CTLA4 (vert) avec une protection par un scFv dirigé contre le PSCA (bleu) via un linker clivable (lien noir) (Pai et al. 2018) (B) ; Anticorps anti CD19 protégé par une super hélice alpha reliée par un linker clivable (lien noir) (Trang et al. 2019) (C). 38
Figure 13 : Figure modifiée de l'anticorps bispécifique anti-FOLR1 avec son Fab anti-CD3 protégé par un scFv anti-CD3. L'action des enzymes permet de cliver le lien, de détacher le scFv protecteur et libérer le Fab anti-CD3 afin qu'il puisse jouer son rôle en péri-tumoral. 39
Figure 14: Glycolyse anaérobie et effet Warburg issus de la publication de Mangeat et al. sur l'effet Warburg. AAT = antigènes associés aux tumeurs ; LDH = lactate déshydrogénase ; GLUT =

transporteurs du glucose ; CA = anhydrase carbonique ; MCT = transporteur des monocarboxylates ; NHE = transporteur du sodium et du proton (Mangeat et al. 2020). 40
Figure 15: Une partie des voies de signalisations de l'EGFR après fixation de son antigène EGF ainsi que le mécanisme d'action des anticorps anti EGFR qui bloquent la dimérisation du récepteur et la cascade de phosphorylations qui en découle. 43
Figure 16: Schéma explicatif du ciblage d'un anticorps d'affinité réduite. Ciblage d'un ADC de DAR 2 d'affinité réduite à l'aide d'un schéma modifié de Wong et al (A) ; 46
Figure 17 : Principe d'une sélection par phage display sur protéine immobilisée sur plaque (en rouge). 51
Figure 18 : Résultats par ELISA de l'enrichissement des phages polyclonaux spécifiques de hEGFR (bleu) et mEGFR (rouge) sur les trois tours de sélection aux deux pH. La sélection à pH acide est représentée à gauche et celle à pH physiologique à droite. Le contrôle négatif est effectué sur la protéine irrelevante DDR1. 52
Figure 19 : Résultats de la fixation des 96 clones au format scFv sur les protéines d'intérêts par ELISA à pH physiologique (partie gauche). Fixation des scFv sur la protéine irrelevante Fc (Evitria) avec les hits positifs en blanc et ceux négatifs en rouge (1) ; Fixation des scFv sur la protéine hEGFR avec les hits positifs en rouge et ceux négatifs en blanc (2) ; Fixation des scFv sur la protéine mEGFR avec les hits positifs en jaune et ceux négatifs en blanc (3) ; Récapitulatif des hits positifs pour les deux protéines hEGFR et mEGFR en jaune et ceux négatifs en blanc (4). 53
Figure 20 : Vérification de la bonne insertion des VH et VL. Le gel permet de vérifier la bonne taille de 1871pb en ligne rouge sur gel d'agarose si VH et VL ont été intégrés (A) ; Alignement de la séquence théorique (supérieure) sur la séquence de notre clone (inférieure) (B). 54
Figure 21 : ELISA de contrôle de la fixation de nos six anticorps sur la protéine hEGFR-hFc à trois concentrations. La fixation est évaluée à pH physiologique (7,4) en noir et à pH acide (6) en rouge.. 56
Figure 22 : Évaluation de la capacité dose réponse des anticorps de contrôle positif le Cetuximab et le Panitumumab aux pH physiologique (7,4) et acide (6) sur la protéine hEGFR-hFc. 57
Figure 23 : Évaluation des doses réponses des anticorps contrôle et de nos six anticorps au pH physiologique de 7,4 (au-dessus) et au pH acide de 6 (en-dessous). 58
Figure 24 : Évaluation des doses réponses individualisées pour chaque anticorps en condition acide (pH = 6) en rouge et physiologique (pH = 7,4) en noir. L'anticorps contrôle Panitumumab en bleu est évalué à pH physiologique (pH = 7,4). Les six anticorps sont : B1 (A) ; B2 (B) ; B12 (C) ; G5 (D) ; G8 (E) et H3 (F). 59
Figure 25 : Schéma du fonctionnement du BIACORE dans notre cas de figure (partie supérieure). Représentation des courbes du BIACORE pour les anticorps B2 et G5 respectivement de gauche à droite. Les phases de croissance, de plateau et de décroissance sont bien visibles. L'axe des

ordonnées correspond à l'intensité de fixation à un moment précis en unité de résonance (RU) et l'axe des abscisses correspond au temps (sec). 60
Figure 26 : Quantification du nombre de récepteurs EGFR humain par cellules pour les six lignées étudiées. Cette quantification est basée sur le Quantum Simply Cellular kit (Bangs Laboratories). Toutes les lignées ont été quantifiées au moins trois fois sauf A 431 (n=1) et BxPC3 (n=2). 63
Figure 27 : Évaluation de la fixation des anticorps Fc WT (bleu), Fc muté LALAPG (orange) sur la lignée THP1. Le contrôle négatif est représenté en rouge avec le secondaire seul (anti huFab 3835)..... 64
Figure 28 : Évaluation des cellules seules (orange) et de l'anticorps secondaire seul 3835 (blanc et noir) sur les six lignées étudiées dans l'ordre croissant du nombre de récepteurs hEGFR. 65
Figure 29 : Évaluation globale de la fixation des anticorps au format LALAPG sur les cinq lignées étudiées à pH physiologique (7,4). L'anticorps secondaire seul (anti hu Fab 3835) est représenté en blanc tandis que le Cetuximab est représenté en gris foncé. Tous nos anticorps sont représentés en gris clair. L'axe des ordonnées correspond au nombre d'évènements de fluorescence et l'axe des abscisses à l'intensité de fluorescence..... 66
Figure 30 : Évaluation de la fixation de nos six anticorps sur la lignée A431 à pH physiologique (7,4) à l'aide d'un anticorps secondaire anti hu Fab 3835. Nos anticorps sont représentés en noir tandis que l'anticorps secondaire seul (3835) est représenté en blanc. 67
Figure 31 : Évaluation globale de la fixation des anticorps au format LALAPG sur les cinq lignées étudiées à pH acide. L'anticorps secondaire seul est représenté en gris clair tandis que les anticorps à l'étude sont représentés en gris foncé à pH physiologique (7,4) et en blanc à pH acide (6). L'axe des ordonnées correspond au nombre d'évènements de fluorescence et l'axe des abscisses à l'intensité de fluorescence 68
Figure 32 : Évaluation de la fixation de nos six anticorps sur la lignée A431 à pH physiologique (noir) et à pH acide (rouge). L'anticorps secondaire seul (anti hu Fab3835) est représenté en blanc..... 69
Figure 33 : Test de fixation/internalisation pour le Cetuximab (A) et le Panitumumab (B) sur trois lignées SW 620, MDAMB 231 et HCC 827 respectivement d'expression nulle, moyenne et forte pour hEGFR. Les tests statistiques sont effectués par rapport à la lignée SW 620 par ANOVA. * = P-value < 0,05 ; *** = P-value < 0,001. 71
Figure 34 : ELISA sur la protéine mEGFR pour nos six anticorps d'études et nos deux anticorps de contrôle à différentes concentrations à l'aide de l'anticorps secondaire anti huFab (A0293)..... 72
Figure 35 : Schéma explicatif de l'expression transmembranaire induite par la doxycycline du Fc couplé au domaine extracellulaire de l'EGFR murin sur la lignée stable HEK-FcTM. Un anticorps primaire marqué ne nécessite pas d'anticorps secondaire marqué mais si l'anticorps primaire n'est pas marqué, l'anticorps secondaire marqué est indispensable..... 72

Figure 36 : Validation de l'induction du Fc transmembranaire par la doxycycline sur la lignée HEK-FcTM par un anticorps secondaire anti Fc 3236. Nous avons l'anticorps 3236 sur les HEK-FcTM non induites WT (blanc et noir), l'anticorps 3236 sur les HEK-FcTM induites (bleu) et enfin l'anticorps 3236 sur les HEK-FcTM transfectées par le vecteur mEGFR-pEF-huFc-6His (rouge). 73
Figure 37 : Évaluation de la fixation du Cetuximab par un anticorps secondaire anti huFab 3835 sur les HEK-FcTM transfectées par le vecteur mEGFR-huFc-6His et induites par la doxycycline. L'anticorps secondaire seul est bien négatif en cytométrie sur la lignée non induite (blanc et noir) ou induite (bleu) (A). Sur la lignée induite, l'anticorps seul est négatif (bleu) et le Cetuximab est positif (rouge) (B). Le Cetuximab est positif que ce soit sur la lignée non induite (blanc), induite (bleu) et induite transfectée (rouge) (C). 74
Figure 38 : Méthode d'analyse IHC de nos coupes avec comme exemple ici une tumeur MDAMB 231 post injection au Panitumumab. On quantifie notre anticorps sur le marquage anti IgG1 humain au DAB (A) en se basant sur le marquage anti EGFR au DAB (B) et le marquage H&E (C) pour choisir la zone d'analyse. 76
Figure 39 : Quantification des anticorps au niveau tumoral sur les lignées A 431 (bleu) et MDAMB 231 (rouge) greffées chez la souris à 96h. Le test ANOVA de comparaison inter anticorps a été effectué systématiquement en comparaison avec l'anticorps 13R4a contrôle négatif pour les lignées cellulaires correspondantes. Le test ANOVA intra anticorps compare la fixation du même anticorps sur les deux lignées. La significativité est représentée par * < 0,05 ; ** < 0,01 ; *** < 0,001 ; ns = non significatif. 77
Figure 40 : Comparaison des deux résultats de la spectrométrie de masse de l'anticorps B2-1 non couplé au DFO (courbe bleue) et couplé au DFO (courbe rouge). L'axe des abscisses correspond au ratio masse/charge (m/z) et l'axe des ordonnées correspond à l'intensité du signal. 80
Figure 41 : Dose réponse de contrôle post bioconjugaison au DFO de tous nos anticorps avant l'imagerie PET. Nos anticorps nus sont en ligne pleine et ceux bioconjugués au DFO en ligne pointillée avec les anticorps de contrôle (A) et nos anticorps d'intérêts (B). 81
Figure 42 : Résultats de la quantification par imagerie TEP-TDM de la biodistribution de nos anticorps dans les deux tumeurs, le foie, le cœur et le muscle aux quatre temps d'analyse 48h (A), 72h (B), 96h (C) et 168h (D) exprimés en %IA/cm^3. 82
Figure 43: Résultats de la quantification par imagerie TEP-TDM de la biodistribution de nos anticorps selon le temps d'analyse sur MDAMB 231 (A) ; A 431 (B) ; foie (C) ; coeur (D) exprimés en %AI/cm^3. 83
Figure 44 : Résultats de la comparaison de nos trois anticorps à l'étude par rapport à nos deux anticorps de contrôle positif par quantification via imagerie TEP-TDM à 96h sur la lignée MDAMB 231 (en rouge à gauche) et A 431 (en bleu à droite). Un test 1way ANOVA a été effectué. La significativité est représentée par * < 0,05 ; ** < 0,01 ; *** < 0,001 ; ns = non significatif. 84

Figure 45 : Quantification par imagerie TEP-TDM à 168h de la répartition entre les deux tumeurs (MDAMB 231 et A 431) ainsi que dans le muscle de nos anticorps. Un test 1way ANOVA a été effectué. La significativité est représentée par * < 0,05 ; ** < 0,01 ; *** < 0,001 ; ns = non significatif. 84
Figure 46 : Images TEP-TDM des souris injectées par l'anticorps B1 en intra péritonéal (IP) à 168h. On retrouve des coupes coronale (B) et axiales (A; C; D). Les flèches blanches représentent la même tumeur de forte expression d'hEGFR (A 431) tandis que les flèches rouges nous montrent la même tumeur d'expression moyenne de la cible (MDAMB 231) chez la même souris. 85
Figure 47 : Images TEP-TDM des souris injectées par l'anticorps Panitumumab en intra péritonéal (IP) à 168h. On retrouve des coupes coronale (B) et axiales (A). Les flèches blanches représentent la même tumeur de forte expression d'hEGFR (A 431) tandis que les flèches rouges nous montrent la même tumeur d'expression moyenne de la cible (MDAMB 231) chez la même souris. 86
Figure 48 : Résultats de la biodistribution conventionnelle effectuée sur les deux tumeurs (MDAMB 231 et A 431) pour chacun de nos anticorps à 168h exprimés en % AI/g. Un test 1way ANOVA a été effectué. La significativité est représentée par * < 0,05 ; ** < 0,01 ; *** < 0,001 ; ns = non significatif. 87

Tableau 1 : Rendements de production des différents clones par production en cellules HEK 293T. . 55
Tableau 2 : Comparaison des EC50 des six anticorps contre la protéine hEGFR-hFc aux deux pH physiologique et acide (7,4 et 6) exprimé en nano molaire (nM) (n=1). 59
Tableau 3 : Résultats du BIACORE pour chaque anticorps selon le pH d'analyse de la solution de flux contenant le ligand huEGFR monomérique (n=1). 61
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des tumeurs affiliées à chaque anticorps ainsi que de la posologie d'injection chez la souris. 76
Tableau 5 : Résultats de la bioconjugaison de nos six anticorps avec le DFO. Les valeurs correspondent au pic du composé avec ou sans DFO en spectrométrie de masse. MM = masse molaire. Le ratio DFO/mAb est un ratio théorique du nombre de composé DFO par anticorps..... 80
Tableau 6 : Équilibre des deux solutions de phosphate mono et dibasique pour obtenir une solution finale de tampon phosphate à un pH donné. 102

Liste des abréviations

ADA : anti-drug antibody
ADC : Antibody Drug Conjugate
ADCC : Cytotoxicité à mediation cellulaire dépendante des anticorps
ADCP : phagocytose cellulaire dépendante des anticorps
AE : auger électrons
BCMA : antigène maturation LB
BiTE : Bi-specifique T-cell engager
CAR-T cell : Chimeric antigen receptor T cell
CD : cluster de différenciation
CDC : cytotoxicité dépendante du complement
CDR : complementary determining region
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CPM : coups par minute
CTLA4 : cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
DFO : déféroxamine
DMLA : Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DSRCT : tumeurs desmoplastiques à petites cellules rondes
DTPA : acide diéthylène triamine penta acétique
EC50 : concentration efficace médiane
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA : enzyme linked immunosorbent assay
EMA : European Medecines Agency
Fab : fragment antigen binding
FACS : fluorescence activated cell sorting
Fc : fragment crystallisable
FcγR : Récepteur à la portion Fc des IgGs
FDA : Food and Drug Administration
FOLR1 : récepteur folates 1
FR : framework
FR : region framework
GP : glycoprotéine
HAS : haute autorité de santé
HER : human epidermal growth factor receptor
HMDP : hydroxyméthylène diphosphonate disodique
HuscI : librairie d'intrabody scFv humains
IA : activité injecté
IC50 : concentration inhibitrice 50
Ig : immunoglobuline
IHC : immunohistochimie
IL : interleukine
IM : intra musculaire
IP : intra péritonéal
IV : intra veineuse
Kd : constante de dissociation
LAL : leucémie aiguë lymphoblastique
LLC : leucémie lymphoïde chronique
Log P : Coefficient de Partage
LT/LB : lymphocyte T ou B
mAb : monoclonal antibody
MAC : complexe d'attaque membranaire
MMAE : monométhyl auristatine E
MMP : métalloprotéinase
MT-SP1 : protéase sérique transmembranaire de type 1
NK : cellules natural killer
NRG-1 : neuréguline 1
PCSK9 : Proprotéine Convertase Subtilisine/Kexine de type 9
PD1 : Programmed cell Death 1
PD-L1 : Programmed cell death ligand 1
PEG : polyéthylèneglycol
pH : Potentiel Hydrogène
pKa : constante de dissociation de la molécule
PSCA : antigène cellules souche à la prostate
PSMA : antigène membranaire spécifique de la prostate
RIT : radioimmunothérapie
SC : sous cutané
scFv : single chain fragment variable
SPR : surface plasmonic resonance
TAE : tris acétate EDTA
TCE : T-cell engager
TEP-TDM : Tomographie par émission positons couplée avec tomodensitométrie
TfR1 : récepteur à la transferrine 1
TLE : transfert linéique d'énergie
TNFα : tumor necrosis factor α
VEGF : vascular endothelial growth factor
V_H/C_H : Chaînes lourdes variable et constante
V_L/C_H : Chaînes légères variable et constante
VRS : virus respiratoire syncytial
WT : type sauvage

PREAMBULE

Ce travail de thèse s'inscrit dans un contexte de croissance de la prise en charge des maladies par les immunothérapies. De nombreux formats différents se développent tels que les ADC, CAR T ou encore les TCE pour compléter l'arsenal thérapeutique formé en majorité d'IgG au format classique (IgG1, IgG2). Ces immunothérapies sont utilisées, entre autres, dans la prise en charge de tumeurs solides telles que les cancers : colorectal, pulmonaire ou cutané. Les cibles de ces immunothérapies sont surexprimées au niveau tumoral mais également exprimées à des niveaux plus faibles sur certains tissus sains (EGFR au niveau des kératinocytes de la peau). L'immunothérapie, injectée à des doses importantes et détenant des capacités de fixation importante sur sa cible (haute affinité et avidité), se localisera en majorité sur le tissu tumoral mais également sur le tissu sain pouvant induire des toxicités.

Nous avons développé des anticorps ciblant l'EGFR humain, cible surexprimée dans différents cancers (colorectal, épidermoïde de la tête et du cou), avec une affinité réduite en comparaison aux anticorps déjà utilisés en clinique que sont le Cetuximab (ERBITUX®) et le Panitumumab (VECTIBIX®). Nous espérons maintenir une fixation sur un tissu exprimant fortement la cible (tissu tumoral) par la forte avidité (due aux nombres de récepteurs importants) tout en réduisant la fixation sur un tissu, exprimant moyennement ou faiblement la cible, équivalent à un tissu sain chez le patient.

Notre premier objectif est de caractériser ces anticorps *in vitro* et *in cellulo* pour évaluer leur affinité. Dans un second temps, nous évaluerons leur fixation *in vivo* sur un modèle de double xénogreffes tumorales, mimant un tissu tumoral et un tissu sain, en les comparant aux anticorps Cetuximab, Panitumumab, de forte affinité et utilisés en clinique par immunohistochimie. Enfin, le dernier objectif est d'étudier, au plus près de la clinique et par imagerie TEP, la distribution de nos anticorps dans le même modèle que précédemment et de les comparer aux anticorps de contrôle positif Cetuximab, Panitumumab et négatif 13R4a.

La réduction de cette toxicité sur le tissu sain tout en maintenant une bonne efficacité sur le tissu tumoral chez les patients doit permettre d'agrandir l'intervalle thérapeutique. La prise en charge en ressort optimisée aussi bien pour les immunothérapies au format IgG que pour les nouvelles immunothérapies aux formats ADC, CAR T ou TCE.

INTRODUCTION

1. Immunothérapie et utilisation thérapeutique

1.1. Les anticorps monoclonaux

1.1.1. Structure globale

Les immunoglobulines sont des protéines sécrétées par des lymphocytes B différenciés que l'on appelle « plasmocytes ». Ces protéines forment la superfamille des glycoprotéines dont les anticorps font partie au même titre que le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les anticorps monoclonaux constituent le type d'immunoglobuline principalement retrouvé dans le sérum.
Les anticorps monoclonaux (ou mAb pour « Monoclonal Antibody ») font partis des glycoprotéines qui détiennent un haut poids moléculaire (150 000 Daltons pour le format dit « classique » IgG1) (**Fig. 1**). Ils sont composés de quatre chaînes polypeptidiques qui s'articulent pour obtenir une conformation en « Y » qui permet une symétrie. Ces quatre chaînes sont réparties en deux chaînes lourdes (H en indice pour « Heavy ») et deux chaînes légères (L en indice pour « Light »). Ces chaînes sont reliées entre-elles par des ponts disulfures (S-S) inter chaînes. Ces liaisons covalentes sont retrouvées au niveau de la région charnière (« hinge » en anglais) entre les chaînes lourdes et au niveau des parties constantes des chaînes lourdes et légères de la partie Fragment Antigen Binding (Fab) de l'anticorps. On observe également des liaisons non covalentes (électrostatiques, VDW) qui stabilisent l'ensemble. Il existe plusieurs sous types de chaînes lourdes et légères :

- 5 sous types de chaînes lourdes nommées γ, μ, α, δ et ε qui correspondent respectivement aux isotypes IgG, IgM, IgA, IgD et IgE.
- 2 sous types de chaînes légères nommées kappa (κ) et lambda (λ).

Le format IgG détient une chaîne lourde avec un poids moléculaire de 50kDa et une chaîne légère de 25kDa. Les chaînes lourdes sont composées d'un domaine variable (V_H) et d'un domaine constant (C_H). Le domaine variable diffère entre les sous types par le nombre de segments (V, D et J) qui le compose. Le domaine constant varie aussi entre les sous types en fonction du nombre de segments. La plupart du temps cela donne lieu à un domaine constant à 3 entités (C_H1, C_H2, C_H3) mais les isotypes IgM et IgE détiennent une quatrième entité à leur domaine constant (C_H4) sur leur chaîne lourde. Les chaînes légères sont constituées d'un domaine constant (C_L) et d'un domaine variable (V_L). La différence principale entre le sous type kappa et celui lambda réside dans la partie constante. En effet, le sous type kappa détient un seul segment codant pour sa région constante tandis que le sous type lambda possède 4 segments codants pour sa région constante. On retrouve également des différences du fait de certains segments initialement présents mais in fine non fonctionnels et de réarrangements géniques. La quantité de sucres, leur charge, leur poids moléculaire et la composition

globale en acides aminés sont autant de caractéristiques permettant également de différencier les isotypes.

Un domaine, variable ou constant, est composé d'une centaine d'acides aminés organisés en feuillets β anti-parallèles. Ces feuillets sont stabilisés par un pont disulfure (S-S) intra chaîne. Les domaines constants ont des rôles très variés allant de l'activation des cellules immunitaires à l'élimination des complexes immuns en passant par l'activation du système du complément. Les domaines variables, quant à eux, permettent la liaison de l'anticorps à sa cible (antigène, récepteur). Cette liaison est permise à l'aide des régions hypervariables appelées aussi régions déterminant la complémentarité (CDR pour « Complementary Determining Region »). Ces régions sont au nombre de 3 sur la partie variable de la chaîne légère (L1, L2 et L3) et sur la partie variable de la chaîne lourde (H1, H2 et H3). Ces régions ont une diversité très vaste en acides aminés. Les segments intermédiaires sont plus stables et sont appelés régions charpentes (FR pour « framework »). Elles sont au nombre de 4. Un anticorps détient deux sites de liaisons à sa cible qui sont appelés « paratope » et qui sont constitués des parties variables des chaînes lourdes et légères (V_H + V_L). La cible, quant à elle, détient un épitope (appelé déterminant antigénique) qui est la zone de la molécule reconnue par le paratope de l'anticorps. Cette association paratope/épitope permet l'interaction anticorps/antigène et l'engagement de la réaction immunitaire.

L'anticorps peut être réduit au niveau de ses ponts disulfures ou bien fractionné par clivage enzymatique spécifique. La partie inférieure de l'anticorps, composée des domaines constants 2 et 3 des chaînes lourdes (C_H2 et C_H3) et du « hinge », est appelée le fragment cristallisable (Fc). Le Fc a un poids moléculaire d'environ 50kDa. Ce fragment Fc permet un recrutement de cellules immunitaires, expliquant certaines propriétés biologiques de l'Immunoglobuline. Ce fragment sera développé plus loin dans le manuscrit. La partie composée de la chaîne légère (V_L + C_L) et de la partie supérieure de la chaîne lourde (V_H + C_H1) est appelée le fragment de fixation à l'antigène (Fab). Ce fragment Fab est monovalent (50kDa). D'autres fragments de tailles réduites sont recensés comme le fragment F(ab')2 qui est l'assemblage des deux fragments Fab reliés par la région charnière (hinge). Ce fragment se compose de toute la partie supérieure de l'anticorps (environ 110kDa) et est un fragment divalent. Un fragment plus petit en taille est le fragment variable à chaîne unique non naturel (scFv) qui comporte uniquement les régions variables (V_L et V_H) des chaînes lourdes et légères reliées par un linker. Ce fragment est monovalent (25kDa). Enfin, les V_HH sont les fragments les plus petits et correspondent à un seul domaine variable en monomère (12-15kDa). Les fragments Fab, F(ab')2 et scFv comportent tous les trois les propriétés de liaison de l'anticorps à sa cible via le paratope. Cette liaison est définie par l'affinité caractérisée par une constante de dissociation à l'équilibre nommée Kd.

L'affinité d'un anticorps pour sa cible se définit donc comme la force de l'interaction entre le paratope de l'anticorps (partie Fab) et l'épitope de sa cible. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques

sont caractérisés par une forte affinité pour leur cible. Le calcul de la constante Kd est le rapport entre le k_{on} (constante association) et le k_{off} (constante de dissociation). Cette constante Kd correspond à la concentration de ligand nécessaire à l'équilibre pour occuper 50% des récepteurs (Kd = $\frac{koff}{kon}$). L'affinité globale de l'anticorps est inversement proportionnelle à ce Kd donc on observe une amélioration de l'affinité lorsque le Kd diminue, lui-même dépendant d'une augmentation du k_{on} ou d'une diminution du k_{off}. Dans le cas d'une affinité améliorée, une concentration plus faible en ligand, ici l'anticorps, est suffisante pour occuper 50% des récepteurs. En plus de l'affinité, l'avidité est un terme couramment utilisé en lien avec cette affinité. En effet, l'avidité d'un anticorps correspond aux forces cumulatives de liaisons (covalentes et non covalentes) de cet anticorps pour sa cible. Comme nous l'avons vu plus haut, les anticorps (en dehors des IgM et IgA) sont divalents. Cela rend compte de la fixation plus ou moins durable dans le temps de l'anticorps sur sa cible (Rudnick and Adams 2009).

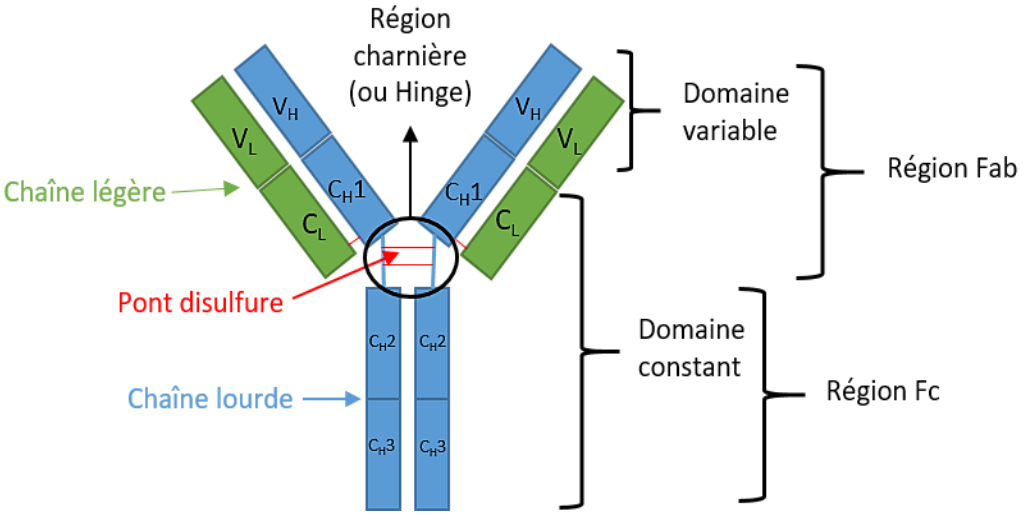


Figure 1: Structure d'une Immunoglobuline G de type 1.

1.1.2. Différents formats

Les anticorps peuvent être classés en cinq isotypes structurellement différents. On peut classer les anticorps sous les formats monomères (IgG, IgE et IgD), dimère (IgA) ou pentamère (IgM). Les IgG, IgD et IgA ont une structure commune (**Fig. 1**). Les IgG et IgD sont tous les deux des monomères (contrairement à l'IgA qui est sous forme de dimère) et se différencient principalement par la séquence d'acides aminés différente des parties constantes de leurs chaînes lourdes (respectivement gamma et delta). Les IgE et les IgM ont une quatrième partie constante sur le fragment Fc (CH4). Au sein des Immunoglobulines G, on distingue quatre sous-classes IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Ces sous-classes se différencient par la séquence d'acides aminés du hinge (distance entre partie Fab et Fc variable) et le nombre de ponts disulfures (deux pour IgG1 et IgG4, quatre pour IgG2 et quinze pour IgG3). Le

pentamère d'IgM combine cinq anticorps IgM reliés entre eux par des ponts disulfures et une chaîne J (en noir sur la **Fig. 2**) qui permet la polymérisation du pentamère. Le dimère d'IgA est assemblé par la chaîne J, un polypeptide riche en cystéines, et d'une pièce sécrétoire permettant la transcytose des IgA à travers les cellules épithéliales et dans les sécrétions (en jaune sur la **Fig. 2**).

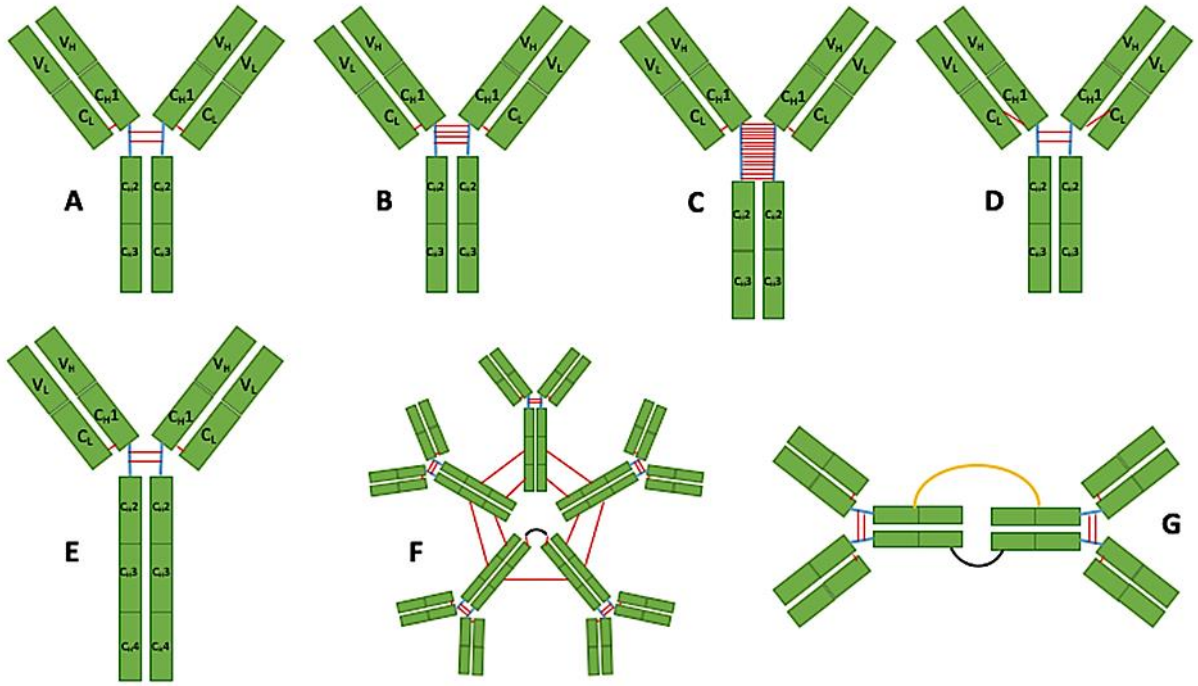


Figure 2: Isotype IgG, monomère IgGA et IgD (A) ; Sous-classe IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C), IgG4 (D) ; Isotype monomère IgE et monomère IgM (E) ; Pentamère IgM (F) ; Dimère IgA sécrétrice (G). Les ponts disulfures sont matérialisés en rouge, la chaîne J en noire et la pièce sécrétoire en jaune.

L'accroissement de la connaissance de la structure des anticorps et de leur mécanisme d'actions ont permis d'envisager des utilisations thérapeutiques. L'utilisation chez l'homme des premiers anticorps thérapeutiques l'a été avec des anticorps issus de la souris. Ces anticorps sont dits murins (suffixe -MOMAB). Cependant, cela entraine une reconnaissance par l'organisme comme une protéine du non soi et un rejet de la thérapie après une ou plusieurs injections. Des modifications de la structure des anticorps pour les rendre plus « humain » ont donc eu lieu dans le but de conférer des propriétés moins immunogènes aux anticorps thérapeutiques. Pour cela, des anticorps chimériques avec des domaines humains ont été utilisés. Les parties constantes sont humaines et seuls les domaines variables (VL et VH) ont été maintenus murins pour donner un anticorps chimérique moins immunogène que l'anticorps entièrement murin (suffixe -XIMAB) (Morrison et al. 1984). Pour réduire encore cette immunogénicité, une partie des domaines variables ont été mis au format humain et les CDR des parties variables demeurent d'origine murine. L'anticorps est à 90% humain et est appelé anticorps humanisé (suffixe -ZUMAB) (P. T. Jones et al. 1986). Enfin, pour réduire au maximum cette

immunogénicité, le dernier type d'anticorps est un anticorps entièrement humain (suffixe -MUMAB). Ces quatre formats d'anticorps sont donc différents de par leur ratio domaines d'origine murin vs humain. Ce ratio permet de les classer du plus immunogène (anticorps 100% murin) au moins immunogène (anticorps 100% humain) (**Fig. 3**).

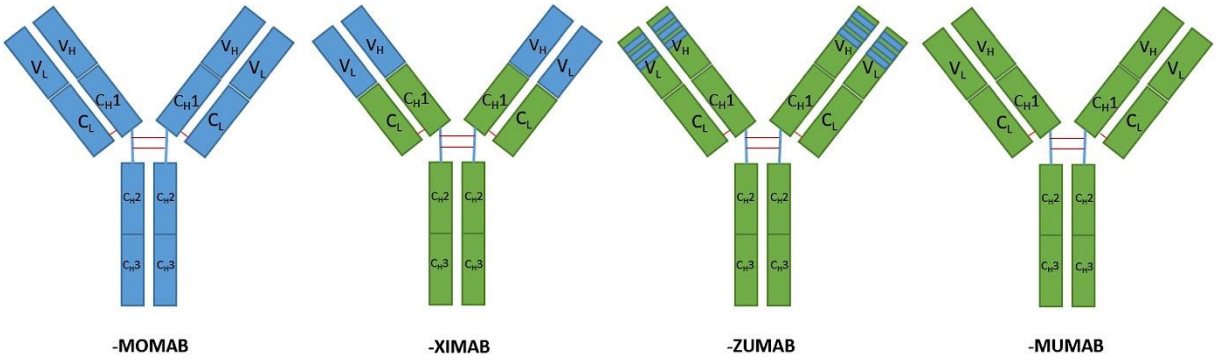


Figure 3: Anticorps murin, chimérique, humanisé et humain au format IgG1. Les zones bleues sont murines et celles vertes sont humaines.

La majorité des anticorps monoclonaux utilisés en clinique sont de sous-classe IgG1 classique qui permet le recrutement du système immunitaire par la partie Fc. D'autres sous-classes d'IgG ont été commercialisées et utilisées en clinique chez le patient. Les sous-classes IgG2 et IgG4 ont une séquence d'acides aminés du hinge différente de celle de l'IgG1. Cela leur confère une activité nulle concernant le recrutement du système immunitaire (Vidarsson, Dekkers, and Rispens 2014; Deveuve et al. 2019; Bindon et al. 1988). Cependant, si l'activité thérapeutique est uniquement dépendante du fragment Fab, cela permet de réduire de la toxicité potentielle inutile due au système immunitaire. La sous-classe IgG2 est en ce sens utilisée en clinique avec le Panitumumab (VECTIBIX®) qui est un anti-EGFR utilisé dans le cancer colorectal ou encore le Dénosumab (PROLIA®) qui est un anti-RANK-L utilisé dans l'ostéoporose (López-Gómez, Merino, and Casado 2012; Pang, Low, and Chin 2020). La sous-classe IgG4 est aussi retrouvée en clinique avec le Pembrolizumab (KEYTRUDA®), un anti-PD1 utilisé dans le mélanome (Scapin et al. 2015) ou le Natalizumab (TYSABRI®), utilisé dans la sclérose en plaque avec une fixation contre la sous-unité alpha 4 beta 1 (α4β1) de l'intégrine humaine (molécules d'adhésions) (Khoy et al. 2020).

Des formats réduits sont aussi utilisés en clinique. L'Idarucizumab (PRAXBIND®) est un Fab humanisé jouant un rôle d'antidote sur sa cible. En effet, ce Fab se fixe sur une molécule chimique, le Dabigatran (PRADAXA® anticoagulant oral direct), et bloque son effet anticoagulant. L'affinité de l'Idarucizumab pour le Dabigatran est très forte (300 fois plus que l'affinité du Dabigatran pour sa cible la thrombine) et permet donc de bloquer l'effet antithrombotique de cette molécule (Pollack et al. 2017). Une autre molécule Fab associée à un polyéthylèneglycol (PEG), le Certolizumab pegol

(CIMZIA®) est dirigé contre le Tumor Necrosis Factor (TNFα) et est utilisé dans la maladie de Crohn (Goel and Stephens 2010). L'ajout du PEG permet de rallonger le temps de demi-vie de la protéine. On retrouve également des formats scFv utilisés en clinique. Le Blinatumomab (BLINCYTO®) est un scFv bispécifique murin anti CD3/CD19 utilisé dans la leucémie aigue lymphoblastique (LAL). Le Brolucizumab (BEOVU®), lui, est un scFv humanisé anti VEGF A utilisé dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) (Kantarjian et al. 2017; Dugel et al. 2020). Enfin, des nanobody, composés d'un seul domaine variable d'anticorps, sont également utilisés. Le Caplacizumab (CABLIVI®), un nanobody bivalent humanisé composé de deux éléments constitutifs humanisés identiques reliés par un peptide de liaison à trois alanines, est utilisé dans les purpuras thrombotiques thrombo-cytopéniques comme inhibiteur du facteur de Willebrand (Scully et al. 2019).

1.1.3. Voies d'administration

La voie d'administration préférentielle est la voie intra- veineuse (IV). Par cette voie, le phénomène d'absorption est évité car le médicament est directement injecté dans la circulation systémique. Néanmoins, cette voie demeure invasive et contraignante pour le patient. C'est pour cela que d'autres voies sont étudiées et pour certaines approuvées. Ces voies alternatives sont développées dans une revue dont je suis co premier auteur parue en 2021 dans le journal *Pharmacology and Therapeutics* (**Annexe**) (Al Ojaimi et al. 2022) :

"Therapeutic antibodies – natural and pathological barriers and strategies to overcome them". *Pharmacology and Therapeutics*. 2021. JPT-108022 ; No of Pages 23.

Yara Al Ojaimi, Timothée Blin, Juliette Lamamy, **Matthieu Gracia**, […], Thomas Sécher.

Tout d'abord, des études de bioéquivalence ont permis de mettre sur le marché des anticorps injectés par voie intra-musculaire (IM) et/ou sous-cutanée (SC). Ces anticorps sont injectés dans un compartiment dit de « dépôt ». Ils récupèrent une phase d'absorption. Cette phase correspond au temps que met l'anticorps pour quitter son compartiment de dépôt et se retrouver dans le sang. Le Rituximab (MabThera®), anticorps dirigé contre le CD20 des cellules B est utilisé dans certains cancers comme le Lymphome Non Hodgkinien. Il a été approuvé en injection sous-cutanée en association avec une hyaluronidase humaine recombinante (Davies et al. 2017). Cette hyaluronidase a pour rôle d'augmenter la perméabilité du tissu conjonctif par dégradation de l'acide hyaluronique par hydrolyse locale. Cette dégradation locale permet de réduire les résistances à l'écoulement des fluides injectés, d'améliorer la biodistribution et d'injecter des volumes plus importants (Frost 2007; Locke, Maneval, and LaBarre 2019). Le Trastuzumab, anticorps anti-cancéreux dirigé contre le récepteur HER2

surexprimé dans certains cancers (sein, estomac), a obtenu la même autorisation sous format sous-cutané en association avec l'enzyme hyaluronidase. Une nouvelle association mise sur le marché permet de combiner deux anticorps anti-HER2 (Trastuzumab + Pertuzumab) et la hyaluronidase (Gao et al. 2021). De nombreux anticorps anti TNFα (Infliximab, Adalimumab …) ont été commercialisés pour des injections en sous cutané sans hyaluronidase dans les traitements de la polyarthrite rhumatoïde ou la rectocolite hémorragique (Westhovens et al. 2021; Peyrin-Biroulet et al. 2021). Certains anticorps ont vu leur indication principale modifiée. C'est le cas du Bevacizumab (AVASTIN®), un anti Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) utilisé par voie IV pour lutter contre la néo-vascularisation subnormale de certains cancers (colorectal, sein, poumon). Son injection intra-vitréale a permis la prise en charge de la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA) (Plyukhova et al. 2020). Cette injection localisée permet de contenir l'action de l'anticorps en local. Le Ranibizumab (LUCENTIS®) est un fragment d'anticorps monoclonal obtenu à partir de l'anticorps murin parent du Bevacizumab. Il est injecté en intra-vitréal pour la prise en charge de la DMLA. Ils sont autorisés par la FDA mais en recommandation temporaire d'utilisation (RTU) en France. Dans d'autres pathologies, on administre des anticorps en sous-cutanée comme l'Omalizumab (XOLAIR®) et Mepolizumab (NUCALA®) dirigés contre les IgE et l'IL15 dans l'asthme allergique (entre autres) (Chapman et al. 2019). Le Palivizumab (SYNAGIS®) est injecté en intra-musculaire dans la prévention des infections respiratoires basses via une action sur l'épitope du site antigénique A de la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial (VRS) (Frogel 2010). Les industries pharmaceutiques mettent beaucoup de moyens en œuvre pour développer ces anticorps à administrer par voies alternatives. Ces voies d'administration SC et IM sont moins invasives, sont moins couteuses au système de santé car l'hospitalisation du patient n'est pas nécessaire et l'administration facilitée permet au patient d'avoir un meilleur cadre de vie. Cependant, ces voies nécessitent une forte compliance du patient pour que l'efficacité soit garantie car l'administration s'effectue à domicile, par une infirmière diplômée d'état (IDE) et toutes les 2 ou 4 semaines généralement. La qualité de vie du patient est donc favorisée par ces voies moins invasives et ne nécessitant pas d'hospitalisation mais des limites apparaissent comme l'impossibilité d'administrer de grands volumes, l'augmentation du risque immunogène (plus de cellules potentiellement en contact avec l'anticorps qu'avec une voie IV) et de la variabilité pharmacocinétique.

Ensuite, des voies alternatives sont utilisées comme celles intra péritonéale (IP) ou intrathécale (principalement pour des pathologies d'origine neurologique). Les anticorps utilisés dans ces voies peuvent être couplés à des radionucléides émetteurs de rayonnements beta (trajet moyen et forte énergie) ou même alpha (trajet très court et énergie extrêmement forte). Dans la prise en charge de sarcomes impliquant le péritoine comme les tumeurs desmoplastiques à petites cellules rondes (DSRCT), l'expression tumorale d'une glycoprotéine (B7H3) permet l'utilisation thérapeutique d'un

anticorps murin anti-B7H3 couplé à l'iode 131 (émetteur beta). Cet anticorps est testé en phase 1 en injection intra péritonéale (Modak et al. 2020). On retrouve aussi des anticorps entiers comme le Trastuzumab dirigé contre HER2 ou des fragments d'anticorps comme le MX35 F(ab')$_2$ dirigé contre une glycoprotéine de surface et qui sont couplés à des émetteurs alpha comme le plomb 212 ou l'astate 211. Ils sont respectivement utilisés en essai clinique dans des métastases péritonéales HER2 positives ou des cancers ovariens épithéliaux en injection intra péritonéale (Meredith et al. 2018 ; Hallqvist et al. 2019). On retrouve également des anticorps injectés en intrathécal. Pour une récupération optimale de lésions à la moelle épinière, Kucher et son équipe ont injecté chez des patients atteints de traumatismes de type paraplégie des anticorps anti-Nogo-A (ATI355) qui neutralisent des facteurs d'inhibition de la croissance des neurites du système nerveux central (Kucher et al. 2018). Le Rituximab (MabThera®), anticorps anti-CD20, a été testé en injection intrathécale chez un patient atteint de méningite hypertrophique à IgG4. Les résultats, un mois post injection, sont encourageants avec une réduction de l'œdème cérébral et une récupération partielle de la vision (Della-Torre et al. 2018). Enfin, Bergman et son équipe ont injecté également le Rituximab en intrathécal chez des patients de 18 à 65 ans (23 participants) atteints de sclérose en plaques progressive (étude phase 1b multicentrique et prospective). Après 3 ans de suivi, ils n'ont pas conclu à une amélioration significative de la pathologie chez leurs patients (Bergman et al. 2018; 2021).

De plus, les anticorps ont un intérêt réduit à être administrés par voie orale. Cela est dû à leur forte dégradation par les sucs digestifs ou les protéases, à leur haut poids moléculaire et à leur forte hydrophilie qui les empêchent de passer les membranes. Il en découle un faible passage systémique. Cependant, des études ont mis en avant un intérêt clinique dans des pathologies du tractus digestif (Tashima 2021). L'administration orale d'IgA pourrait permettre de prévenir des infections bactériennes entériques comme *campylobacter jejuni*, *escherichia coli* ou *salmonella typhi* (A. F. Richards et al. 2020; A. Richards, Baranova, and Mantis 2022). Dans des maladies inflammatoires de l'intestin comme la colite ulcéreuse ou la maladie de Crohn, des anticorps Muromomab-CD3 (OKT3) nu chez les patients ou anti-TNFα (V565) encapsulé chez des singes ont été administrés par voie orale avec des résultats relativement modestes (Boden et al. 2022 ; Crowe et al. 2018).

Enfin, une dernière voie à l'étude en pré clinique est l'inhalation (voie pulmonaire). Cette voie implique une phase d'absorption au sein des alvéoles pulmonaires qui peut rencontrer des obstacles comme le mucus et les cellules épithéliales des parois alvéolaires. L'utilisation simultanée de traitements mucolytiques pourraient favoriser l'absorption des anticorps par cette voie (Sanders et al. 2000; Suk et al. 2011; Macierzanka et al. 2014; Vukosavljevic et al. 2017) tout comme l'encapsulation avec des polymères (Ensign, Cone, and Hanes 2012).

1.2. Nouvelles immunothérapies

1.2.1. Anticorps Conjugué à une drogue cytotoxique (ADC)

Les anticorps couplés à des drogues cytotoxiques (ADC pour « Antibody Drug Conjugate ») ont permis une avancée notable en clinique chez des patients en impasse thérapeutique. L'ado-Trastuzumab Emtansine (KADCYLA®) est un exemple de réussite thérapeutique dans la prise en charge du cancer du sein HER+. Il est composé d'un anticorps dirigé contre les récepteurs HER2 (Trastuzumab®) et d'une drogue cytotoxique qui inhibe l'assemblage des tubulines en microtubules (Emtansine). Le linker qui permet de relier l'anticorps à la drogue cytotoxique peut être clivable ou non clivable (**Fig. 4**). Ce linker joue un rôle dans la stabilité de l'ADC dans la circulation ainsi que dans le relargage de la drogue dans le tissu cible (Su et al. 2021). Les linker non clivables libèrent la drogue une fois que l'anticorps entier est dégradé par exemple à la fin de la voie lysosomale. Les linker clivables, quant à eux, ont été développés pour être clivés par des enzymes (cathepsine G, phosphatases, sulfatases, GSH …) (Bargh et al. 2020) ou par l'action du pH acide (hydrazone linker). L'utilisation de cette drogue cytotoxique n'est pas possible seule car beaucoup trop nocive sur tous les tissus (IC50 de l'ordre du nM pour la MMAE par exemple (Koga et al. 2015)). L'intérêt ici est de coupler cette drogue à haut potentiel cytotoxique à un anticorps afin que ce dernier joue le rôle de « tête chercheuse » sur les cellules tumorales à éliminer qui sur expriment HER2. La toxicité de l'Emtansine devrait être cantonnée aux tissus tumoraux ou aux tissus sur exprimant la cible (Verma et al. 2012) (**Fig. 4**). De nombreux autres ADC sont sur le marché (9 actuellement en Europe et 11 aux USA) comme l'Inotuzumab ozogamicin (BESPONSA®) anti CD 22 dans les leucémies aigues lymphoblastique, l'Enfortumab vedotin (PADCEV®) anti Nectin-4 dans les cancers urothéliaux, le Trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) anti HER2 dans le cancer du sein HER2+ ou encore le Sacituzumab govitecan (TRODELVY®) anti TROP2 dans le cancer du sein triple négatif (Drago, Modi, and Chandarlapaty 2021).

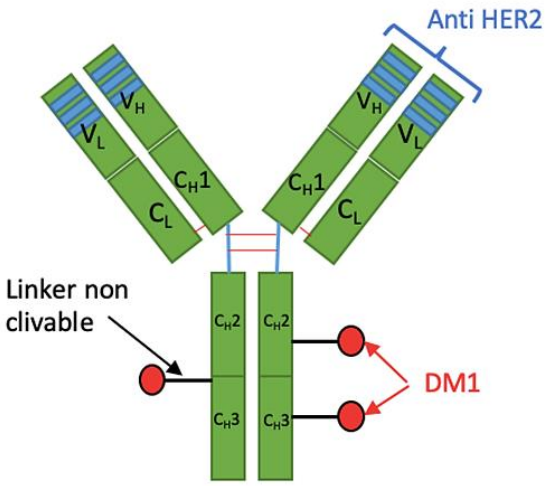


Figure 4: Représentation du Trastuzumab Emtansine (KADCYLA®) avec un DAR de 3 en moyenne.

1.2.2. Anticorps bispécifique classique et ceux engageant les cellules T (BiTE)

Le format d'IgG dit classique a subi des modifications pour améliorer son efficacité. Les anticorps bispécifiques permettent de lier deux cibles tumorales différentes. Cela est rendu possible par ingénierie moléculaire avec une association de deux Fab dirigés contre deux entités différentes. C'est le cas avec l'Emicizumab (HEMLIBRA®), un anticorps IgG4 humanisé qui cible deux facteurs de la coagulation IXa et X manquant chez les patients atteints d'hémophilie A (Oldenburg et al. 2019). Ces anticorps bispécifiques peuvent aussi cibler un récepteur tumoral et un récepteur des lymphocytes T (souvent le CD3, une sous-unité du complexe du TCR ou récepteur cellules T) (S. Zhou 2021). Cela permet d'engager une réponse immunitaire ciblée et importante, c'est ce que l'on appelle des engageurs de cellules T (T cell engager ou TCE ou BiTE). Ces cellules T activées à proximité des tumeurs libèrent des cytokines inflammatoires et cytotoxiques qui peuvent entrainer une lyse cellulaire tumorale (Lindner et al. 2020). Le Blinatumomab (BLINCYTO®) est un exemple de ces BiTE (combinaison de deux scFv) avec un bras ciblant le CD3 et l'autre le CD19 exprimé par les cellules B à l'origine de leucémie lymphoblastique (Kantarjian et al. 2017) (**Fig. 5**). D'autres hémopathies malignes comme la leucémie aiguë myéloïde ou le myélome multiple ont dévoilées des cibles mises à profit pour des BiTE avec respectivement le CD33 exprimé sur les blastes myéloïdes malins (anticorps AMG 673) et l'antigène de maturation des cellules B ou BCMA (anticorps AMG 420). Ces deux cibles sont testées en phase 1 avec des résultats encourageants sous le format de deux scFvs en tandem ciblant le CD33 ou le BCMA sur un scFv et le CD3 sur l'autre (Topp et al. 2020). L'AMG 673 détient en plus une portion Fc pour rallonger le temps de demi-vie du BiTE (Subklewe et al. 2019).

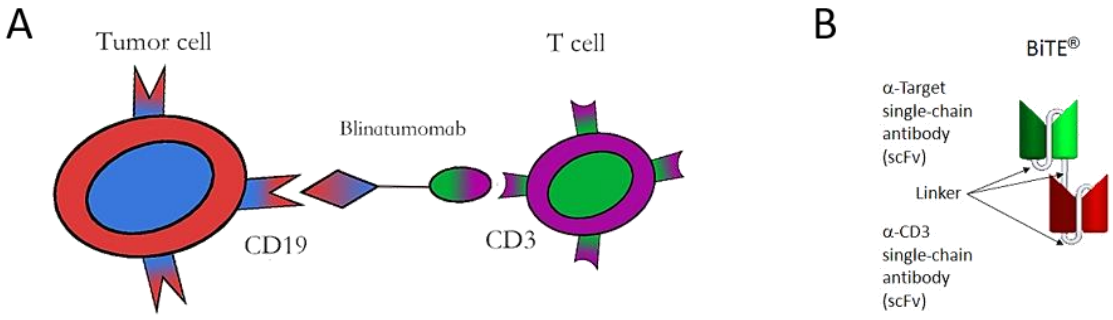


Figure 5: Pont du Blinatumomab entre la cellule tumorale (CD19) et la cellule T (CD3) (A) ; Structure BiTE (B).

Dans le cas des tumeurs solides, certains BiTE sont également en études cliniques (après validation en pré clinique) comme l'anticorps AMG 596 (scFv en tandem) ciblant le variant III de l'EGFR (EGFRvIII) et le CD3 dans le traitement du glioblastome multiforme (Sternjak et al. 2021; Rosenthal et al. 2019).

L'antigène de membrane spécifique de la prostate (PSMA) est également une cible utilisée dans le traitement du cancer de la prostate résistant à la castration par des BiTE. En effet, le Pasotuxizumab a été testé chez plus de 45 patients (30 en injection SC et 16 en injection IV) avec des résultats encourageants surtout au niveau du taux de PSA (Hummel et al. 2021).

1.2.3. Lymphocytes T modifiés avec un récepteur antigénique chimérique (CAR-T)

Les derniers formats mis sur le marché sont les « CAR-T cells ». Ce sont des lymphocytes T (CD8+) couplés à un récepteur antigénique chimérique (CAR-T). La capacité de fixation d'un anticorps sur sa cible via sa partie variable du Fab (scFv) a été intégrée sur un lymphocyte T de patient afin que ce dernier cible un antigène tumoral. Cette partie d'anticorps, et plus particulièrement le scFv, est enchâssée dans la membrane et est exprimée à la surface du lymphocyte T. Cet ajout membranaire va permettre d'activer les fonctions effectrices du lymphocyte T (cytokines pro inflammatoires et cytotoxiques) à proximité des cellules cancéreuses. Le CAR est constitué d'un domaine de signalisation intra-cellulaire, d'un domaine transmembranaire, d'une région charnière et d'un fragment d'anticorps extra cellulaire (scFv par exemple). Cette construction a donc pour but de cibler les cellules tumorales à l'aide d'une construction immunitaire optimisée et spécifique (Lindner et al. 2020; Springuel et al. 2019) (**Fig. 6**).

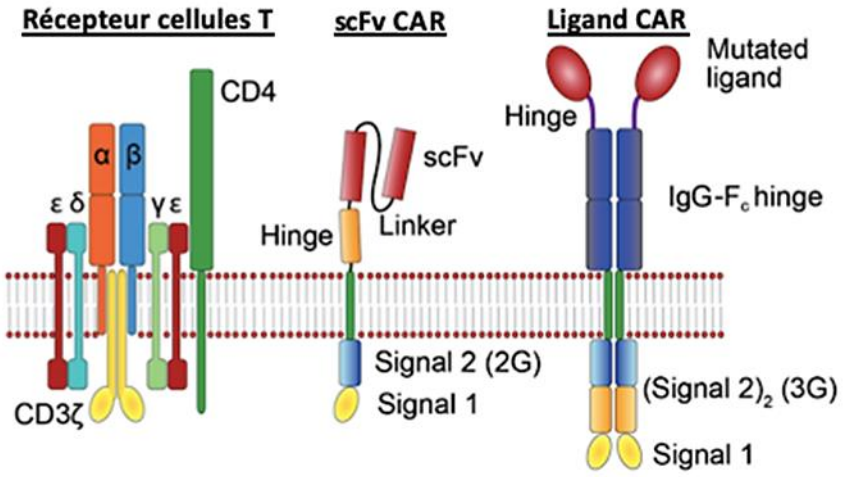


Figure 6: Récepteur des cellules T à gauche ciblé par les TCE. Au milieu un scFv (CAR) chargé sur un lymphocyte T. Sur la droite, un autre type de CAR avec une structure Fc + ligand.
Figure modifiée de Lindner et al.

1.2.4. Radioimmunothérapie (RIT)

Cette thérapie, mise en place depuis de nombreuses années maintenant, consiste à coupler un agent de vectorisation comme l'anticorps monoclonal, qui peut reconnaitre un antigène exprimé par des tissus tumoraux, à un radionucléide. L'anticorps permet de cibler l'effet cytotoxique des

radiations du radionucléide au niveau tumoral. Cette forme de radiothérapie interne vectorisée (RIV) est utilisée dans les hémopathies malignes. C'est le cas dans le lymphome non hodgkinien à cellules B CD20 positif avec l'anticorps murin Ibritumomab anti CD20 couplé à l'yttrium-90 (ZEVALIN®) à l'aide du linker isothiocyanatobenzyl et du chélateur DTPA (acide diéthylène triamine penta acétique) (**Fig. 7**) (Kitson et al. 2013). Le linker et le chélateur correspondent ensemble au Tiuxétan. L'yttrium est un émetteur beta quasi pur, d'énergie élevée et de période courte, très intéressant en clinique. Cet ibritumomab tiuxétan est le seul anticorps sur le marché actuellement en tant que radioimmunothérapie (BEXXAR® retiré du marché quelques années seulement après sa commercialisation) (Goldsmith 2010). On retrouve aussi le lutécium 177, un émetteur beta, couplé au DTPA et à un anticorps chimérique anti CD105 (TRC105) qui joue un rôle dans l'angiogenèse de nombreux cancers (ici cellules murines de cancer du sein 4T1). De fortes doses de cette RIT ^{177}Lu-DTPA-TRC105 permettent une augmentation de la survie de plus de 2,5 fois en comparaison avec le ^{177}Lu ou TRC105 seuls (Ehlerding et al. 2018). Ce même ^{177}Lu a été couplé à des anticorps anti PSMA entiers (antigène membrane spécifique prostate) dans le traitement des cancers de la prostate (tagawa et al PSMA Lu177 phase 1/2). Une autorisation d'accès précoce a été obtenue en France (dérogation acceptée par l'autorité HAS) pour l'association d'un ligand (tag urée) anti PSMA couplé au ^{177}Lu dans le traitement de cancer de la prostate progressif, métastatique, résistant à la castration et surexprimant l'antigène membranaire spécifique de la prostate (PLUVICTO®).

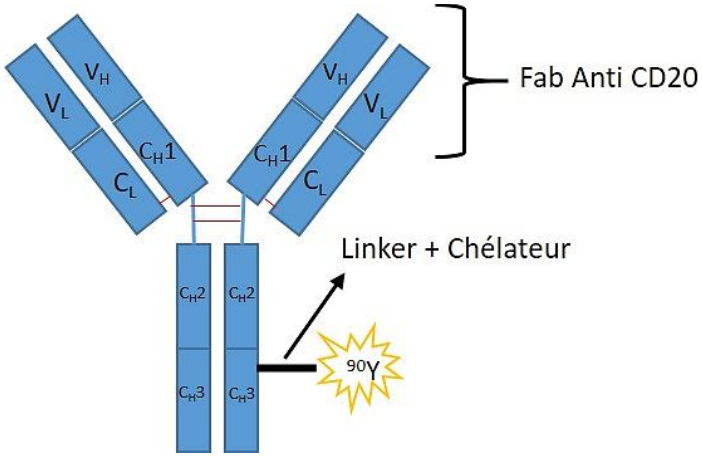


Figure 7 : Ibritumomab tiuxétan (ZEVALIN®) constitué d'un anticorps murin anti CD20, d'un linker isothiocyanatobenzyl, d'un chélateur DTPA et d'un radionucléide l'Yttrium 70.

D'autres anticorps sont actuellement en essai clinique couplés à des radionucléides émetteurs alpha. La particule alpha semble très prometteuse car elle détient un très faible trajet limitant les lésions des cellules saines voisines mais une très forte libération d'énergie. Le transfert linéique d'énergie (TLE) de cette particule est très élevé car il se réfère à la quantité d'énergie libérée sur unité

de distance. On retrouve l'astatine 211 et l'actinium 225. Li et son équipe ont couplé l'astatine 211 avec le Trastuzumab (ciblant HER2 surexprimé dans de nombreux cancers épithéliaux) ou un anticorps anti frizzled homologue 10 protéine (FZD10) (surexprimée dans certains sarcomes). Le ^{211}At-Trastuzumab a été testé sur des souris greffées avec une lignée de cancer gastrique humaine NCI-N87 (cancers gastriques HER2+ chez l'Homme) avec une très nette amélioration de la survie en comparaison avec le Trastuzumab ou l'^{211}At seuls (H. K. Li et al. 2017). Le ^{211}At-OTSA101 (anticorps anti FZD10) a été testé sur des souris greffées avec une lignée de sarcome humain SYO-1 avec une disparition tumorale quasi immédiate en comparaison avec l'anticorps anti FZD10 seul ou couplé à l'Yttrium 90 (H. K. Li et al. 2018).

Enfin, des émetteurs d'électron auger (AE) comme l'indium 111 ont été couplé avec des anticorps anti EGFR comme le Nimotuzumab à l'aide de DTPA. Ils ont utilisé cette RIT sur des souris greffées avec des lignées de cancer du sein humain MDA-MB-468 et TrR1. Le ralentissement de la pousse tumorale est plus significatif avec le Nimotuzumab couplé à l'indium 111 en comparaison avec le Nimotuzumab seul ou l'indium 111 couplé au Trastuzumab (Chan et al. 2020).

Un autre concept en deux temps de la RIT est aujourd'hui en développement. Il s'agit du concept de pré-ciblage. Dans un premier temps, un anticorps non radiomarqué est injecté chez le patient en vue d'une fixation sur une cible précise anti-tumorale. Dans un second temps, une fois l'anticorps non marqué fixé sur sa cible, une partie complémentaire radiomarquée de l'anticorps est injectée. Cette dernière reconnaît et se fixe spécifiquement sur l'anticorps non marqué au niveau tumoral. Le reste de la partie complémentaire non fixée sur l'anticorps non marqué est rapidement éliminée (temps de demi-vie court) permettant de réduire la fixation non spécifique et d'éventuelles toxicités. Cette technique permet d'augmenter le ratio tumeur/sang et de mieux appréhender l'imagerie isotopique (Goldenberg 2006 ; Kraeber-Bodéré 2015 ; Miot-Noirault 2019).

1.3. Mécanismes d'action

Les anticorps monoclonaux ont des mécanismes d'action différents. En effet, ils peuvent se fixer à l'antigène et/ou récepteur à l'aide de leur paratope (partie Fab). Ils permettent un blocage de la cascade de phosphorylation qui peut entrainer des effets tels que la prolifération incontrôlée des cellules ou leur survie face à la mort programmée. C'est ce que l'on appelle les « effets neutralisants » médiés par le Fab. Ils peuvent également recruter les cellules immunitaires, le système du complément ou éliminer les complexes immuns via l'action de leur fragment Fc. C'est ce que l'on appelle les « effets cytolytiques » médiés par le Fc. Ces derniers sont très souvent couplés à la fixation du Fab sur une cible spécifique. Les autorités de santé du médicament du monde entier (FDA, EMA) ne cessent d'approuver des anticorps depuis les années 1990 avec une accélération depuis 5 ans (**Fig. 8**).

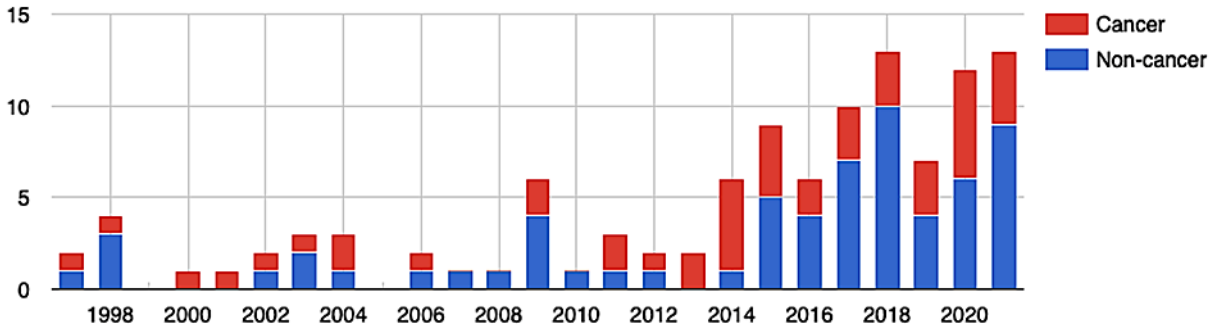


Figure 8: Nombre d'anticorps thérapeutiques approuvés par l'Union Européenne ou les États-Unis depuis 1997 selon leurs indications cliniques (d'après Antibodysociety.org).

1.3.1. Action par fixation du Fab

L'accrochage de l'anticorps à sa cible dépend de plusieurs paramètres. L'accessibilité à la cible doit être aisée et l'affinité/avidité de l'anticorps pour sa cible conditionne une interaction forte et durable.

Il est possible de mesurer cette affinité pour les anticorps thérapeutiques. On trouve un Kd de l'ordre du nano molaire (10^{-9}) pour le Cetuximab (ERBITUX®) et du subnano molaire (10^{-10}) pour le Panitumumab (VECTIBIX®) (Sickmier et al. 2016) qui ciblent tous les deux l'EGFR (Human Epidermal Growth Factor Receptor 1 ou HER1). On trouve également un Kd de l'ordre du subnano molaire (10^{-10}) pour le Trastuzumab (HERCEPTIN®) (Slaga et al. 2018) qui cible le récepteur HER2. Les cibles peuvent être des antigènes solubles (VEGF, TNFα) ou bien des récepteurs transmembranaires (EGFR, HER2). Ces antigènes ou récepteurs ont des rôles primordiaux dans le développement de certains cancers par activation de voies de signalisations (réduction apoptose, survie cellulaire, prolifération cellulaire ou vasculaire) ou par inhibition du système immunitaire (check point inhibiteurs).

1.3.1.1. Fixation du Fab sur un récepteur transmembranaire

Dans la famille des récepteurs transmembranaires HER, nous trouvons EGFR (ou HER1) qui peut être surexprimé dans des cancers tels que le poumon ou le colon. Le Cetuximab ou le Panitumumab ciblent l'EGFR et empêchent la fixation de l'antigène EGF sur l'EGFR par compétition sur le site de fixation (You and Chen 2012). Il existe également HER2, second membre de cette famille des récepteurs HER. Le gène codant la protéine HER2 peut être surexprimé dans certains types de cancer du sein. Ces cancers sont définis comme HER2+. On peut également retrouver des mutations ponctuelles (valine en glutamine en position 664 région transmembranaire) ou des délétions (amine terminale tronquée de la partie extracellulaire) de ce même récepteur favorisant sa dimérisation et une activation constitutive des voies tyrosines kinases de cette oncoprotéine (Bargmann and Weinberg

1988). Ces cellules tumorales peuvent donc plus facilement croître et proliférer de façon anarchique. Les cancers du sein HER2+ sont très agressifs. Le Trastuzumab cible le domaine IV extracellulaire du récepteur HER2 tandis que le Pertuzumab cible le domaine II important dans la dimérisation du récepteur (Fuentes et al. 2011). Dans les deux cas, ces anticorps permettent d'inhiber la prolifération et l'activité pro-tumorale qui découlent de l'activation de HER2 (von Minckwitz et al. 2017). Dans cette famille des HER, deux autres récepteurs ont été un peu moins étudiés, ce sont les récepteurs HER3 et HER4 qui sont également essentiels dans le processus oncogénique (Gaborit, Lindzen, and Yarden 2016). Il est important de noter que cette famille de récepteurs peut également former des hétérodimères ayant des propriétés d'activation des voies intra cellulaire similaires (EGFR/HER3 ou HER2/HER3).

Dans les hémopathies malignes, certains récepteurs spécifiques des cellules cancéreuses comme le CD20 ou CD30 sont ciblés par des anticorps comme le Rituximab (IgG1k, MabThera®) ou l'Obinutuzumab (GAZYVARO®) (Coiffier 2007). Ces récepteurs sont aussi présents sur les lymphocytes B sains qui seront détruits au même titre que les cellules cancéreuses. Cependant, les cellules souches précurseurs des lymphocytes B sont dénuées de ce récepteur et maintiennent donc la production de lymphocytes B. Dans le myélome multiple, les cellules tumorales peuvent exprimer le CD38 et l'anticorps Daratumumab (IgG1k, DARZALEX®) cible ce récepteur (Palumbo et al. 2016). Dans les leucémies, les récepteurs CD3, CD22, CD19 ou CD33 peuvent être exprimés et des anticorps comme le Blinatumomab (BLINCYTO®) (Kantarjian et al. 2017) ou le Gemtuzumab ozogamicin (MYLOTARG®) peuvent les cibler (Baron and Wang 2018).

D'autres anticorps ont été conçu pour inhiber des mécanismes d'échappement mis à profit par les cellules cancéreuses pour résister aux traitements. Ces mécanismes d'échappement sont les points de contrôles immunitaires (checkpoint immunitaire) tels que Programmed cell Death protein 1 (PD-1), son ligand (PDL-1) ou encore le Cytotoxique Lymphocyte T Antigène 4 (CTLA-4). Le récepteur PD-1 est retrouvé sur les lymphocytes T et son ligand PDL-1 est retrouvé sur les cellules tumorales. L'association du récepteur lymphocytaire (PD-1) et de son ligand tumoral (PDL-1) entraîne un signal négatif sur les lymphocytes T. L'action anti-tumorale des lymphocytes T est inhibée. Les anticorps anti PDL-1 comme l'Atezolizumab (TECENTRIQ®), le Durvalumab (IMFINZI®) ou l'Avelumab (BAVENCIO®) et les anticorps anti PD-1 comme le Nivolumab (OPDIVO®) ou le Pembrolizumab (KEYTRUDA®) ont été développés afin d'empêcher cette association et de permettre aux cellules T de retrouver leur activité anti-tumorale (Guilleminault et al. 2015; Okazaki et al. 2013). Le récepteur CTLA-4 est aussi retrouvé à la surface des lymphocytes T et a pour rôle de limiter l'activation du système immunitaire. Des anticorps anti CTLA-4, comme l'Ipilimumab (YERVOY®) ont été développés afin de réactiver la prolifération des cellules T anti-tumorales (Snyder et al. 2014) (**Fig. 9**).

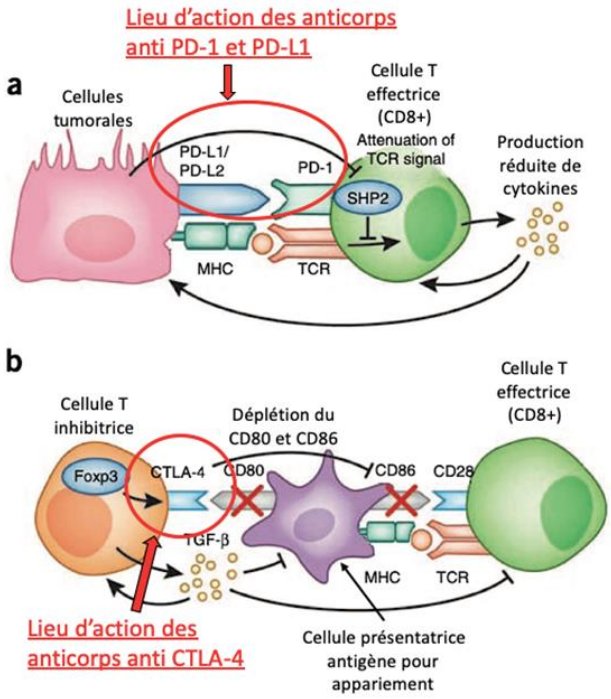


Figure 9: Schéma modifié de la publication de Okazaki et al. Mécanisme d'action des anticorps anti PD-1 et anti PDL-1 (A) et des anticorps anti CTLA-4 (B).

1.3.1.2. Fixation du Fab sur un facteur soluble

Dans le cas du VEGF, sa fixation sur ses récepteurs (VEGFR1 ou 2) induit une activation des cellules endothéliales, une augmentation de la perméabilité vasculaire et, in fine, une angiogenèse accélérée péri-tumorale. L'augmentation de la vascularisation permet un apport massif de nutriments et d'oxygène aux cellules tumorales dans le but d'accélérer leur croissance. Le Bevacizumab (AVASTIN®) est un anti VEGF qui empêche la fixation du VEGF sur ses récepteurs (VEGFR-1 ou 2). On obtient donc une réduction de la néo vascularisation dans le but d'inhiber la croissance tumorale par manque d'apports nutritifs et d'oxygène (Garcia et al. 2020).

Les anticorps sont capables de neutraliser d'autres facteurs solubles responsables de l'inflammation et surexprimés dans certaines pathologies chroniques (Maladie de Crohn, Rectocolite hémorragique, polyarthrite rhumatoïde ou spondylarthrite ankylosante). Le chef de file de ces facteurs est le Tumor Necrosis Factor (TNFα). Cette molécule est indispensable à la défense immunitaire en étant un signal inflammatoire naturellement présent et actif. Dans les pathologies d'hyper inflammation, le TNFα est synthétisé en quantité supérieure à la normale et devient néfaste en entrainant une altération des tissus. L'Adalimumab (HUMIRA®), l'Infliximab (REMICADE® ou REMSIMA®), le Certolizumab pegol (CIMZIA®) et le Golimumab (SIMPONI®) ciblent cette molécule soluble afin de diminuer son impact pro inflammatoire (Goel and Stephens 2010; Peyrin-Biroulet et al. 2021; Levin, Wildenberg, and van den Brink 2016). D'autres cibles comme les cytokines peuvent avoir un intérêt clinique. Les interleukines (IL) ou leurs récepteurs font partis de ces cytokines et sont

indispensables à la régulation du système immunitaire. L'excès de ces cytokines peut entrainer une hyper inflammation. Dans certaines pathologies inflammatoires chroniques, il est donc nécessaire de réguler ces cytokines pour restreindre le processus inflammatoire. Des anticorps tels que le Tocilizumab (ROACTEMRA®), le Canakinumab (ILARIS®), le Secukinumab (COSENTYX®) ou l'Ustekinumab (STELARA®) ciblent les interleukines IL-6, IL-1beta, IL-17a ou r, IL-12 et IL-23 ou leurs récepteurs pour limiter leurs effets pro-inflammatoires (Tanaka, Narazaki, and Kishimoto 2018; Ridker et al. 2017; Ly et al. 2019; Sands et al. 2019). Le Risankizumab (Skyrizi®), un anticorps IgG1 qui cible la sous unité p19 de l'interleukine 23, est utilisé dans le psoriaris comme le Tildrakizumab (TROGARZO®) ou le Guselkumab (TREMFYA®) (Ruggiero et al. 2022). Le Risankizumab a été très récemment autorisé en dernière ligne de traitement de la rectocolite hémorragique (Ferrante et al. 2022). Dans la même ligne directrice, un inhibiteur d'intégrine tel que le Vedolizumab (ENTYVIO®) dirigé contre l'alpha4beta7 permet de limiter l'inflammation surtout au niveau intestinal (Maladie de Crohn ou rectocolite hémorragique) (Feagan et al. 2013).

Le Fab des anticorps est également mis à profit pour fixer l'anticorps sur d'autres cibles. Des pathologies telles que les problèmes de coagulation, l'ostéoporose, l'hypercholestérolémie ou encore le purpura (liste non exhaustive) ont aujourd'hui des anticorps dans leur éventail thérapeutique. Dans l'hémophilie A, un déficit constitutif en facteur VIII de la coagulation engendre une coagulation altérée et des risques accrus d'hémorragies. L'Emicizumab (HEMLIBRA®) est un anticorps bispécifique de sous-classe IgG4 capable de remplacer le facteur VIII manquant en liant les facteur IX activé (IXa) et X. Chaque bras de l'anticorps (Fab) est spécifique d'un des deux facteurs (IX activé et X) et assure la liaison entre ces deux facteurs. Ce rôle permet le maintien de la cascade de coagulation et permet de garder la fonction d'hémostase (Oldenburg et al. 2019). En prévention des thrombus dans l'angioplastie, le Fab de l'Abciximab (REOPRO®) a été modulé pour cibler les récepteurs à la glycoprotéine IIb et IIIa (GPIIb et IIIa) localisés à la surface des plaquettes humaines. L'Abciximab limite donc l'agrégation plaquettaire en bloquant la liaison du fibrinogène aux plaquettes activées, mais cette spécialité a été retiré du marché dans certains pays (Thiele et al. 2012) par manque de significativité de la balance bénéfice/risques. Dans les purpuras thrombopéniques, le facteur de Willebrand s'agrège aux plaquettes. Un Nanobody bivalent humanisé, le Caplacizumab (CABLIVI®), cible un domaine du facteur de Willebrand et empêche son interaction avec les plaquettes (Scully et al. 2019). La Proprotéine Convertase Subtilisine/Kexine de type 9 (PCSK9) est une proprotéine qui se fixe aux récepteurs du LDL cholestérol. L'association PCSK9/récepteur peut avoir lieu dans le foie, les entérocytes ou les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins. L'internalisation du couple entraine la dégradation des récepteurs et réduit le rôle d'épurateur sanguin du cholestérol joué par ces récepteurs. Cela se traduit par une hypercholestérolémie ou une dyslipidémie mixte par augmentation du taux de cholestérol et des triglycérides dans le sang. Les anticorps Alirocumab (PRALUENT®) et Evolocumab (REPATHA®)

fixent le PCSK9 afin de garder un taux important de LDL récepteurs favorisant la destruction du LDL cholestérol dans le sang (McDonagh et al. 2016). Enfin, la résorption osseuse est favorisée par l'association RANK/RANK-L. Le récepteur RANK est localisé à la surface des ostéoclastes et son association avec son ligand accroît l'activité ostéoclastique entrainant une résorption osseuse massive. Le Dénosumab (PROLIA®), anticorps de sous-classe IgG2, cible RANK-L afin d'inhiber l'association RANK/RANK-L. Il permet de diminuer la résorption osseuse présente dans l'ostéoporose ou la perte osseuse liée à certains cancers (Pang, Low, and Chin 2020).

Les anticorps monoclonaux peuvent également se fixer sur des cibles virales comme récemment le SARS-COV-2 (protéine Spike) avec le Casirivimab + Imdevimab (RONAPREVE®) ou le virus EBOLA avec le mix de trois anticorps : l'Atoltivimab, le Maftivimab et le l'Odesivimab-ebgn (INMAZED®) (Weinreich et al. 2021; Markham 2021). Ils peuvent aussi fixer des cibles bactériennes comme l'endotoxine B du Clostridium Difficile avec le Bezlotoxumab (ZINPLAVA®). Les rôles principaux de ces anticorps sont doubles avec une destruction des cibles virales et ou bactérienne et également la création d'une immunité chez le patient en prévention d'une infection future (Gerding et al. 2018). Ces pistes sont encore peu étudiées mais la crise sanitaire du COVID a mis en évidence le rôle indispensable des anticorps thérapeutiques.

1.3.2. Action par fixation du Fc

Le fragment cristallisable de l'anticorps joue lui aussi des rôles indispensables à l'efficacité thérapeutique. Le Récepteur Fc gamma (FcyR) se retrouve sous plusieurs isoformes (FcyRI, FcyRII et FcyRIII) et est retrouvé à la surface de cellules immunitaires. On retrouve par exemple le FcyRIIIA à la surface des cellules Natural Killer (NK), les récepteurs FcyRIIA et FcyRIIB à la surface des cellules dendritiques, des monocytes, des macrophages, des neutrophiles ou des éosinophiles (Nimmerjahn and Ravetch 2006). Le Fc des anticorps a la capacité de se fixer sur ces FcyR. Cette fixation est dépendante de l'isotype de l'anticorps, du fragment Fc de l'anticorps (muté ou sauvage) et du récepteur Fc gamma. La liaison Fc- FcyR entraîne le recrutement des cellules immunitaires. L'intérêt est donc de cibler la cellule tumorale avec le Fab et d'activer les cellules immunitaires localement avec la partie Fc. Le recrutement et l'activation des macrophages et des monocytes peut induire une phagocytose de la cellule et sa destruction. Ce recrutement joue aussi un rôle dans la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires ou dans l'explosion oxydative dans des infections parasitaires ou virales (sécrétion de dérivés réactifs de l'oxygène toxiques comme l'ion superoxyde $0_{2^{\cdot -}}$ ou le peroxyde d'hydrogène H_2O_2) (Mansourou et al. 2022). Le recrutement des cellules NK peut induire une lyse cellulaire par sécrétion de perforines et granzymes. Ces enzymes protéolytiques vont pénétrer dans les cellules tumorales à proximité et vont les dégrader de l'intérieur (Pardo et al. 2002). Ces mêmes

cellules NK sont cytokines dépendantes et productrices de cytokines. En effet, elles sont activées en présence d'un afflux de cytokines médiatrices de l'inflammation comme les interleukines (IL) et en sécrètent à leur tour en réponse à ces signaux d'inflammation. Enfin, le recrutement des polynucléaires neutrophile/éosinophile entraîne un relargage de substances dites vasoactives, chimioattractives ou cytotoxiques. On définit cet ensemble de mécanismes de recrutement comme la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) ou la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP) (Graziano and Engelhardt 2019; DiLillo and Ravetch 2015) (**Fig. 10**).

Le Fc peut également jouer un dernier rôle qui est le recrutement du système du complément (voie classique à différencier avec la voie alterne du complément). Ce recrutement consiste à fixer les anticorps sur leurs cibles par leur Fab et agglomérer via le Fc les premiers facteurs du complément (C1q, C1r et C1s). S'en suit une activation physiologique du complément qui va cliver successivement les facteurs C4, C2 et C3 et, in fine, entrainer la polymérisation du facteur C9 fixé aux autres facteurs C5b, C6, C7 et C8. Cette polymérisation a lieu au niveau de la membrane cellulaire de la cible et forme un pore enchâssé dans cette membrane. Ce pore est appelé complexe d'attaque membranaire (MAC) et induit une entrée massive d'eau et d'ions dans la cellule conduisant à sa destruction par explosion (mécanisme de défense impliqué dans l'immunité innée pour lutter contre des infections à bactéries Gram négatives notamment). C'est ce que l'on appelle la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) (Golay and Taylor 2020; Wang et al. 2016) (**Fig. 10**).

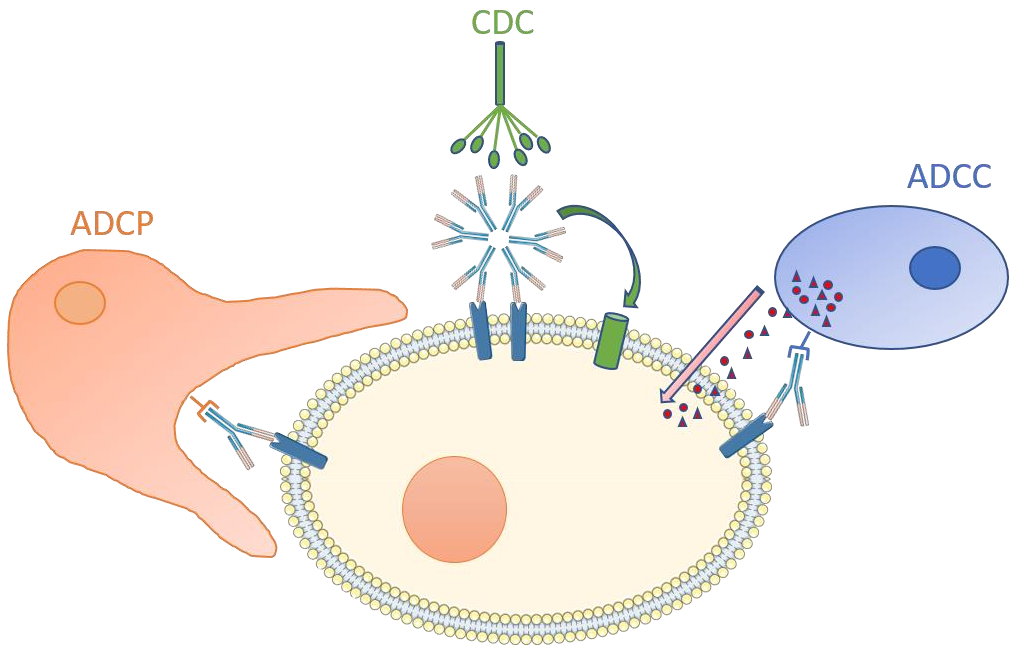


Figure 10: Cytotoxicité médiée par le Fc par ADCP (phagocytose via macrophage), CDC via IgG1 en héxamère (système du complément) et ADCC (Natural Killer par enzymes protéolytiques).

1.4. Toxicité des immunothérapies

1.4.1. Liée à la cible dit « on target »

Les immunothérapies ont la capacité de se fixer sur un panel extrêmement large de facteurs solubles ou de récepteurs membranaires. Dans le cas des tumeurs solides, la très grande majorité des récepteurs ciblés par les anticorps thérapeutiques sont aussi présents à l'état basal sur certaines cellules saines. Cela entraine fréquemment des toxicités d'organes. On peut retrouver le récepteur à l'EGF (EGFR ou HER1) sur les kératinocytes de la peau (Tran et al. 2012), sur les cellules du tractus gastro-intestinal ou encore au niveau du système respiratoire et des tissus féminins ('The Human Protein Atlas'). On retrouve chez 80% des patients qui ont reçu un traitement par Cetuximab (ERBITUX®) des toxicités cutanées. Dans environ 15% des cas les cliniciens observent une acné sévère de grade 3-4 ou des rashs cutanés (EMA, n.d.; HAS 2015; Lacouture et al. 2018). Malheureusement, dans environ 2% des cas, les patients doivent stopper leur traitement par excès d'effets indésirables cutanés (HAS 2005). Les toxicités digestives sont également présentes mais souvent plus tolérables et plus facilement prises en charge par les cliniciens. Ces toxicités sont définies par l'EMA comme des évènements indésirables très fréquents (plus de 10% des patients en souffrent) tout comme les affections du système respiratoire. Le Panitumumab (VECTIBIX®) engendre des toxicités similaires puisque chez plus de 90% des patients, des réactions cutanées allant jusqu'à des grades 3-4 sont observées (EMA; HAS 2014). On retrouve chez plus de 10% des patients sous Panitumumab des toxicités digestives et respiratoires.

Concernant HER2, récepteur transmembranaire de la même famille qu'EGFR, il est retrouvé au niveau des tissus féminins (ovaire, sein), au niveau de la peau, du système respiratoire ou des cellules du muscle cardiaque ('The Human Protein Atlas'). On peut retrouver fréquemment dans la littérature de la toxicité cardiaque car le rôle de HER2 dans le développement cardiaque (muscle, valves) est avéré (Bird and Swain 2008). Plus de 10% des patients sous Trastuzumab (HERCEPTIN®) présentent une dysfonction cardiaque réversible à l'arrêt du traitement. Cette toxicité cardiaque semble être accrue par l'association fréquente de cet anticorps avec les anthracyclines. Ces dernières sont elles-mêmes cardiotoxiques et l'activité cardiaque est surveillée chez les patients prenant ce traitement. En effet, ces anthracyclines seraient à l'origine d'une surexpression du ligand paracrine Neuréguline-1 (NRG1) de HER2 amenant un accroissement du stress cellulaire (Raschi et al. 2010; Zambelli et al. 2011). La présence d'effets indésirables respiratoires est aussi retrouvée chez 10% des patients. Le Pertuzumab (PERJETA®) détient aussi des effets indésirables cardiaques et pulmonaires (EMA). Néanmoins, il faut toujours tenir compte du fait que ces thérapies sont associées à d'autres traitements comme les chimiothérapies qui induisent eux aussi des toxicités importantes.

Les ADC engendrent également de la toxicité liée à la cible. En effet, la fixation de l'anticorps sur sa cible localisée sur du tissu sain entraine un relargage de la drogue cytotoxique à proximité de ce tissu sain. Cela peut engendrer des effets indésirables localisés sur des tissus non tumoraux (Baah, Laws, and Rahman 2021; Drago, Modi, and Chandarlapaty 2021). On retrouve des toxicités cutanées et des dysgueusies chez les patients traités par Enfortumab vedotin (PADCEV®) du fait de la présence de la protéine Nectin-4 au niveau de la peau et des glandes salivaires (Rosenberg et al. 2019; The Human Protein Atlas - Nectin4 2022). Il a été très récemment rapporté une toxicité pulmonaire du Trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) surement due à la présence de récepteurs HER2 dans le système respiratoire (Modi et al. 2020; The Human Protein Atlas - ERBB2 2022).

Les anticorps bispécifiques (CD3- BsAb) ciblant, via un bras, le CD3 pour le recrutement du système immunitaire et, via l'autre bras, une cible antigénique surexprimée au niveau tumoral, montrent également de la toxicité dans le cas où la cible antigénique est aussi exprimée sur les tissus sains (Middelburg et al. 2021). Sur des modèles précliniques, cela a été clairement décrit pour des CD3-BsAb ciblant l'EGFR (Lutterbuese et al. 2010).

Enfin, les nouvelles immunothérapies CAR-T ont également montré que des toxicités dues à la fixation du récepteur antigénique sur des cibles pouvant être exprimées par le tissu sain peuvent émerger. Sur un modèle préclinique de souris exprimant HER2, des CAR-T ciblant HER2 pouvaient entrainer des effets indésirables notables (Castellarin et al. 2020).

1.4.2.Indépendant de la cible dit « off target »

Certaines toxicités sont à dissocier de la présence de la cible de l'anticorps sur des cellules et du tissu sain. En effet, les anticorps injectés sont à l'origine d'une réaction immunitaire variable selon leur format (murin, chimérique, humanisé ou humain). La reconnaissance par le corps humain d'un anticorps thérapeutique peut engendrer une production d'IgE humains anti anticorps thérapeutique. Le rejet de l'anticorps thérapeutique par neutralisation via ces IgE accélère la résistance au traitement et l'échec thérapeutique. Cela a été remarqué après traitement par Cetuximab (ERBITUX®) dès la 1ière injection. Ce cas particulier, qu'est le Cetuximab, met en avant la reconnaissance par les IgE d'un oligosaccharide, le galactose alpha-1,3 galactose, retrouvé sur la partie Fab de la chaîne lourde du Cetuximab (Chung 2008).

De plus, l'injection de ces anticorps thérapeutique peut entrainer la formation d'anticorps humains dirigés contre ces protéines thérapeutiques (anti-drug antibodies ou ADA). Ils forment des complexes immuns avec les anticorps thérapeutiques. Ces derniers ne peuvent plus jouer leur rôle thérapeutique. Ces complexes sont rapidement éliminés par le système réticuloendothélial ce qui réduit considérablement le temps de demi-vie de l'anticorps thérapeutique et donc son activité intrinsèque (Chirmule, Jawa, and Meibohm 2012). L'immunogénicité du complexe immun est accrue

et le recrutement du système immunitaire induit une forte dégradation du complexe (phagocytose, cascade du complément …) (Krishna and Nadler 2016). L'impact de ces ADA a été étudié dans de nombreuses pathologies traitées par immunothérapies comme la polyarthrite rhumatoïde (Moots et al. 2017).

On remarque également une augmentation du risque d'infections opportunistes après traitement par certains anticorps monoclonaux. En effet, certains anticorps cibles des facteurs solubles indispensables à la lutte contre les infections bactériennes ou virales. Le TNF-α joue un rôle prépondérant dans la lutte contre l'infection à *Mycobactérium Tuberculosis* grâce à la formation d'un granulome inflammatoire isolant la bactérie. L'inhibition du TNF-α par un anticorps comme l'Infliximab amène à la réduction de ce granulome et favorise la dissémination de la bactérie entrainant des décès chez les patients atteints de tuberculose latente ou active (Keane et al. 2001). On a également remarqué un risque viral accru (herpès, réactivation hépatite B) chez des patients traités par anti TNF-α (Davis et al. 2020). Ces infections opportunistes ont un risque de survenu également augmenté avec des traitements dirigés contre les lymphocytes B (LB) comme le Rituximab. En effet, la neutralisation, bien que transitoire, des LB permet à des pathogènes latents de se réactiver ou à des pathogènes opportunistes de coloniser plus aisément leur site d'infection (Lanini et al. 2013).

On a également remarqué que certains ADC formés de liens clivables pouvaient avoir un relargage précoce de la drogue cytotoxique (clivage systémique). La cible n'étant pas atteinte, la drogue cytotoxique va agir au niveau systémique ou sur des tissus non tumoraux et engendrer des effets indésirables (Donaghy 2016). On retrouve de nombreux effets indésirables inhérents aux drogues cytotoxiques utilisées dans certains ADC (Masters et al. 2018). Ces effets indésirables ont été considérablement réduits avec l'optimisation de la spécificité de ces liens clivables et l'utilisation de liens non clivables.

Enfin, les BiTE et les CAR-T ont montré une bonne spécificité et efficacité tumorale. Cependant, ces molécules peuvent également engager les LT de façon inexpliquée et massive entrainant un syndrome de relargage des cytokines (Shimabukuro-Vornhagen et al. 2018) et une réponse inflammatoire systémique incontrôlée. Les LT vont donc recruter le système immunitaire sur tous les tissus (sains ou tumoraux) et engendrer le relargage de nombreuses cytokines et facteurs pro inflammatoires (IL-6, IFN- ou TNF-α) (S. Zhou 2021). Cela peut conduire à des défaillances multi viscérales chez les patients pouvant amener jusqu'au décès.

1.5. Suivi de la distribution des anticorps monoclonaux

1.5.1. Immunohistochimie (IHC)

L'étude de la distribution des anticorps peut s'effectuer directement sur les organes et/ou tissus. Les études *in vivo* permettent l'obtention, après sacrifice des animaux, des constituants souhaités tels que les tissus tumoraux ou les organes sains. Les gestes à effectuer sont très invasifs. C'est pourquoi ils sont cantonnés à des études pré cliniques. Les constituants récupérés sont traités par Immunohistochimie. On révèle la présence ou l'absence des anticorps thérapeutique et de leurs cibles. Des coupes transversales des organes et/ou tumeurs permettent de voir également la diffusion intracellulaire des anticorps au sein même des tissus et pas seulement leur localisation membranaire sur leur récepteur (J. Lee et al. 2018). Il est également possible d'utiliser des lysats cellulaires afin d'identifier la présence ou non d'anticorps ou de fragments d'anticorps par chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse.

1.5.2. Imagerie isotopique

L'examen d'imagerie isotopique dans le diagnostic anti cancéreux est non invasif et longitudinal. Il repose sur l'administration de molécules radioactives seules ou couplées à des vecteurs afin d'effectuer une exploration fonctionnelle.

1.5.2.1. Scintigraphie

La scintigraphie (SPECT) a été mise au point à l'aide de radionucléides comme l'iode 123 pour la thyroïde ou le technétium 99 métastable (couplé HMDP) pour les os (de Koster et al. 2021; Hong et al. 2012) dans un contexte diagnostic. Les anticorps ont tiré profit d'une association à l'iode 123 afin d'effectuer des scintigraphies iodogènes (Dietlein et al. 2005). Cependant, l'association de l'iode avec l'anticorps s'est heurtée au phénomène de dehalogénation qui induit une clairance de l'iode radioactif suite au catabolisme de l'anticorps et donc une perte de signal. Plus récemment, d'autres radioisotopes comme l'Indium 111 sont couplés aux anticorps et le complexe peut être suivi par scintigraphie afin de connaître sa biodistribution. En effet, des anticorps anti PD-L1 ou anti EGFR (ABT-806) sont couplés à l'Indium 111 et la distribution des anticorps est suivie par tomographie par émission monophotonique couplée à un scanner (SPECT-CT) (Josefsson et al. 2016; Gan et al. 2021). Cependant, cet examen tend à diminuer au profit de la tomographie par émission de positons (TEP) plus sensible (Alavi et al 2008) même si, pour certains, la SPECT aura toujours un intérêt indétrônable en routine clinique de diagnostic (investigations physiopathologiques par exemple) (Mariani et al 2008).

1.5.2.2. Tomographie par Émission Positons (TEP)

L'étude de la biodistribution des anticorps est possible par imagerie médicale fonctionnelle. La tomographie par émission de positons, développée plus récemment que la scintigraphie, est basée sur la radioactivité beta plus d'élément tel que le Zirconium 89 (La, Tran, and Kim 2019). Cet élément possède un temps de demi-vie assez long (78,4 heures) qui s'adapte au temps de demi-vie assez long des anticorps. Le positon émis par la désintégration beta plus peut rentrer en contact avec un électron avoisinant issu du nuage électronique induisant un phénomène d'annihilation. Ce dernier entraîne une libération de deux photons d'intensité 511 keV à l'opposé l'un de l'autre (180°) qui seront détectés par la couronne de détection de l'appareil TEP. Ce phénomène d'annihilation à lieu à proximité de l'élément radioactif. L'idée est donc de coupler de façon covalente cet élément radioactif à un anticorps. L'anticorps va aller se fixer sur sa cible et l'élément radioactif associé va émettre son rayonnement. On localisera donc précisément l'élément radioactif et donc le couple anticorps-élément radioactif. C'est une étude non invasive, qui peut être longitudinale et qui est transposable entre l'étude préclinique et clinique. On obtient une vue d'ensemble de la distribution de l'anticorps dans le corps entier à chaque temps d'analyse en plus de la possibilité d'observer l'activité métabolique d'un organe en trois dimension sur différentes cibles (Jauw et al. 2019). L'avantage le plus important du TEP par rapport au SPECT est la sensibilité accrue (Alavi et al 2008). De plus, cette étude permet la quantification de la distribution d'anticorps au niveau des tissus par analyse d'images TEP-TDM. Parmi les nombreuses études, on peut observer la biodistribution d'anticorps anti CD33 (Linotuzumab) ou anti récepteur A2 du carcinome hépatique producteur d'érythropoïétine (EphA2) couplés au Zirconium 89 (Allen et al. 2022; Jacobson et al. 2017).

1.5.3. Dosage plasmatique

Le suivi des concentrations plasmatiques des anticorps est effectué en routine à l'hôpital. Il s'effectue via des dosages sanguins suivis d'une détection par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse. Ce dosage permet d'étudier la distribution et l'excrétion des anticorps post injection. L'absorption n'étant que très peu présente (la plupart des anticorps sont injectés par voie IV), les deux phénomènes cités précédemment sont ceux qui impactent la pharmacocinétique des anticorps (devenir des anticorps dans l'organisme). On peut donc quantifier sur différents temps la proportion d'anticorps présent par rapport à la quantité initiale injectée pour évaluer la biodistribution ou en déduire le temps qu'il faut au corps pour épurer le sang de la molécule (temps de demi-vie) pour évaluer l'excrétion (Schokker et al. 2020; Truffot et al. 2021). Ces dosages peuvent également être couplés à des outils informatiques tels que la modélisation pharmacocinétique qui permet de compiler de nombreuses données au sujet d'une même molécule au sein d'un modèle mathématique propre à

la molécule chez les patients. Il est ensuite possible d'utiliser ce modèle chez un nouveau patient pour prédire l'évolution des paramètres pharmacocinétiques de la molécule en fonction des résultats d'un ou plusieurs dosages de cette molécule chez ce nouveau patient. Ces outils sont mis en place pour le suivi des anticorps thérapeutiques (toxicité, adaptation de doses …).

2. Voies d'optimisations des anticorps monoclonaux

2.1. Fragment antigen binding ou Fab

L'optimisation majoritaire de la partie Fab d'un anticorps s'articule sur la bispécificité. L'anticorps peut, in fine, fixer plusieurs cibles à la fois pour augmenter leur spécificité. Le Catumaxomab (REMOVAB®) est le 1er anticorps bispécifique à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché par la FDA et l'EMA en 2009. Il cible l'antigène CD3 des lymphocytes T et la molécule d'adhésion cellulaire épithéliale (EpCAM) surexprimée dans la plupart des carcinomes. Il a été retiré du marché pour son indication première pour des raisons commerciales (EMA 2017). Certaines études cliniques essaient de le réintroduire pour d'autres indications (carcinome péritoneal avec ascite dans le cas de cancer gastriques) (Knödler et al. 2018). L'Emicizumab (HEMLIBRA®) est un exemple très concret de ces anticorps bispécifiques qui a été décrit plus haut dans le manuscrit (Oldenburg et al. 2019). D'autres anticorps sont optimisés pour une utilisation anti cancéreuse comme l'Amivamtamab (RYBREVANT®). C'est un anticorps de sous-classe IgG1 qui cible à la fois EGFR et cMET. Il a obtenu une autorisation de mise sur le marché aux USA (par la FDA) et a reçu un avis positif en Europe par l'EMA en 2021 pour le traitement du cancer pulmonaire non à petits cellules avec insertions dans l'exon 20 de l'EGFR (Nagasaka et al. 2022; Kaplon et al. 2022). On retrouve également des anticorps bispécifiques dans les hémopathies malignes comme la leucémie aigue lymphoblastique avec le Blinatumomab (BLINCYTO®) anti CD3/CD19. Le CD3 est exprimé à la surface des lymphocytes T tandis que le CD19 est lui exprimé à la surface des lymphocytes B et de leurs précurseurs immatures appelés blastes. Ces derniers prolifèrent, restent immatures et remplacent les cellules matures aboutissant à cette pathologie cette pathologie (Kantarjian et al. 2017). Le Mosunetuzumab (LUNSUMIO®) est un anticorps bispécifique humanisé de sous-classe IgG1 ciblant le CD3 et le CD20 qui est exprimé par les lymphocytes B dès leur stade précoce (Budde et al. 2022). Il a été accepté en 2022 par la FDA dans le traitement des lymphomes folliculaires. D'autres anticorps sont actuellement à l'étude (en phase clinique) ou en révision par les instances de sécurité du médicament pour des indications dans d'autres hémopathies malignes comme les lymphomes diffus à grande cellules. C'est le cas du Glofitamab (RG6026) qui est un anticorps bispécifique de sous-classe IgG1 bivalent pour CD20 et monovalent pour CD3 (Hutchings et al. 2021).

Il est également très intéressant de diriger le Fab d'un anticorps afin qu'il se fixe sur des cibles exclusivement tumorales. C'est en ce sens qu'ont été découvert l'EGFR variant III (EGFRvIII) issu d'un variant tronqué entre les exons 2 et 7 de l'EGFR (Chistiakov, Chekhonin, and Chekhonin 2017) ou encore le variant tronqué du récepteur HER2 : p95HER2 (Arribas et al. 2011). Ces récepteurs tronqués ne sont pas retrouvés à la surface des tissus sains mais seulement sur des tissus cancéreux. Différentes équipes ont donc développé des anticorps avec une partie Fab capable de cibler ces récepteurs. L'entreprise Amgen a développé un ADC (AMG 595) qui cible le variant III de l'EGFR avec la partie Fab de leur IgG et est chargé (DAR de 3,5) de molécules cytotoxiques emtansine (DM1) (Hamblett et al. 2015). L'intérêt thérapeutique de cette molécule serait dans les glioblastomes. Ruiz et al ont développé un anticorps bispécifique qui cible le CD3 (lymphocytes T recrutés) et le variant tronqué p95HER2. Leur anticorps est ainsi capable d'agir *in vivo* au niveau tumoral (réduction du volume tumoral) sur des souris greffées par des lignées p95HER2 positives (Rius Ruiz et al. 2018). En 2021, des équipes américaines ont mis en évidence d'autres cibles tumorales spécifiques et ont mis au point par phage display des anticorps dirigés contre ces cibles. Il s'agit du complexe formé du HLA et du peptide RAS muté (G12V ou Q61H/L/R) ou alors du complexe formé du HLA et du néo antigène issu de la protéine tumorale 53 (*TP53*) muté R175H. Ces cibles RAS et TP53 mutés sont des cibles tumorales spécifiques (Prior, Lewis, and Mattos 2012; Lo et al. 2019). Ils ont créé un format single-chain diabody (scDb) capable de fixer le CD3 pour le recrutement des cellules T et la cible : HLA-RAS muté ou HLA-p53 muté (**Fig. 11**). Leurs études *in vitro* sur lignées et *in vivo* sur tumeurs exprimant les mutations de RAS ou p53 ont mis en avant des résultats plus que satisfaisant concernant la spécificité et l'efficacité d'action de leurs scDb (Douglass et al. 2021; Hsiue et al. 2021).

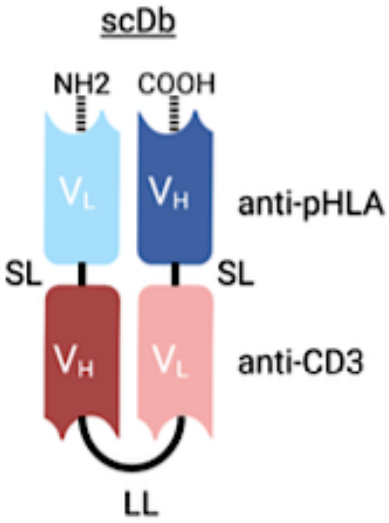


Figure 11 : Schéma diabody simple chaîne (scDb) ciblant le CD3 et le HLA-p53 muté R175H (Hsiue et al. 2021).

Enfin, la partie Fab de l'anticorps peut aussi être optimisée pour obtenir une affinité plus importante pour sa cible. Cette maturation d'affinité est basée sur une intégration de différentes séquences ou acides aminés dans les régions hypervariables ou les CDR du Fab de l'anticorps. Ces mutations peuvent être ciblées sur des résidus bien identifiés ou aléatoires pour chercher les positions préférentielles impliquées dans l'interaction anticorps-cible. Les principales liaisons impliquées dans cette interaction anticorps-cible sont non covalentes (hydrogènes, hydrophobe, électrostatiques ou Van Der Walls). L'ajout ou le remplacement de certains résidus par d'autres détenant des structures aromatiques hydrophobes (asparagine, tryptophanes, tyrosines …) permettent d'améliorer la force de liaison hydrophobe entre l'anticorps et sa cible. La technique de « shuffling » permet cette mise en place de résidus facilitant les interactions hydrophobes (Dall'Acqua et al. 2005). On peut également retrouver des mutations au niveau des régions charpentes des Fab (framework) qui permettent de modifier structurellement l'anticorps. Le repliement des boucles des 6 CDR (3 VH et 3 VL) est optimisé et favorise les liaisons covalentes entre l'anticorps et sa cible. L'anticorps, une fois fixé sur sa cible, est moins amené à se détacher. On observe une diminution de la constante cinétique de dissociation de l'anticorps pour sa cible (k_{off}).

2.2. Fragment cristallisable ou Fc

Il est possible d'optimiser également la partie constante de l'anticorps : la partie Fc. L'optimisation s'articule autour des activités de cette partie Fc que sont le recyclage de l'anticorps par le récepteur néonatal du Fc (FcRn) et le recrutement des cellules immunitaires. Cette optimisation peut être effectuée dans le but d'accroître ou de réduire la capacité de fixation de la partie Fc sur sa cible. Il faut néanmoins garder à l'esprit que ces Fc optimisés doivent être couplés à une forte spécificité pour la cible. Dans le cas contraire, le risque majeur est l'activation du système immunitaire dans un tissu sain et engendrer des effets indésirables via la réaction immunitaire (tempête cytokinique ou simple destruction cellulaire).

L'interaction entre le fragment Fc et le récepteur FcγR peut être optimisée. En effet, des études ont mis en avant l'intérêt d'une glyco-ingénierie sur les glycanes du résidu N297 du fragment Fc (CH2). Ces glycanes jouent un rôle prépondérant pour la stabilité de l'interaction Fc- FcγRIIIA et donc le bon fonctionnement de l'ADCC. Cette asparagine 297 est donc glycosylée et plusieurs oligosaccharides y sont fréquemment retrouvés comme la N-acétylglucosamine (GlcNac). Sur cette N-acétylglucosamine peut se retrouver un résidu fucose qui, de par son encombrement stérique, réduit la stabilité de l'interaction Fc- FcγRIIIA (Arnold et al. 2007). L'absence de ce fucose (anticorps dit « afucosylé ») permet donc d'augmenter le recrutement des cellules immunitaires et d'optimiser l'ADCC (Umaña et al. 1999; Shinkawa et al. 2003). Dans le traitement de la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC), l'Obinutuzumab (GAZYVARO®) (IgG1) est utilisé en association. Cet anticorps cible le CD20 des

lymphocytes B et est afucosylé dans sa partie Fc. Cette modification permet d'augmenter l'affinité de l'anticorps pour les récepteurs FcγRIII des cellules NK. On obtient donc un recrutement des cellules immunitaires optimisé et une mort cellulaire par ADCC accrue (Goede et al. 2014). Dans le traitement des lymphomes cutanés à lymphocytes T (syndrome de Sézary ou mycosis fongoïde) on retrouve le Mogamulizumab (POTELIGEO®) (IgG1) qui est un anticorps monoclonal. Cet anticorps se lie au récepteur CCR4 des chimiokines qui jouent un rôle dans le processus de migration lymphocytaire. Il est lui aussi afucosylé pour optimiser son affinité vers les FcγR (Ollila, Sahin, and Olszewski 2019). Cette afucosylation est la modification du Fc la plus répandue.

D'autres mutations simples ou combinées permettent aussi d'augmenter l'interaction entre la portion Fc et les récepteurs FcγRIIIA ou FcγRIIA. On peut retrouver des mutations comme G236A, S239D/I332E (DE) ou encore S239D/A330L/I332E (DLE) (Lazar et al. 2006). On peut même être amené à combiner ces mutations comme GAALIE ou GASDALIE pour optimiser d'autant plus l'ADCC (Ahmed et al. 2016). Dans la prise en charge des lymphomes diffus à grandes cellules B, on retrouve un anticorps monoclonal humanisé, le Tafasitamab (MONJUVI®) (approuvé par la FDA aux USA en 2020 et par l'EMA en UE en 2021). Il cible le CD19 des lymphocytes B et détient la mutation S239D/I332E (DE) dans sa portion Fc pour optimiser son ADCC et ADCP (Salles et al. 2021). Dans le cas des cancers du sein HER2 positifs, le Margetuximab (MARGENZA®) a été approuvé par la FDA en 2020. Cet anticorps chimérique IgG1 cible HER2 et détient la combinaison de mutations L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L (VLPLL) dans sa partie Fc pour optimiser son ADCC (Tarantino et al. 2021). Les interactions entre la partie Fc de l'anticorps et le FcγRIIB peuvent avoir un intérêt particulier pour les anticorps agonistes anti-cancéreux (super famille des récepteurs du facteur de nécrose tumoral comme CD40 ou 0X40) (Davis et al. 2020) qui stimulent la réponse immunitaire anti-tumorale. Des mutations telles que S267E/L328F (SE/LF) et E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R (V12) optimisent la fixation au FcγRIIB tout en réduisant la fixation au FcγRIIIA (Mimoto et al. 2013).

On recense également des mutations permettant d'augmenter l'hexamérisation des anticorps puis le recrutement du complément (C1q) et, in fine, optimiser la CDC. On peut retrouver des portions d'IgG3 dans des IgG1 (IgG1/3), ou des combinaisons de mutations comme K326W/E333S (WS), S267E/H268F/S324T/G236A/I332E (EFTAE) ou encore E345R/E430G/S440Y (RGY) (Natsume et al. 2008; Idusogie et al. 2001; Moore et al. 2010; Wang et al. 2016). Cette optimisation de CDC est moins répandue car il y a une complexité supplémentaire à prendre en considération. En effet, l'épitope de l'antigène doit être proche de la membrane cellulaire pour que l'anticorps une fois fixé via son paratope puisse recruter le complément et former le pore transmembranaire (R. Liu et al. 2020; Cragg et al. 2003).

Outre le recrutement du système immunitaire, il est possible d'optimiser le recyclage des anticorps via le FcRn. La partie Fc de l'anticorps va se fixer sur le FcRn. Une fois internalisé dans les lysosomes,

l'anticorps fixé au FcRn est redirigé à la surface des cellules pour être relargué dans la circulation et éviter l'acidification des lysosomes tardifs qui entraine la dégradation protéique. Les mutations mises en jeu permettent donc de prolonger le temps de demi-vie des anticorps concernés (Mackness et al. 2019). Ce prolongement peut être un avantage notable si on considère qu'un temps de demi-vie plus long permet à l'anticorps d'avoir plus de temps pour se fixer à sa cible. Cependant, ce temps de contact augmenté avec sa cible peut être désavantageux si cette cible est localisée aussi sur du tissu sain augmentant les toxicités (ADC, isotopes radioactifs). L'idée des mutations ici est d'augmenter la capacité de l'anticorps à rester fixer au FcRn à pH acide (6) dans les lysosomes tout en gardant la capacité de se détacher du FcRn à pH physiologique (7,4) dans le sang. On recense des mutations comme M252Y/S254T/T256E (YTE), T307A/E380A/N434A (AAA) ou M428L/N434S (LS) (Dall'Acqua, Kiener, and Wu 2006; Petkova et al. 2006; Zalevsky et al. 2010). La voie de dégradation des lysosomes est évitée et le recyclage à la membrane des anticorps est optimisé. Dans la prise en charge de l'hémoglobinurie nocturne paroxystique (HNP), le Ravulizumab (ULTOMIRIS®), un anticorps humanisé IgG2/4 a été approuvé par l'EMA et la FDA. Cet anticorps cible la protéine C5 du complément et détient les mutations M428L/N434S (LS) dans sa partie Fc. En plus de ces mutations, des histidines (Y27H/S57H) ont été ajoutées dans la partie lourde du Fab (VH). Cet acide aminé a un pKa (constante acidité de la molécule) d'environ 6,8 soit relativement proche de la neutralité. L'histidine est capable de fixer des protons. Cet acide aminé se comporte donc différemment en condition acide ou physiologique et peut favoriser la fixation à la protéine C5 en condition acide car l'histidine est protonée (Sheridan et al. 2018).

Enfin, certaines optimisations du fragment Fc ont consisté à abolir les liaisons de l'anticorps aux FcγR. Le but ici, complètement opposé à ce qui est décrit précédemment, est de réduire considérablement le recrutement du système immunitaire pour réduire la toxicité qui en découle. Cela est possible uniquement pour des anticorps qui n'ont pas besoin de ce système immunitaire pour jouer leur rôle thérapeutique. On retrouve des anticorps utilisés en clinique comme l'Atezolizumab (TECENTRIQ®) ou le Durvalumab (IMFINZI®) qui ont ce type de mutations (H. T. Lee et al. 2017). Leur action anti PDL-1 est maintenue et l'efficacité thérapeutique, qui est uniquement dépendante de ce mécanisme d'action, est conservée. Dans le même temps, la toxicité non souhaitée induite par le recrutement du système immunitaire via le Fc de l'anticorps est absente. L'Atezolizumab est aglycosylé sur sa portion Fc (mutation N297A) lui conférant une perte d'affinité pour tous les FcγR (excepté FcγRI) (Walker et al. 1989; Sazinsky et al. 2008; Jo et al. 2018). Le Durvalumab, quant à lui, détient la combinaison de mutations L234F/L235E/P331S (FES) qui réduit la liaison de l'anticorps avec les FcγR (Oganesyan et al. 2008). On retrouve dans la littérature d'autres mutations comme L234F/L235E/D265A (FEA) ou bien L234A/L235A/P329G (LALAPG) (Schlothauer et al. 2016; Engelberts et al. 2020) qui abolissent aussi la liaison Fc-FcγR.

Cette dernière mutation dite « LALAPG » a été mise en avant dans une publication en préparation de soumission dont je suis co-premier auteur (2023) dans le journal *JNM* (**Annexe**) :

"Fc-engineered monoclonal antibody to reduce off-target liver uptake".
Journal of Nuclear Medicine. 2023

Tristan Mangeat, **Matthieu Gracia**, Sophie Poty, Alexandre Pichard, Pierre Martineau, Bruno Robert and Emmanuel Deshayes.

Nous avons montré qu'un anticorps muté LALAPG dans son Fc peut avoir une réduction de la captation hépatique. L'anticorps préalablement marqué au Zirconium 89, un radionucléide émetteur beta plus, a été analysé par Tomographie par Émission de Positons (TEP). Cette réduction de captation hépatique peut être dû à l'ablation de la fixation du fragment Fc de l'anticorps aux FcγR de certaines cellules immunitaires qui transitent au niveau hépatique (NK par exemple). Ces cellules, en condition physiologique de l'anticorps, sont chargées de fixer l'anticorps pour l'amener au foie au niveau des cellules de Kupffer afin qu'il entre dans les voies de dégradation hépatiques. Cette mutation LALAPG, réduisant considérablement cette interaction Fc-FcγR, permet à l'anticorps d'être très peu retrouvé au foie. En imagerie diagnostique, cette captation hépatique peut s'avérer problématique car la forte accumulation hépatique des anticorps induit une forte émission réduisant l'intensité du reste de l'image (par contraste et par manque d'anticorps dans les zones voulues). Cette mutation pourrait permettre de diminuer fortement la captation hépatique et donc de concentrer l'anticorps sur les zones souhaitées. Cela pourrait permettre d'améliorer drastiquement l'image et le diagnostic du patient.

2.3. Masquage paratope

Une voie d'optimisation supplémentaire s'articule autour du masquage de la partie Fab d'un anticorps grâce à des structures jouant le rôle de « boucliers ». Ces structures ont l'intérêt d'être clivables à proximité du site de fixation tumoral de l'anticorps afin de révéler le Fab. Ce dernier, une fois libéré, pourra se fixer sur son site et jouer son rôle thérapeutique uniquement au niveau tumoral et non au niveau des tissus sains.

Desnoyers et son équipe ont mis au point un anticorps IgG1 anti EGFR qui détient un peptide de 50 acides aminés sur la partie N terminale de la chaîne légère Fab. Ce peptide bloque le paratope de leur anticorps (partie variable de la chaîne légère = VL). Il est accroché à l'anticorps à l'aide d'un linker qui est clivable par des enzymes (uPA, MT-SP1 et legumain) sur exprimées dans le micro environnement tumoral de différents cancers comme certains de la peau (Desnoyers et al. 2013) (**Fig. 12**).

Pai et son équipe, ont également protégé le paratope (VH + VL) de leur anticorps IgG1 dirigé contre le CTLA4. Cette protection s'articule via un domaine variable externe (VH + VL) qui cible l'antigène de cellules souches de la prostate (PSCA). Ce domaine variable externe est clivable par une enzyme du micro environnement tumoral : la protéase membranaire de type sérine 1 (MT-SP1). On a donc un ciblage en deux temps avec d'abord la protection qui « pré cible » l'anticorps au niveau de la tumeur prostatique (lignée tumorale TRAMP-C2 ici qui exprime PSCA et MT-SP1) puis, une fois que la protection est clivée, l'anticorps pourra cibler et bloquer localement le CTLA4 (Pai et al. 2018) (**Fig. 12**).

Trang et son équipe ont développé un anticorps anti CD19 protégé par un peptide super enroulé en hélice alpha. Ce peptide est fixé en N-terminal de l'anticorps via un linker de type PLG-LAG ou IPVS-LRSG qui sont des séquences substrats d'enzymes comme les métalloprotéinases matricielles (MMP-2 et MMP-9) sur exprimées dans de nombreux cancers. L'encombrement stérique de ce peptide sur la partie Fab de l'anticorps empêche sa fixation à sa cible. A proximité de tumeurs exprimant les enzymes adéquates, le lien est clivé, l'hélice est détachée et l'anticorps peut se fixer sur sa cible (Trang et al. 2019) (**Fig. 12**).

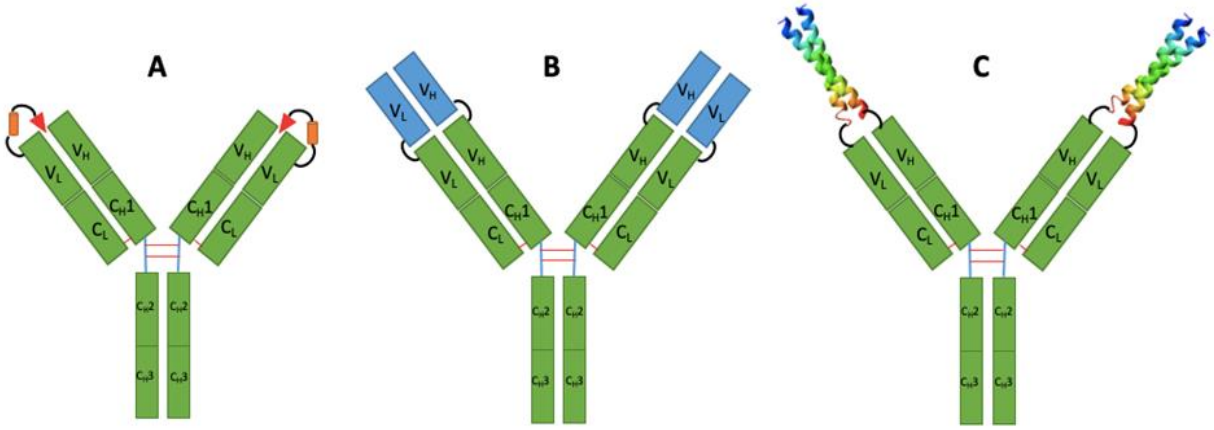


Figure 12 : Schéma explicatifs des anticorps masqués. Anticorps anti EGFR protégé par un peptide protecteur (triangle rouge) et un linker clivable (orange) (Desnoyers et al. 2013) (A) ; Anticorps anti CTLA4 (vert) avec une protection par un scFv dirigé contre le PSCA (bleu) via un linker clivable (lien noir) (Pai et al. 2018) (B) ; Anticorps anti CD19 protégé par une super hélice alpha reliée par un linker clivable (lien noir) (Trang et al. 2019) (C).

L'équipe de Zhou a développé un aptamère qui détient une partie qui reconnaît spécifiquement le récepteur à la transferrine 1 (TfR1 ou CD71). Ce biomarqueur est surexprimé dans certaines tumeurs mais aussi dans certains tissus sains et est utilisé en diagnostic. Pour réduire la fixation au tissu sain, l'aptamère détient un prolongement avec un azobenzène-PEG_{5000} relié par un lien amine réactif (NHS ester) sensible au pH du micro environnement tumoral. Ce prolongement empêche la fixation au TfR1 par encombrement stérique. En condition péri-tumorale d'hypoxie, le lien amine est réduit et le PEG_{5000} est détaché par auto-immolation. L'aptamère est libéré et peut à nouveau se fixer

sur sa cible TfR1. Cette hypoxie est due à la vascularisation tumorale hétérogène et la haute densité tumorale qui réduisent l'apport d'oxygène au niveau tumoral (F. Zhou et al. 2019).

Pour finir, l'équipe de Geiger ont mis au point un anticorps bispécifique anti-FOLR1 et anti-CD3. L'anticorps est bivalent pour l'anti-FOLR1 et détient un Fab monovalent anti-CD3 qui recrute les cellules T (FOLR1-TCB). La partie variable lourde du Fab anti-CD3 a été masquée par un scFv anti-idiotypique anti-CD3. La linker reliant le Fab anti-CD3 et le « bouclier » scFv anti-CD3 est composé de 33 acides aminés. Différents sites de clivage sont observés sur cette séquence d'acides aminés par des enzymes du micro environnement tumoral (MMP et matriptase). De plus, ils ont inséré dans la partie Fc la mutation LALAPG pour prévenir du recrutement des cellules immunitaire via l'interaction Fc-FcγR (Geiger et al. 2020) (**Fig. 13**).

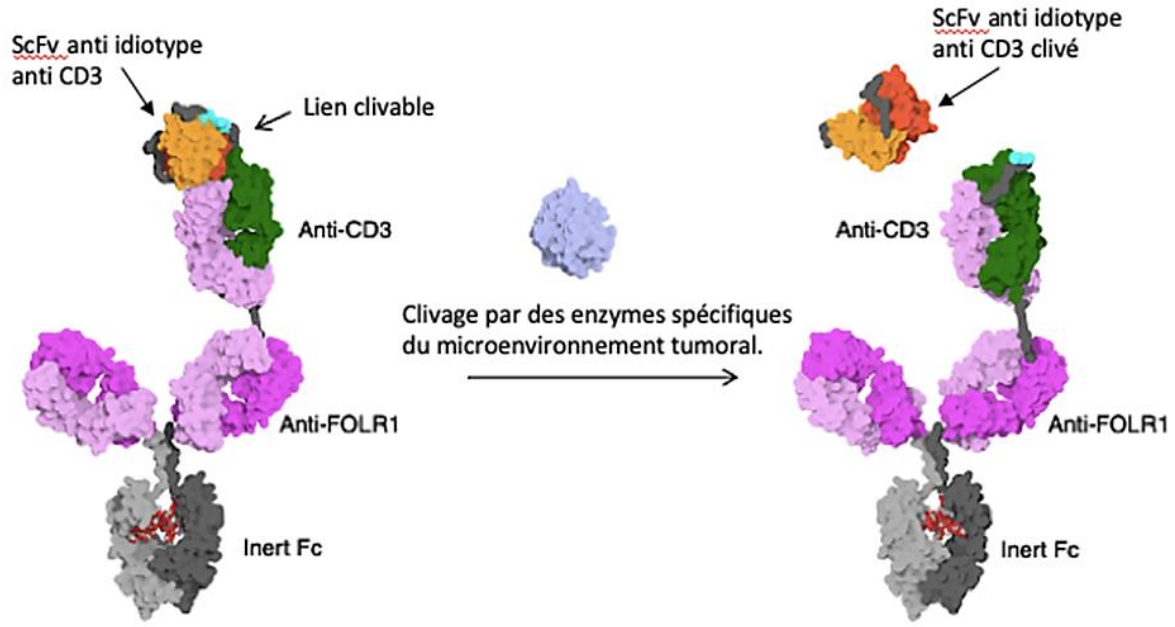


Figure 13 : Figure modifiée de l'anticorps bispécifique anti-FOLR1 avec son Fab anti-CD3 protégé par un scFv anti-CD3. L'action des enzymes permet de cliver le lien, de détacher le scFv protecteur et libérer le Fab anti-CD3 afin qu'il puisse jouer son rôle en péri-tumoral.
Le Fc inactif est obtenu grâce à la mutation LALAPG (L234A, L235A, P329G) (Geiger et al. 2020b).

2.4. pH dépendance

Le micro environnement tumoral peut être mis à profit pour modifier les anticorps. L'ingénierie des anticorps est en lien avec le fait que certaines tumeurs ont tendance à acidifier leur micro environnement via l'hypoxie expliquée précédemment. Le manque d'oxygène (hypoxie) engendre une glycolyse anaérobie du glucose dans la cellule tumorale. Après être entré dans la cellule via des transporteurs GLUT (GLUT1 et 3 principalement), le glucose est, en condition normale, dégradé par le cycle de Krebs. Dans une situation hypoxique, la dégradation du glucose est déviée du cycle de Krebs et se termine par la dégradation du pyruvate en lactates par la lactate déshydrogénase A. Cet excès de lactate est expulsé de la cellule par les transporteurs monocarboxylates (MCT), entre autres, en même

temps que des protons H+ qui s'accumulent en péri-tumoral. Cette accumulation d'ions H+ fait chuter le pH du micro environnement aux alentours de 6-6,5. Au niveau tumoral, certaines voies de

"Stratégies de ciblage spécifique de la tumeur fondées sur les caractéristiques des antigènes tumoraux et du micro environnement tumoral".
Médecine & Sciences. 2020 ; 36 (hors-série n°1) : 56-60.

Tristan Mangeat, **Matthieu Gracia**, Pierre Martineau, Bruno Robert.

signalisation comme Ras pourrait également jouer un rôle dans cette acidification par augmentation des récepteurs GLUT, accélération de la glycolyse anaérobie et augmentation du taux de lactate. Ce phénomène de dégradation du glucose en lactates est appelé l'effet Warburg (Docteur Otto Heinrich Warburg). Ce sujet a été à l'origine d'une publication (**Annexe**) dans la revue française *Médecine & Sciences* en 2020 dont je suis second auteur (Mangeat et al. 2020) (**Fig. 14**) :

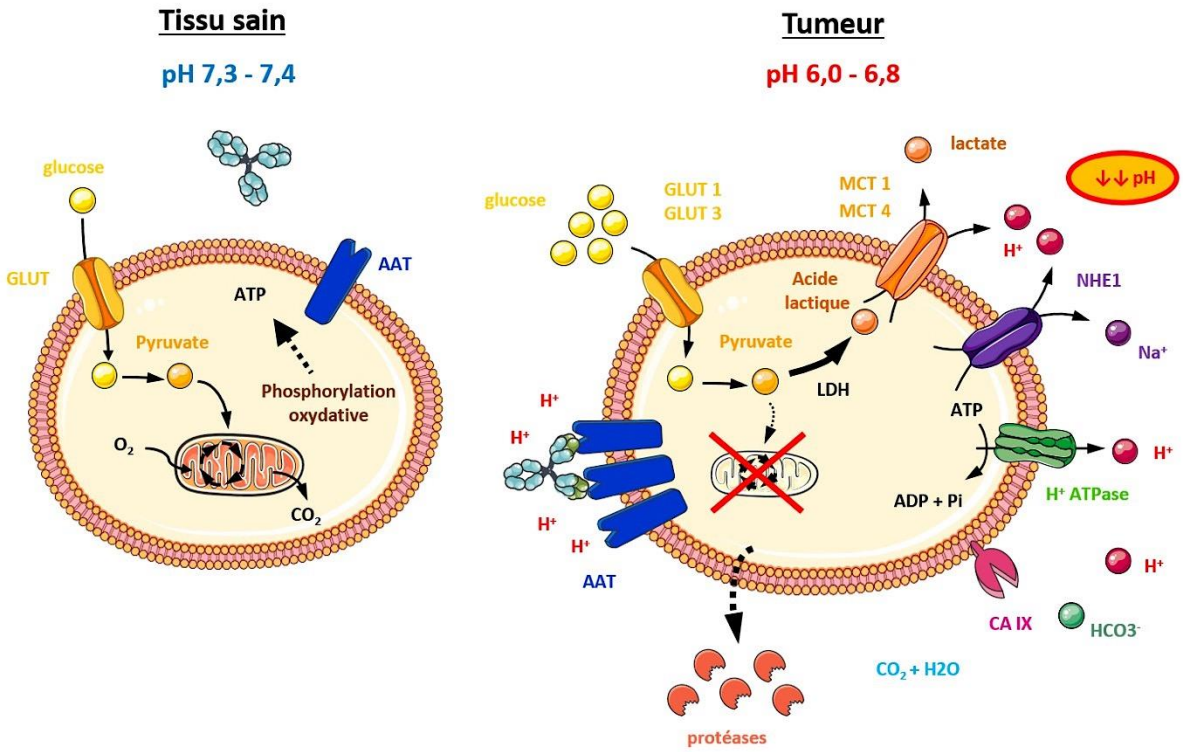


Figure 14: Glycolyse anaérobie et effet Warburg issus de la publication de Mangeat et al. sur l'effet Warburg. AAT = antigènes associés aux tumeurs ; LDH = lactate déshydrogénase ; GLUT = transporteurs du glucose ; CA = anhydrase carbonique ; MCT = transporteur des monocarboxylates ; NHE = transporteur du sodium et du proton (Mangeat et al. 2020).

Plusieurs équipes ont donc cherché à jouer sur ces caractéristiques du micro environnement tumoral afin de développer des anticorps plus spécifiques des tumeurs. Ils seraient capables d'accrocher leur cible plus facilement en condition acide (pH = 6) qu'en condition physiologique (pH = 7,4) et donc favoriser la fixation sur des tissus tumoraux et non sains. Ils ont pour cela étudié les

séquences des Fab des anticorps afin de classer les acides aminés en fonction de leur réactivité à pH acide. L'idée est donc d'enrichir les Fab des anticorps avec ces résidus afin de favoriser l'interaction anticorps-cible en condition acide. Les résidus Histidine (pKa = 6,4) ont été identifié comme les plus prometteurs. En effet, en condition physiologique, ce résidu est sous forme réduite mais devient protonée en condition acide. La fixation de l'anticorps sur sa cible serait optimisée à pH acide à l'aide de la conformation protonée de l'Histidine (H+).

L'équipe de Bonvin ont utilisé la connaissance du phage display pour mettre au point une banque de phages enrichis en Histidines. Les anticorps qui découlent de la sélection par phage display avec cette banque détiennent, en théorie, plus d'histidines dans leur CDR3 de la chaîne lourde de la partie variable (VH). Leurs capacités pH dépendantes semblent améliorées (Bonvin et al. 2015).

Sulea et son équipe ont mis au point des anticorps ciblant HER2 plus facilement en condition acide (pH 5,5-6) qu'en condition physiologique (pH = 7,4). Ils sont partis de leur anticorps parent bH1 qui détient une affinité pour HER2 similaire à celle du Trastuzumab HERCEPTIN® utilisé en clinique (de l'ordre du nanomolaire). Cet anticorps a été muté à des positions spécifiques pour remplacer certains résidus par des Histidines (^{H}R58H, ^{L}R30aH et ^{H}R58H, ^{L}S30bH). L'acide aminé choisi pour être remplacé est important (Tryptophane, Arginine ou Tyrosine) au même titre que la position de l'Histidine ajoutée. Certains de leurs clones se sont montrés plus affins pour HER2 que l'anticorps parent (Sulea et al. 2020). Cette même équipe ont de nouveau insisté sur le fait qu'outre la modification de certains résidus en Histidine, la position de cette modification est importante. Ils ont comparé de nombreux mutants qui ont toutes les positions du CDR modifiées une par une en histidines. Pour cela, ils ont muté une position en histidine puis réintroduit tout le reste la séquence d'origine pour classer les positions jouant plus ou moins un rôle dans la pH dépendance. La mutation en position 58 (R58H) est ressortie comme très prometteuse. Cela a confirmé leur papier précédent qui avait déjà muté l'anticorps à cette position (Sulea et al. 2020). Ils ont également relevé la position 99 de la boucle CDR-H3 (chaine lourde) comme prometteuse à la différence d'autres positions.

Plusieurs sociétés telles que Halozyme ou BioAtla ont développé des méthodes pour obtenir des anticorps pH dépendants. BioAtla ont mis plusieurs anticorps en essai clinique très récemment qui détiennent des propriétés pH dépendantes contre ROR2 ou AXL (NCT03504488 et NCT04681131). BioAtla a également développé un anticorps anti-CTLA4 avec des mutations de résidus polaires et non polaires au profit d'autres résidus chargés comme l'acide aspartique ou glutamique (NCT05180799) (Chang et al. 2021).

On peut justifier les mutations aux positions préférentielles par d'autres approches. En effet, ces positions peuvent modifier la conformation structurelle du Fab afin de diminuer l'accessibilité à la cible. On peut muter certaines positions pour réduire la taille du résidu et diminuer l'encombrement

stérique. Enfin, il peut y avoir des mutations qui permettent d'autres interactions que celles avec les H+ (Wei et al. 2022).

3. La cible choisie : Récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR)

3.1. Structure membranaire et facteur soluble

L'EGFR (ou HER1 ou ErbB-1) est un récepteur de la famille des Human Epidermal Growth Factor (HER). Cette famille est composée de 4 récepteurs tyrosine-kinases (HER1-4). Ces récepteurs sont des monomères détenant une partie extracellulaire permettant la liaison au ligand, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique à activité tyrosine kinase. Il existe une homologie de structure primaire d'environ 40% entre les 4 récepteurs de la famille. Cependant, les différences entre les 4 composants de cette famille HER expliquent les différentes capacités de liaison aux ligands. La partie extracellulaire est composée de quatre sous-domaines (notés I à IV) répétés deux à deux et qui se succèdent en alternance. Les domaines I et III (L1, L2) sont les sites de fixation du ligand. Les domaines II et IV (CR1, CR2) sont riches en cystéines et impliqués dans les interactions entre les monomères. La partie transmembranaire est une courte séquence d'une vingtaine d'acides aminés de nature hydrophobes. La partie intracellulaire d'activité tyrosine kinase reste elle très conservée et détient un domaine C-terminal riche en résidus tyrosine, lieu des phosphorylations (Sergina and Moasser 2007). Ces récepteurs sont activés par la fixation en extracellulaire de ligands spécifiques (EGF, TGF-α, EPR, NRG) sauf HER2 pour lequel aucun ligand n'a été découvert (Freed et al. 2017). Cette fixation entraine une homo- ou hétéro-dimérisation des récepteurs de cette famille qui induit le rapprochement des domaines tyrosine kinase en intracellulaire (voie PI3K/AKT, RAS/Raf/MAPK ou encore JAK/STAT3) (Pines, Köstler, and Yarden 2010). Cette dimérisation est permise car le ligand permet de rapprocher les domaines I et III tout en exposant le domaine II qui est l'interface de dimérisation des récepteurs. Cela aboutit à une activation de gènes pro tumoraux par transphosphorylation impliqués dans la prolifération cellulaire, l'échappement à l'apoptose, la survie. Cela favorise le développement de cellules cancéreuses (Sergina and Moasser 2007) (**Fig. 15**).

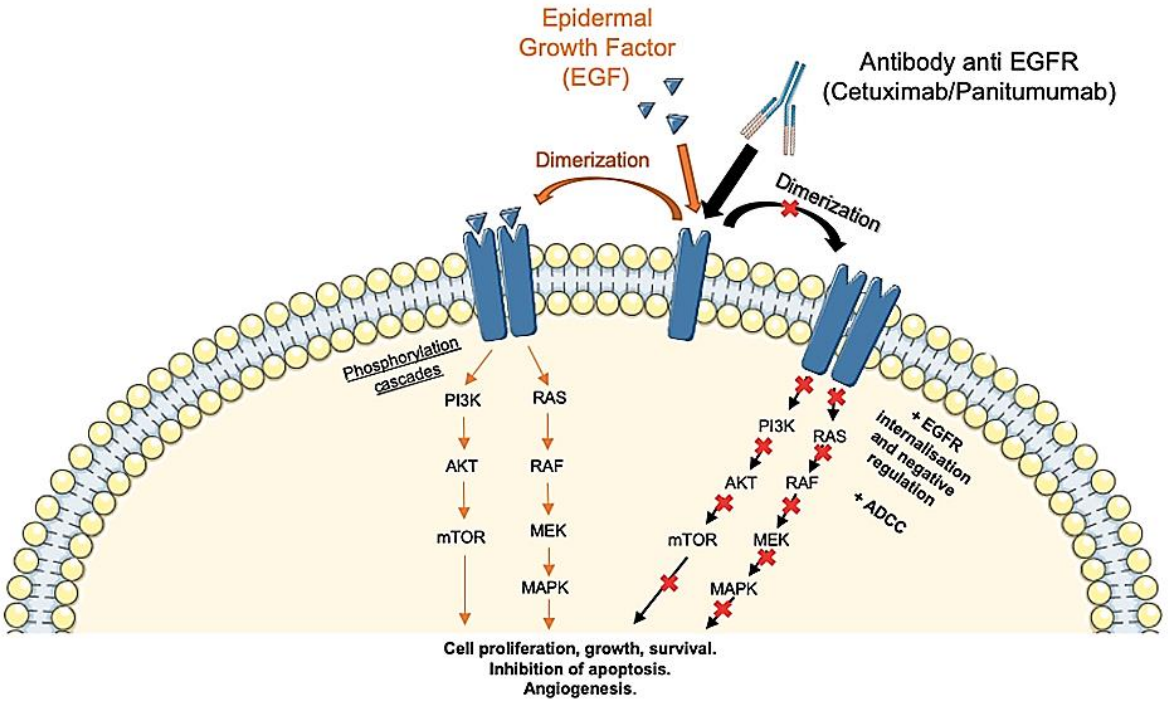


Figure 15: Une partie des voies de signalisations de l'EGFR après fixation de son antigène EGF ainsi que le mécanisme d'action des anticorps anti EGFR qui bloquent la dimérisation du récepteur et la cascade de phosphorylations qui en découle.

3.2. Rôle physiologique

Ce récepteur a un rôle prépondérant dans le développement cellulaire. Il régule, après fixation de son ligand, la prolifération, la migration et la différenciation, l'adhésion cellulaire, via les voies HGF/c-Met, AKT ou ERK. Il permet d'accroître in fine la survie cellulaire par diminution des taux de p21 et p15 qui inhibent le cycle cellulaire (entrée en phase S). Ces récepteurs ont aussi un rôle prépondérant dans la gestion de l'apoptose (mort cellulaire programmée) par sécrétion de l'α2-macroglobuline qui inhibe la voie des TGFβ. Cette inhibition augmente le taux de protéine anti apoptotique $Bclx_L$ et réduit le taux de protéine pro apoptotique Bmf. Dans ce cas, l'apoptose s'en retrouve réduite et permet une multiplication cellulaire normalement contrôlée. Ces mécanismes seraient importants dans la régénération du foie (Giraud, Fatou, and Dellis 2016). On retrouve aussi un intérêt notable de toute la famille des récepteurs HER dans le développement de tissus comme le système cardiovasculaire (HER2), le système nerveux (HER3 et HER4), les glandes mammaires et les épithéliums en général (Casalini et al. 2004). Chez l'adulte, ces récepteurs jouent continuellement un rôle dans le fonctionnement normal de ces tissus tant que ces récepteurs restent en nombre physiologique et ne se retrouvent pas surexprimés.

3.3. Intérêt thérapeutique en cancérologie

Ce récepteur à l'EGF est surexprimé dans presque tous les cancers agressifs avec une origine épithéliale et est bien défini comme un proto-oncogène depuis plusieurs dizaines d'années (Ritter and Arteaga 2003). On peut retrouver ce récepteur surexprimé dans le cancer de la tête et du cou (90-100%), les gliomes (90-100%), le cancer bronchique non à petites cellules (75-90%), le cancer colorectal (80-85%), le cancer du sein (25%) ou encore le cancer du col de l'utérus. Cette surexpression entraine une prolifération, une croissance et une survie cellulaire incontrôlées. On observe également une inhibition drastique de l'apoptose qui empêche l'élimination physiologique des cellules endommagées ou retrouvées dans des zones anormales. Enfin, on observe une angiogenèse accélérée qui accroit considérablement le développement vasculaire et ce de façon anarchique. Toutes ces conséquences favorisent le développement cellulaire tumoral et l'échappement de ces cellules à la régulation physiologique (Sigismund, Avanzato, and Lanzetti 2018; Normanno et al. 2006).

L'inhibition de cette cible se positionne donc comme une option thérapeutique intéressante. De nombreux anticorps ont donc été développé pour se fixer sur la partie extracellulaire du récepteur (domaine III pour le Cetuximab et pour le Panitumumab) et empêcher la fixation du ligand qui induit la dimérisation du récepteur (S. Li et al. 2005; Cartenì et al. 2007). Sans cette dimérisation, toute la cascade de phosphorylation en aval ne peut avoir lieu réduisant ainsi la prolifération cellulaire et la croissance tumorale (**Fig. 15**). Les études *in vitro* et *in vivo* de nouveaux anticorps anti EGFR sous formats divers (IgG1, ADC) sont menées sur des modèles cellulaires semblables aux nôtres surexprimant l'EGFR humain comme les lignées A 431, HCC 827 ou MDAMB 231 (Chen et al. 2015; Hu et al. 2019; Xu et al. 2019).

4. Développement d'anticorps d'affinité diminuée pour réduire le « on target off tumor »

4.1. Un anticorps d'affinité réduite en cancérologie

Les anticorps thérapeutiques utilisés en cancérologie ont des affinités élevées pour leur cible. En effet, l'intérêt principal est d'avoir une forte interaction entre l'anticorps et sa cible. Malheureusement, comme énoncé précédemment, les cibles sur exprimées dans de nombreux cancers et utilisées comme solution thérapeutique sont également présentes à l'état basal dans différents tissus sains (1.4.1). L'intense affinité entraîne une fixation des anticorps également sur ces tissus sains malgré le fait qu'ils détiennent un niveau d'expression faible de la cible c'est ce que l'on appelle le « on target off tumor ». Plusieurs études ont donc mis en avant l'intérêt d'optimiser les anticorps en réduisant leur affinité pour leur cible. Cette réduction d'affinité a pour but de rendre transitoire la fixation de l'anticorps sur sa cible au niveau du tissu sain. En effet, le niveau d'expression faible de la cible induit une fixation de l'anticorps par un seul bras (fixation monovalente). L'anticorps

peut donc se décrocher plus facilement (avidité plus faible et K_{off} plus rapide) et induire bien moins de toxicité. Dans le même temps, il faut s'assurer que l'anticorps soit toujours capable de sa fixer sur sa cible tumorale. Cela est permis par le fort niveau d'expression de la cible au niveau tumoral. L'accrochage de l'anticorps sur sa cible peut se faire par les deux bras du Fab (liaison bivalente), ce qui lui confère une stabilité importante au niveau tumoral. Son avidité reste forte puisque sa capacité à se détacher de sa cible reste faible du fait de cet accrochage robuste. Quand bien même l'anticorps se décrocherait, il a la possibilité de s'accrocher de nouveau sur les autres cibles à proximité (Y. Zhou et al. 2012).

4.2. Réduction du ciblage du tissu sain

Junttila et son équipe ont mis au point un anticorps bispécifique dépendant des cellules T (HER2-TDB) ciblant HER2 (bras monovalent huIgG1 humanisé issu du Trastuzumab – 4D5) (Carter et al. 1992) et CD3 (bras monovalent humanisé – UCHT1.v9) par la technique du knob-into-hole. L'affinité du bras ciblant HER2 est similaire à l'affinité du Fab monovalent du Trastuzumab (de l'ordre du nanomolaire) et l'affinité du bras ciblant CD3 est aussi de l'ordre du nanomolaire. Ce TDB est capable d'agir au niveau tumoral et ce d'autant plus que la quantité de récepteurs est importante. Afin d'optimiser cette sélectivité sur le tissu tumoral sur exprimant la cible par rapport au tissu sain qui exprime la cible à un niveau plus faible, ils ont modulé l'affinité du bras anti HER2 et anti CD3 indépendamment. Le bras CD3 d'affinité réduite n'impacte pas l'efficacité (*in vitro* et *in vivo* mais augmente tandis que le bras HER2 d'affinité réduite permet d'épargner les cellules exprimant faiblement HER2 (analogie avec le tissu sain) (Junttila et al. 2014; Staflin et al. 2020).

Wong et son équipe ont mis au point un anticorps (nommé RN765C) humanisé anti EGFR couplé à une drogue cytotoxique (ADC). Cette drogue, nommée PF-06380101, est un agent anti mitotique qui inhibe la polymérisation de la tubuline induisant l'arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire. Le linker contient un lien clivable valine-citrulline (AcLys-VC-PABC) afin de libérer la drogue à proximité de la cellule tumorale. Cet anticorps est bivalent avec une affinité diminuée pour la cible. Ils ont montré que cet anticorps d'affinité réduite garde une fixation élevée sur les cellules avec un fort niveau d'expression d'EGFR mais perd sa fixation sur des cellules avec un niveau moyen ou faible d'expression de la cible. Ces lignées cellulaires avec un niveau moyen ou faible d'expression de la cible peuvent s'apparenter à du tissu sain (kératinocytes par exemple). Dans ce cas, le tissu sain serait épargné générant chez le patient très peu de toxicité tout en gardant une bonne efficacité clinique (Wong et al. 2018) (**Fig. 16**).

L'entreprise américaine Genentech et plus particulièrement l'équipe de Slaga (même équipe que Junttila plus haut) ont continué d'améliorer l'anticorps bispécifique HER2/CD3 permettant une spécificité tumorale via HER2 et un recrutement des LT via le CD3. L'anticorps amélioré est monovalent

pour CD3 et bivalent d'affinité réduite pour HER2 permettant une meilleure spécificité sur les cellules tumorales HER2+. En effet, leur anticorps est capable de se fixer de façon permanente sur les lignées sur exprimant HER2 mais épargne les cellules qui expriment les lignées qui expriment faiblement ou moyennement HER2 (équivalent des tissus sains). Ils ont également montré dans un modèle *in vitro* que la bivalence HER2, même d'affinité réduire, permet de maintenir une avidité forte grâce à la grande proximité des récepteurs HER2 sur ces cellules sur exprimant la cible (Slaga et al. 2018) (**Fig. 16**).

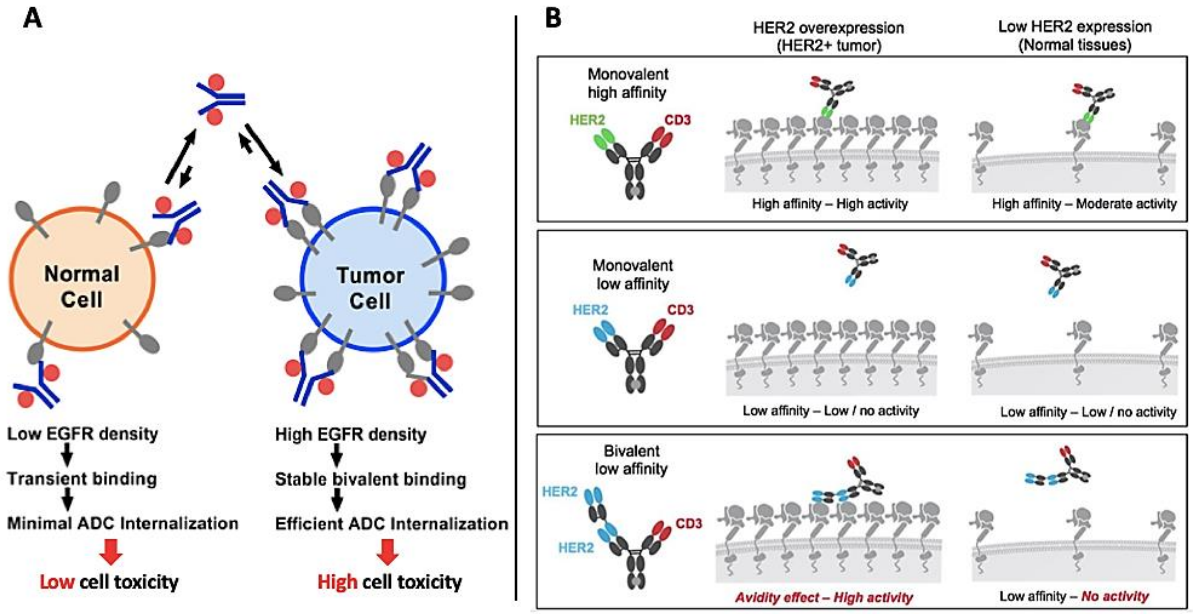


Figure 16: Schéma explicatif du ciblage d'un anticorps d'affinité réduite. Ciblage d'un ADC de DAR 2 d'affinité réduite à l'aide d'un schéma modifié de Wong et al (A) ;
Différence de ciblage entre trois constructions d'anticorps faisant intervenir des bras détenant une affinité diminuée pour la cible HER2 d'après Slaga et al (B).

L'équipe de Mazor et Dall'Acqua ont développé un anticorps bispécifique (bsAb) ciblant HER2 et EGFR. Le bras dirigé contre HER2 est celui du Trastuzumab (anticorps parent IgG bivalent) et détient une forte affinité pour sa cible de l'ordre du nanomolaire. Le second bras dirigé contre l'EGFR est issu du GA201 (anticorps humanisé anti EGFR avec ADCC optimisé via glyco ingenierie) et détient également une forte affinité pour sa cible de l'ordre du nanomolaire. La co expression HER2-EGFR est retrouvée au niveau tumoral et ils ont utilisé dans cette publication la lignée NCI-H358 (cancer du poumon non à petites cellules) qui co exprime ces deux récepteurs. Le ciblage de deux récepteurs accroît la spécificité de cet anticorps sur le tissu tumoral. Pour améliorer encore cette spécificité et réduire la fixation sur le tissu sain ils ont muté le bras anti-EGFR afin d'obtenir un panel de variants d'affinités différentes. Ces variants ont donné des affinités allant de 0,7nM (EGFR/HER2 DuetMab classique) à 167nM pour le DuetMab détenant deux mutations sur le bras anti EGFR : VkF94A +

VhP97A. Ces deux mutations ont aussi permis d'obtenir des affinités diminuées en format bivalent anti EGFR (148nM) ou DuetMab scFv (159nM). Sur la lignée NCI-H358 coexprimant EGFR et HER2, tous leurs variants sont capables de s'y fixer (activité cytotoxique maintenue) et la forte avidité issue de la double fixation EGFR et HER2 permet une très faible dissociation (K_{off} lent). Ils ont modifié la lignée NCI-H358 afin de la rendre HER2 silencieuse (KO). Sur cette lignée modifiée, l'anticorps classique (EGFR/HER2 DuetMab) se fixe toujours par son seul bras anti EGFR de forte affinité. A l'inverse, l'anticorps muté pour le bras anti-EGFR (VkF94A + VhP97A/HER2 DuetMab) d'affinité réduite n'est plus capable de se fixer avec son seul bras anti-EGFR. La sélectivité de leur anticorps muté sur le bras anti-EGFR est bien meilleure que l'anticorps parent non muté car il maintient une activité cytotoxique sur la lignée doublement positive mais épargne la lignée ko pour HER2 (Mazor et al. 2017).

D'autres équipes ont plus récemment mis en avant un intérêt similaire dans les thérapies CAR-T. Liu et son équipe de Pennsylvanie ont donc montré cette capacité de réduction de ciblage du tissu sain avec des CAR-T ciblant HER2 via des scFv d'affinités différentes. Ces scFv sont dérivés de l'anticorps humanisé 4D5 ciblant HER2 cité précédemment (Carter et al. 1992). Le panel d'affinité s'étend sur 1 log d'écart entre le 4D5 (le plus affin à 0,58nM) et le 4D5-3 (le moins affin 4nM). Les CARs sont construits avec l'ajout des scFv sur la région charnière et transmembranaire CD8α suivis en intra cellulaire des domaines de co-stimulation 4-1BB et d'activation CD3ζ. Ces CAR-T ont ensuite été testés *in vitro* sur des lignées d'expression forte (SK-BR3, SK-OV3 et BT-474) et faible d'HER2 (MCF7, PC3…). Les CAR-T d'affinité forte montrent *in vitro* une activité forte sur les lignées quel que soit leur niveau d'expression pour HER2. Les CAR-T d'affinité faible sont efficaces sur les lignées exprimant fortement HER2 mais semblent inactifs sur les lignées qui expriment HER2 à des niveaux plus faibles (équivalent tissu sain). *In vivo*, les résultats vont dans le même sens avec une activité anti tumorale équivalente pour tous les CAR-T sur la lignée xénogreffée d'expression forte pour HER2 (SK-OV3). Sur la lignée xénogreffée d'expression faible pour HER2 (PC3), seul le CAR-T de forte affinité entraine une régression quasi complète de la tumeur. La lignée PC3 (équivalent tissu sain) continue de croitre malgré l'injection du CAR-T d'affinité faible. On peut donc conclure que le CAR-T d'affinité diminuée est capable d'agir sur des tumeurs sur exprimant la cible (HER2 ici) tout en épargnant un tissu sain exprimant faiblement cette même cible (lignée PC3 ici) (X. Liu et al. 2015).

Trois autres équipes ont également confirmé ces résultats sur d'autres CAR-T. Tout d'abord, Park et son équipe ont modulé l'affinité de leur CAR-T dirigé contre la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) surexprimée dans de nombreux carcinomes mais également exprimé à l'état basal dans de nombreux tissus sains comme les cellules endothéliales ou épithéliales. Le CAR-T d'affinité réduite (20 μM avec la mutation F292A) permet une efficacité *in vitro* (sur les lignées d'expression forte de la cible) et *in vivo* comparable au CAR-T d'affinité élevée (1 nM avec la mutation F265S/F292G/G311C). Cependant, la fixation *in vitro* sur les lignées d'expression faible de la cible et la toxicité *in vivo* sont

considérablement réduites pour le CAR-T d'affinité diminuée. *In vivo*, une mortalité rapide par un cumul de toxicités est observée après l'administration du CAR-T d'affinité élevée (Park et al. 2017). Ensuite, Drent et son équipe ont mis au point des CAR-T d'affinités différentes dirigés contre l'antigène CD38 sur exprimé dans le myélome multiple (plasmocytes) mais également à l'état basal sur des cellules hématopoïétiques (NK, monocytes). Les conclusions sont similaires à l'étude précédentes à savoir que l'efficacité de leur CAR-T d'affinité réduite est comparable au CAR-T d'affinité élevée tout en réduisant fortement les effets indésirables sur les tissus/cellules saines (Drent et al. 2017). Enfin, Di Roberto et son équipe ont mis au point une plateforme de cellules T pour faire une sélection de CAR-T de différentes affinités. L'idée est donc de sélectionner les CAR-T d'affinité réduite. Ils ont montré l'efficacité de leur plateforme avec une preuve de concept basée sur des CAR-T dirigés contre HER2. Ces CAR-T d'affinité réduite sont capables de se fixer sur les lignées exprimant fortement les récepteurs (SKBR3) mais incapable de se fixer sur les lignées d'expression faible de la cible mimant le tissu sain (HEK293) (Di Roberto et al. 2020).

4.3. Augmentation de la diffusion

Les membranes cellulaires qui détiennent de nombreux récepteurs concentrent l'anticorps à leur surface. Une fois fixé, l'anticorps bivalent de forte affinité/avidité ne se décrochera. C'est le cas de l'épithélium vasculaire qui correspond à une des premières barrières cellulaires que l'anticorps rencontre et doit traverser pour rejoindre la tumeur même si elle s'avère très souvent fenestrée et donc facilement franchissable. Une fois que cette barrière vasculaire est franchie, l'anticorps va se fixer très fortement à la 1^{ière} cible qu'il rencontre au niveau tumoral et rester en péri-vasculaire (dépendant de la dose injectée). Sa diffusion au sein même de la tumeur s'en retrouve très faible aux doses thérapeutiques. L'affinité diminuée pourrait permettre une diffusion plus en profondeur de l'anticorps au sein d'une tumeur solide par fixation transitoire de l'anticorps sur sa 1^{ière} cible rencontrée. Une fois détaché de sa 1^{ière} cible, l'anticorps peut diffuser plus en profondeur au sein de la tumeur et se répartir de façon beaucoup plus homogène (Greg M. Thurber, Schmidt, and Wittrup 2008; G. M. Thurber, Zajic, and Wittrup 2007).

L'équipe d'Adams aux USA ont mis au point des scFv anti-HER2/*neu* de différentes affinités (10^{-6} à 10^{-11} molaire). Ils ont utilisé un modèle de souris greffées par des cellules SKOV3 (cancer de l'ovaire) qui sur exprime HER2. Ils ont mis en évidence en immunofluorescence (IF) et immunohistochimie (IHC) que leur anticorps de forte affinité (10^{-11} molaire) était cantonné aux zones péri-vasculaires contrairement à leur anticorps de plus faible affinité (10^{-7} molaire) qui n'est pas cantonné aux zones péri-vasculaires et peut diffuser plus en profondeur dans la tumeur (Adams et al. 2001).

L'équipe de Rudnick et Adams a développé d'autres anticorps anti-HER2 au format IgG dérivés d'un de leur scFv (C6.5) de la publication précédente. Ils en ont obtenu 4 avec des affinités allant de

0,56nM pour l'anticorps avec la meilleure affinité (H3B1) et 270nM pour l'anticorps avec la plus faible affinité (G98A). Ils ont utilisé la même lignée SKOV3 sur exprimant HER2 sur des souris greffées en sous cutané. Ils ont quantifié la distance de leur 4 anticorps + Trastuzumab (contrôle positif) par rapport aux vaisseaux sanguins les plus proches. Ils ont remarqué que l'anticorps qui diffusait le plus (distance la plus grande) était celui avec l'affinité la plus faible : le G98A. Cela renforce encore l'idée qu'une affinité diminuée peut permettre une meilleure pénétration intra tumorale des anticorps et une diffusion plus homogène (Rudnick et al. 2011).

Cette diffusion facilitée est également dépendante d'un autre paramètre lié à l'affinité qui est le niveau d'expression de la cible. En effet, de nombreux papiers ont mis en avant le fait qu'un tissu détenant de nombreux récepteurs ne sera que très rarement saturé d'anticorps et que la diffusion et pénétration tumorale sera dépendante de voie telle que la vascularisation. A l'inverse, un tissu détenant peu de récepteurs sera très rapidement saturé et la pénétration tumorale sera dépendante des cibles.

Notre étude s'est donc portée sur une sélection d'anticorps anti EGFR détenant des affinités réduites pour cette cible et des propriétés de pH dépendance variables. Le but est d'optimiser la spécificité de fixation sur le tissu tumoral (« on target on tumor ») en réduisant le ciblage du tissu sain (« on target off tumor »). Nous avons choisi le modèle d'expression EGFR, ciblé en thérapie dans des cancers comme ceux colorectal et épidermoïde de la tête et du cou par des anticorps de forte affinité Cetuximab et Panitumumab. Nos résultats suivants mettent en avant les études *in vitro*, *in cellulo* et enfin *in vivo* qui confirment notre hypothèse initiale.

RESULTATS

1. Sélection par phage display et mise au format IgG1

1.1. Phage display sur EGFR

La sélection par phage display a été menée sur la protéine EGFR humain – Fc humain (hEGFR-hFc R&D Systems) et la protéine EGFR murine – Fc humain (mEGFR-hFc R&D Systems). Elle a été effectuée avec une banque de phage HuscI (**Hu**man **sc**Fv **I**ntrabody library) développée au sein de notre équipe (Robin et al. 2014). Les phages de cette banque expriment à leur surface des fragments d'anticorps humains au format scFv (single chain variable fragment) qui présentent une diversité axée sur certains résidus (Tyr, Ser, Asn, Asp et Gly) à des positions des régions déterminants la complémentarité (CDRs) stratégiques pour l'interaction avec l'antigène. Cette sélection s'est déroulée selon un protocole classique de phage display, en trois tours de sélection avec déplétions, à deux pH différents à savoir à pH physiologique d'environ 7,4 et à pH acidifié d'environ 6 (**Fig. 17**). L'intérêt d'utiliser ces deux cibles humaine et murine est de pouvoir obtenir des anticorps qui pourraient être utilisés en modèles *in vivo* syngénique ou greffés par des cellules humaines et l'intérêt d'un anticorps plus affin à pH acide qu'à pH physiologique aurait l'intérêt de favoriser la fixation de nos anticorps sur leur cible dans des conditions acides comme dans le micro environnement de certaines tumeurs.

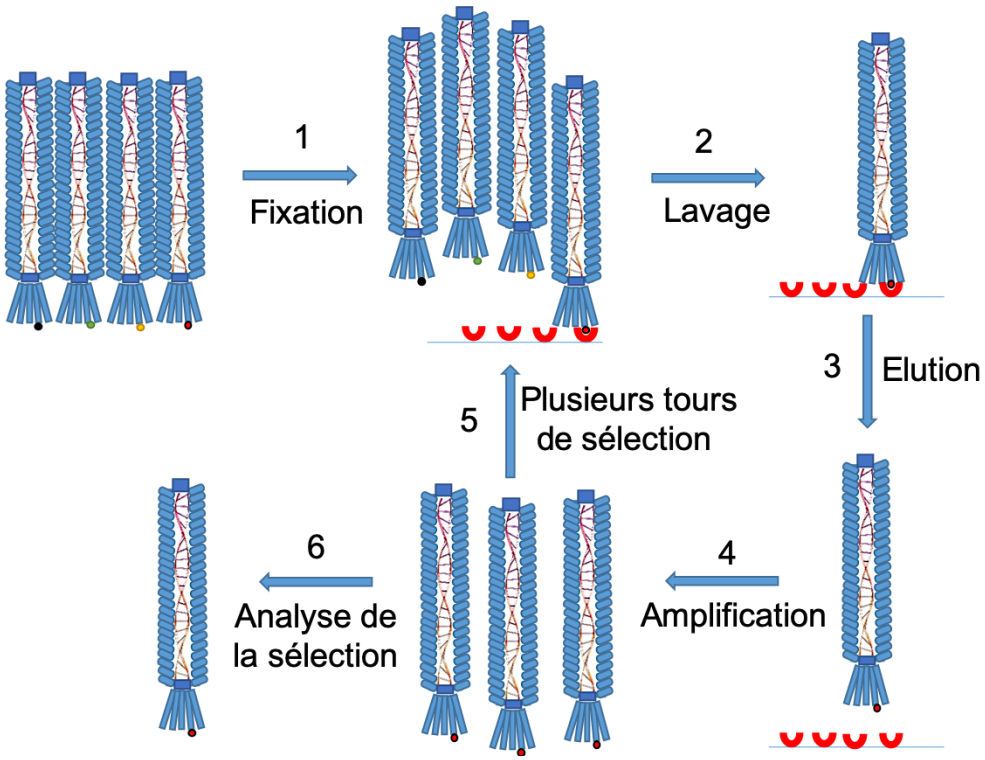


Figure 17 : Principe d'une sélection par phage display sur protéine immobilisée sur plaque (en rouge).

Les trois tours de sélections ont permis un enrichissement notable des clones dirigés contre les protéines d'intérêts humaine et murine EGFR-hFc (hEGFR et mEGFR) mais pas contre la protéine irrelevante DDR1. On note également que l'enrichissement a été plus fructueux dans les conditions de

sélection à pH acide. En effet, l'enrichissement au troisième tour de sélection est trois fois supérieur à pH acide pour l'EGFR humain et plus de deux fois supérieur pour l'EGFR murin qu'en condition physiologique. La mesure de cet enrichissement s'effectue par absorbance à 450nm après un ELISA polyclonal classique (**Fig. 18**) :

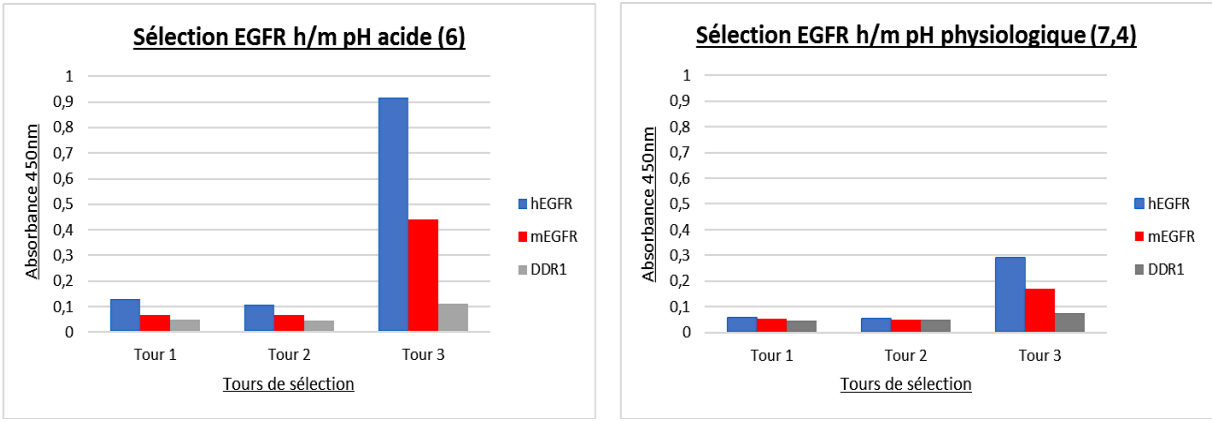
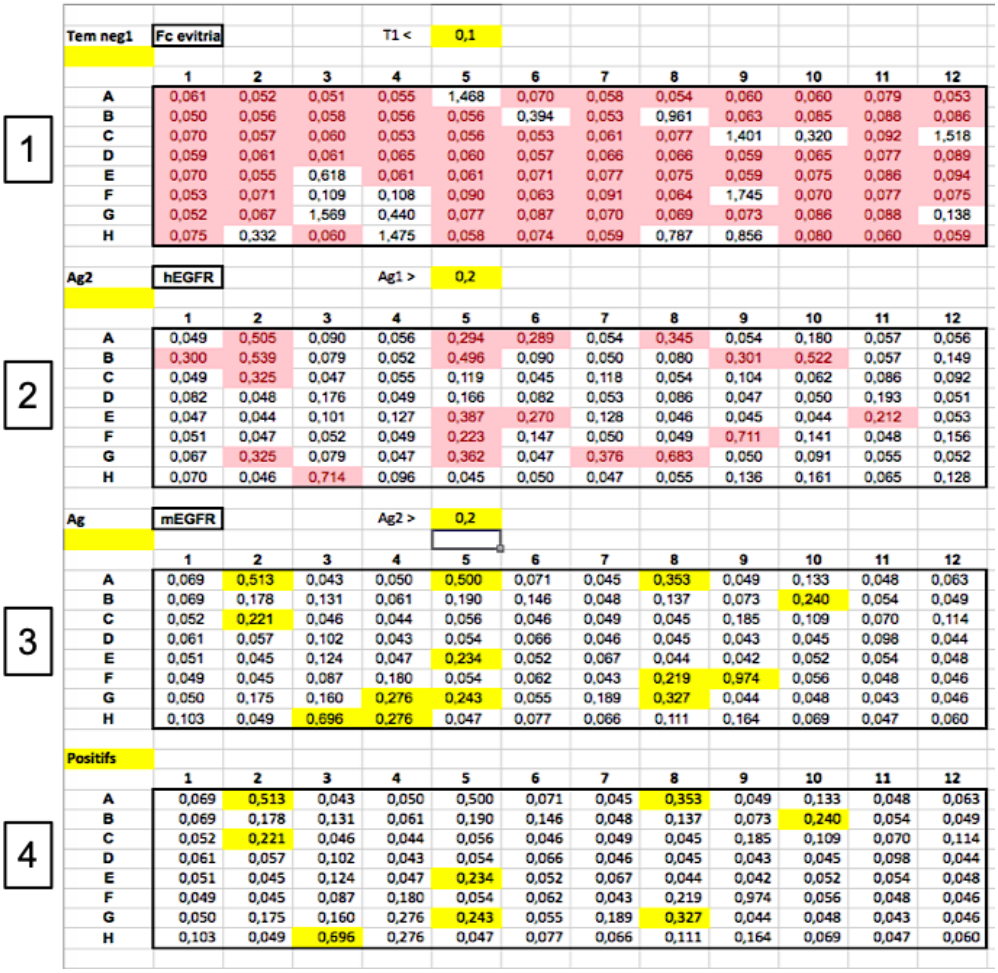


Figure 18 : Résultats par ELISA de l'enrichissement des phages polyclonaux spécifiques de hEGFR (bleu) et mEGFR (rouge) sur les trois tours de sélection aux deux pH. La sélection à pH acide est représentée à gauche et celle à pH physiologique à droite. Le contrôle négatif est effectué sur la protéine irrelevante DDR1.

Après infection des bactéries suppressives (HB2151) par les phages issus du 3^{ième} tour de sélection, puis étalement sur boîtes de gélose, piquage des 96 clones et sécrétion dans le surnageant bactérien des scFv divers, tous les scFv sont testés en ELISA monoclonal sur les protéines d'intérêts hEGFR-hFc et mEGFR-hFc aux deux pH physiologique (7,4) et acide (6). Le contrôle négatif est effectué sur la première plaque avec le Fc seul (**Fig. 19 (1)**). On remarque quelques scFv positifs sur cette première plaque (blanc) qui seront non sélectionnés par la suite. La seconde plaque nous expose la fixation des scFv sur la protéine hEGFR-hFc avec les clones positifs en rouge et ceux négatifs en blanc (**Fig. 19 (2)**). La troisième plaque nous montre la fixation des scFv sur la protéine mEGFR-hFc avec les clones positifs en jaune et ceux négatifs en blanc (**Fig. 19 (3)**). La quatrième et dernière plaque nous montre les clones positifs à la fois pour hEGFR et pour mEGFR en jaune et ceux négatifs en blanc (**Fig. 19 (4)**). Ces résultats sont comparés entre eux afin d'effectuer la sélection des clones. Les 96 clones sont recensés sur la figure ci-dessous (**Fig. 19**) :



Tem neg1	Fc evitria			T1 <	0,1							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,061	0,052	0,051	0,055	1,468	0,070	0,058	0,054	0,060	0,060	0,079	0,053
B	0,050	0,056	0,058	0,056	0,056	0,394	0,053	0,961	0,063	0,085	0,088	0,086
C	0,070	0,057	0,060	0,053	0,056	0,053	0,061	0,077	1,401	0,320	0,092	1,518
D	0,059	0,061	0,061	0,065	0,060	0,057	0,066	0,066	0,059	0,065	0,077	0,089
E	0,070	0,055	0,618	0,061	0,061	0,071	0,077	0,075	0,059	0,075	0,086	0,094
F	0,053	0,071	0,109	0,108	0,090	0,063	0,091	0,064	1,745	0,070	0,077	0,075
G	0,052	0,067	1,569	0,440	0,077	0,087	0,070	0,069	0,073	0,086	0,088	0,138
H	0,075	0,332	0,060	1,475	0,058	0,074	0,059	0,787	0,856	0,080	0,060	0,059

1

Ag2	hEGFR			Ag1 >	0,2							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,049	0,505	0,090	0,056	0,294	0,289	0,054	0,345	0,054	0,180	0,057	0,056
B	0,300	0,539	0,079	0,052	0,496	0,090	0,050	0,080	0,301	0,522	0,057	0,149
C	0,049	0,325	0,047	0,055	0,119	0,045	0,118	0,054	0,104	0,062	0,086	0,092
D	0,082	0,048	0,176	0,049	0,166	0,082	0,053	0,086	0,047	0,050	0,193	0,051
E	0,047	0,044	0,101	0,127	0,387	0,270	0,128	0,046	0,045	0,044	0,212	0,053
F	0,051	0,047	0,052	0,049	0,223	0,147	0,050	0,049	0,711	0,141	0,048	0,156
G	0,067	0,325	0,079	0,047	0,362	0,047	0,376	0,683	0,050	0,091	0,055	0,052
H	0,070	0,046	0,714	0,096	0,045	0,050	0,047	0,055	0,136	0,161	0,065	0,128

2

Ag	mEGFR			Ag2 >	0,2							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,069	0,513	0,043	0,050	0,500	0,071	0,045	0,353	0,049	0,133	0,048	0,063
B	0,069	0,178	0,131	0,061	0,190	0,146	0,048	0,137	0,073	0,240	0,054	0,049
C	0,052	0,221	0,046	0,044	0,056	0,046	0,049	0,045	0,185	0,109	0,070	0,114
D	0,061	0,057	0,102	0,043	0,054	0,066	0,046	0,045	0,043	0,045	0,098	0,044
E	0,051	0,045	0,124	0,047	0,234	0,052	0,067	0,044	0,042	0,052	0,054	0,048
F	0,049	0,045	0,087	0,180	0,054	0,062	0,043	0,219	0,974	0,056	0,048	0,046
G	0,050	0,175	0,160	0,276	0,243	0,055	0,189	0,327	0,044	0,048	0,043	0,046
H	0,103	0,049	0,696	0,276	0,047	0,077	0,066	0,111	0,164	0,069	0,047	0,060

3

Positifs												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,069	0,513	0,043	0,050	0,500	0,071	0,045	0,353	0,049	0,133	0,048	0,063
B	0,069	0,178	0,131	0,061	0,190	0,146	0,048	0,137	0,073	0,240	0,054	0,049
C	0,052	0,221	0,046	0,044	0,056	0,046	0,049	0,045	0,185	0,109	0,070	0,114
D	0,061	0,057	0,102	0,043	0,054	0,066	0,046	0,045	0,043	0,045	0,098	0,044
E	0,051	0,045	0,124	0,047	0,234	0,052	0,067	0,044	0,042	0,052	0,054	0,048
F	0,049	0,045	0,087	0,180	0,054	0,062	0,043	0,219	0,974	0,056	0,048	0,046
G	0,050	0,175	0,160	0,276	0,243	0,055	0,189	0,327	0,044	0,048	0,043	0,046
H	0,103	0,049	0,696	0,276	0,047	0,077	0,066	0,111	0,164	0,069	0,047	0,060

4

Figure 19 : Résultats de la fixation des 96 clones au format scFv sur les protéines d'intérêts par ELISA à pH physiologique (partie gauche). Fixation des scFv sur la protéine irrelevante Fc (Evitria) avec les hits positifs en blanc et ceux négatifs en rouge (1) ; Fixation des scFv sur la protéine hEGFR avec les hits positifs en rouge et ceux négatifs en blanc (2) ; Fixation des scFv sur la protéine mEGFR avec les hits positifs en jaune et ceux négatifs en blanc (3) ; Récapitulatif des hits positifs pour les deux protéines hEGFR et mEGFR en jaune et ceux négatifs en blanc (4).

1.2. Sélection des clones d'intérêts

La sélection des clones se base sur la capacité de fixation des clones sur les cibles hEGFR et mEGFR aux deux pH. Nous avons sélectionné six clones qui seront nommés dans la suite du manuscrit : B1, B2, B12, G5, G8 et H3 (coordonnées sur la plaque ELISA). Certains clones sélectionnés (B2, G8 et H3) semblent être cross réactants car positifs aussi sur mEGFR. Nous avons séquencé ces clones afin d'obtenir les séquences des VH/VL (parties variables lourdes et légères) des scFv sélectionnés et de pouvoir comparer les régions CDRs. Ces séquences correspondent aux zones inhérentes à la fixation de l'anticorps sur sa cible et l'on remarque sur les séquences que certaines mutations sont observées sur les CDR1 et 2 des chaines lourdes et sur les CDR1, 2 et 3 des chaines légères. Ces mutations pourraient être à l'origine des différences de fixation des anticorps sur leurs cibles hEGFR et mEGFR si des études plus précises sur les interactions anticorps-cible le confirment. C'est dans un souci de confidentialité que les séquences ne seront pas montrées dans ce manuscrit.

1.3. Mise au format IgG1

Les séquences ont été intégrées dans les vecteurs pEF-hu-IgG1 et pEF-hu-IgG1-LALAPG qui ont une structure d'immunoglobuline 1 humaine avec un fragment cristallisable sauvage pour le 1er vecteur et muté LALAPG pour le second. Cette mutation abolit les interactions entre le fragment Fc et les Fcγr. Ces vecteurs sont transformés en bactérie. Les séquences des clones bactériens sont contrôlées pour vérifier que celle-ci est bien celle attendue (confidentiel). On contrôle la bonne intégration du VH et du VL dans le vecteur par gel d'agarose 1% dans du tampon Tris Acétate EDTA (TAE) à l'aide du SYBR Green (intercalent ADN) sous lumière UV en connaissant le poids moléculaire du vecteur ayant intégré VH + VL par rapport au vecteur avec une seule intégration soit de VH soit de VL ou même le vecteur seul (**Fig. 20 (A)**). On superpose également les séquences théoriques avec celles obtenues par séquençage des clones. On sélectionne les clones qui détiennent la séquence identique à celle théorique (absence délétion, mutations ou insertions). L'exemple ici est celui de l'alignement du clone B1 (**Fig. 20 (B)**).

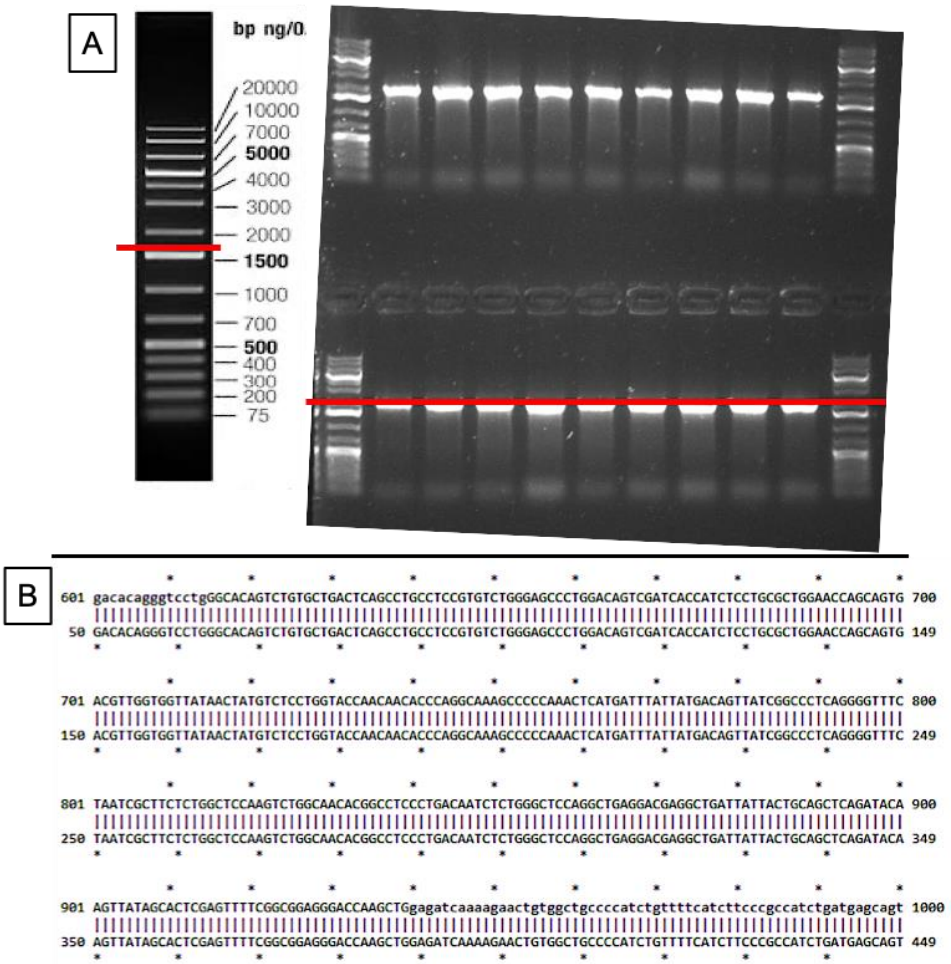


Figure 20 : Vérification de la bonne insertion des VH et VL. Le gel permet de vérifier la bonne taille de 1871pb en ligne rouge sur gel d'agarose si VH et VL ont été intégrés (A) ; Alignement de la séquence théorique (supérieure) sur la séquence de notre clone (inférieure) (B).

Les anticorps positifs et validés sont suivis d'une production d'ADN en grande quantité, (Midiprep NucleoSpin Plasmid EasyPure de Macherey-Nagel) via transfection du vecteur en bactéries TOP10. Cet ADN en grande quantité a pour but de pouvoir produire la protéine correspondante (ici sous format IgG1 humain). Les cellules HEK 293T sont transfectées par cet ADN et sécrètent les IgG1 dans le surnageant. La production nous donne des rendements allant de 2 à 10 µg de protéine par mL de milieu surnageant selon les clones et les mutations éventuelles des fragments Fc (LALAPG) (**Tableau 1**) :

Tableau 1 : Rendements de production des différents clones par production en cellules HEK 293T.

Nom clone	**B1**	**B2**	**B12**	**G5**	**G8**	**H3**	**B1 lalapg**	**B2 lalapg**
Rendement (ug/mL)	6,938	8,743	6,622	8,549	9,275	6,365	5,697	4,278

Une fois purifiés sur billes de protéines A et dessalés, ces clones, normalement correspondants aux clones espérés, doivent être validés *in vitro* par différents tests pour contrôler la bonne fixation sur la cible hEGFR et/ou mEGFR.

En conclusion de cette 1ière partie, nous avons développé des anticorps au format IgG1 WT et IgG1 LALAPG à partir d'une sélection par phage display à deux pH (physiologique à 7,4 et acide à 6) sur les protéines hEGFR-hFc et mEGFR-hFc. Le panel d'anticorps semble détenir des affinités et des capacités de pH dépendance diverses. Les tests *in vitro* mis en place par la suite devront confirmer ou infirmer ces hypothèses.

2. Caractérisation *in vitro* des clones choisis au format IgG1

2.1. ELISA

La fixation des anticorps au format IgG1 a été évaluée par ELISA sur la protéine hEGFR-hFc (**Fig. 21**) à pH physiologique et acide (7,4 et 6) à l'aide de nos solutions tampon Phosphate (Tampon Phosphate 20mM NaCl 150mM) étalonnée et de l'anticorps secondaire anti huFab (A0293). L'anticorps contrôle positif est le Cetuximab (ERBITUX®) qui détient une affinité élevée pour l'hEGFR (de l'ordre du nM) comme en atteste le signal ELISA à saturation (DO = 2,5). Nos six anticorps ont, quant à eux, des affinités variables que l'on peut classer du plus affin au moins affin : H3>G5>G8>B2>B1>B12. On classe donc trois anticorps de fortes affinités avec H3, G5 et G8, deux anticorps d'affinité moyenne avec B1 et B2 et un anticorps d'affinité faible avec B12. De plus, on remarque que le Cetuximab n'a aucune capacité de pH dépendance, comme attendu, contrairement à nos anticorps. Ces derniers ont des propriétés de pH dépendance modestes pour les anticorps H3 et G5 (écart acide/physio < 2) ou importantes pour G5, B1 et B2 (écart acide/physio > 2). L'anticorps B12, ayant une fixation très faible à pH physiologique (7,4), est à analyser prudemment mais semble avoir une capacité de fixation retrouvée à pH acide (6) (**Fig. 21**).

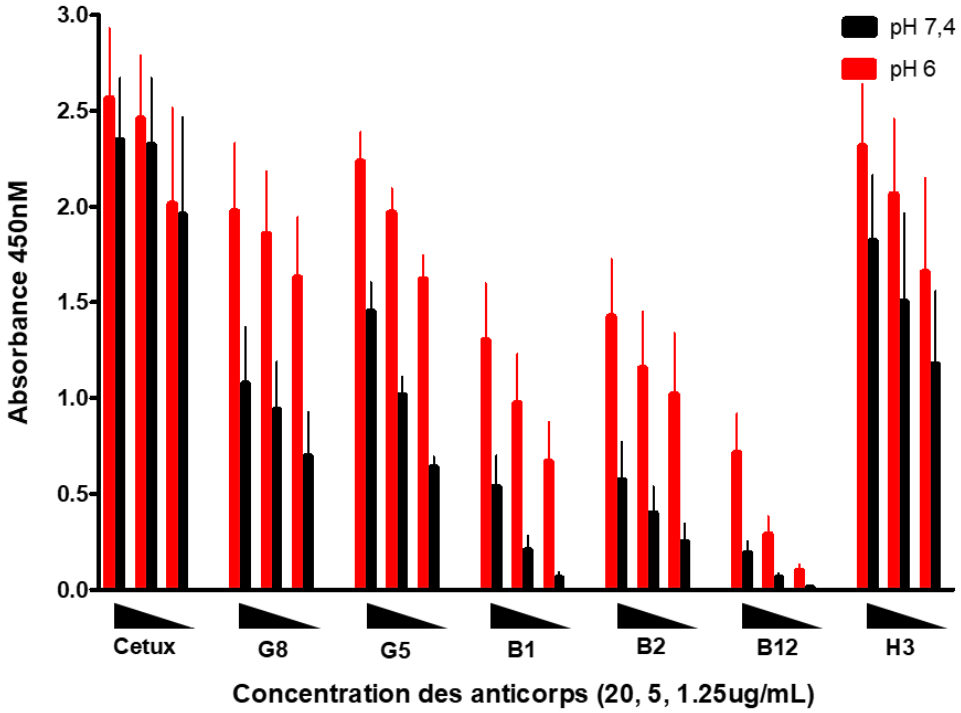


Figure 21 : ELISA de contrôle de la fixation de nos six anticorps sur la protéine hEGFR-hFc à trois concentrations. La fixation est évaluée à pH physiologique (7,4) en noir et à pH acide (6) en rouge.

2.2. Dose réponse

Afin de compléter ce premier test de fixation de nos anticorps, nous avons mis en place une dose réponse sur la cible hEGFR-hFc par ELISA. Cette dose réponse a été effectuée aux deux pH physiologique et acide (Tampon Phosphate 20mM NaCl 150mM) afin de compléter les premiers résultats de pH dépendance de l'ELISA précédent à trois concentrations fixes (**Fig. 21**). Nous avons pris comme anticorps contrôle positif le Cetuximab (ERBITUX®) et le Panitumumab (VECTIBIX®) et nous avons effectué une gamme de concentrations allant de 0,02 à 33,3 nM sur la protéine hEGFR-hFc. Ces résultats montrent une absence de pH dépendance significative pour chacun des deux anticorps (**Fig. 22**). En effet, les EC50 (concentration nécessaire pour atteindre 50% de la fixation maximale) du même anticorps aux deux pH (7,4 et 6) sont similaires.

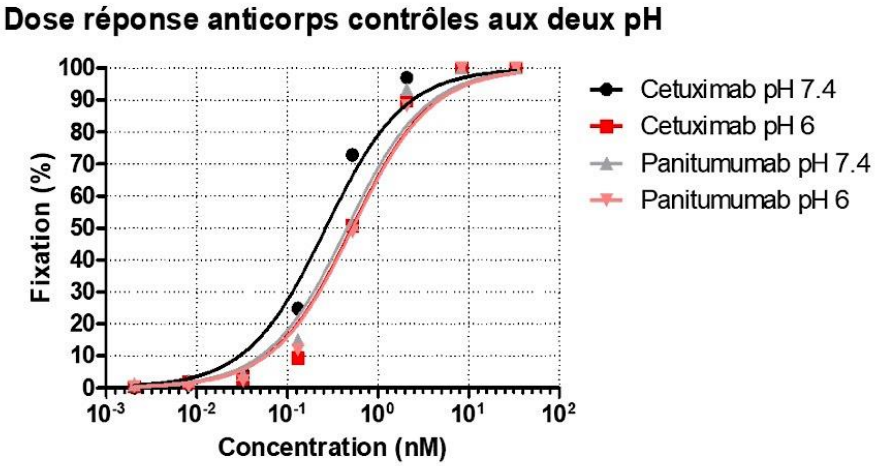


Figure 22 : Évaluation de la capacité dose réponse des anticorps de contrôle positif le Cetuximab et le Panitumumab aux pH physiologique (7,4) et acide (6) sur la protéine hEGFR-hFc.

Nous avons ensuite procédé à une dose réponse dans les mêmes conditions pour tous nos anticorps avec à chaque fois en contrôle positif le Cetuximab et le Panitumumab à des concentrations croissantes similaires (0,02 à 2133,33 nM). Nous avons effectué les doses réponses aux deux pH physiologique et acide séparément sur la même protéine hEGFR-hFc. On peut remarquer l'affinité plus importante des anticorps de contrôle par rapport à nos anticorps à l'étude (EC50 plus importante) (**Fig. 23** gauche) en condition physiologique, ce qui confirme l'ELISA initial (**Fig. 21**). On remarque qu'en condition acide, nos anticorps retrouvent une meilleure affinité qui tend à se rapprocher de celle des anticorps de contrôle (**Fig. 23** droite). Il semble que nous sommes en présence d'anticorps d'affinité plus faible que les anticorps de contrôle mais qui peuvent accroître leur affinité en conditions acides (conditions présentent dans le micro environnement de certaines tumeurs solides) (**Fig. 23**).

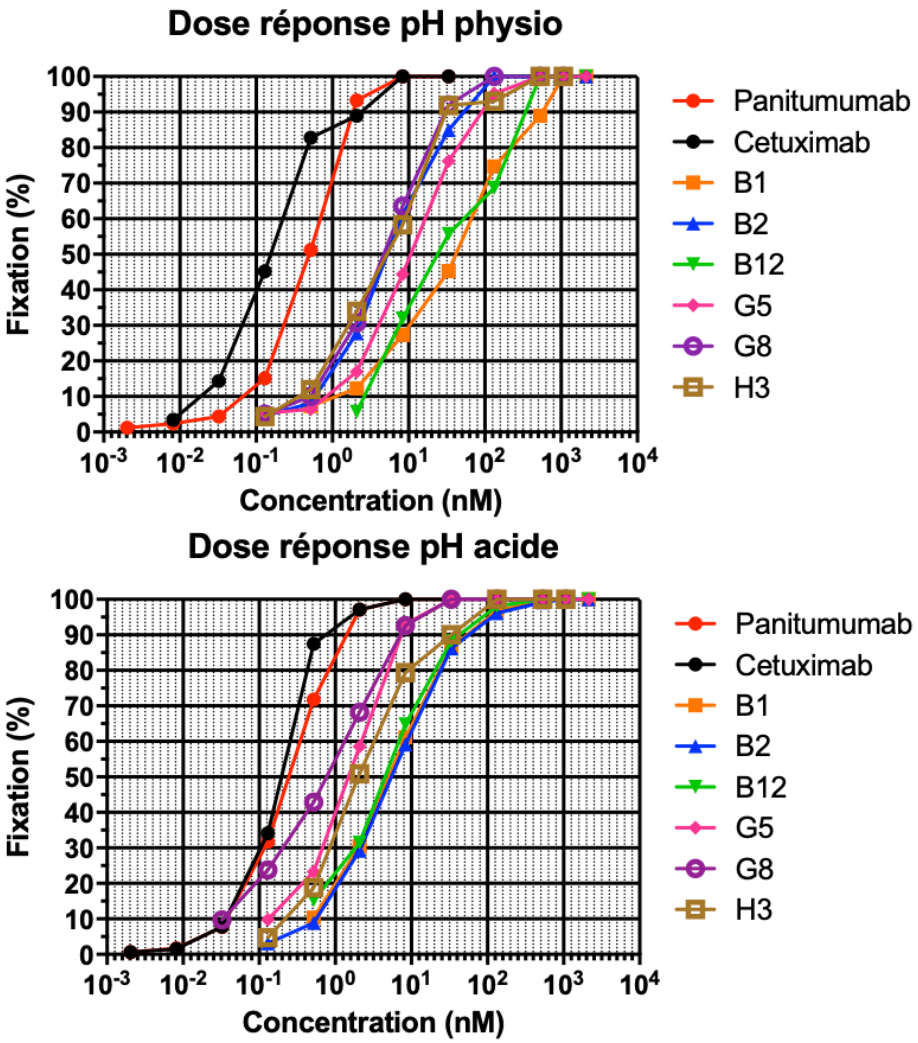


Figure 23 : Évaluation des doses réponses des anticorps contrôle et de nos six anticorps au pH physiologique de 7,4 (au-dessus) et au pH acide de 6 (en-dessous).

Enfin, nous avons isolé les doses réponses de chaque IgG1 aux deux pH physiologique et acide en fonction d'un contrôle positif (ici le Panitumumab) dans le but de comparer les EC50 (**Fig. 24**). Tous les anticorps ont une capacité de fixation et donc une affinité inférieure à celle du Panitumumab (anticorps de contrôle en bleu). Néanmoins, nous confirmons ici que tous nos anticorps gagnent en affinité en condition acide car toutes les courbes à pH acide (pH = 6 en rouge) sont décalées vers la gauche par rapport aux courbes à pH physiologique (pH = 7,4 en noir). On obtient donc des EC50 réduites en condition acide ce qui traduit une meilleure affinité. Nos anticorps, étudiés séparément, sont donc moins affins que l'anticorps de contrôle mais ont acquis une pH dépendance leur permettant une fixation facilitée en condition acide (**Fig. 24**).

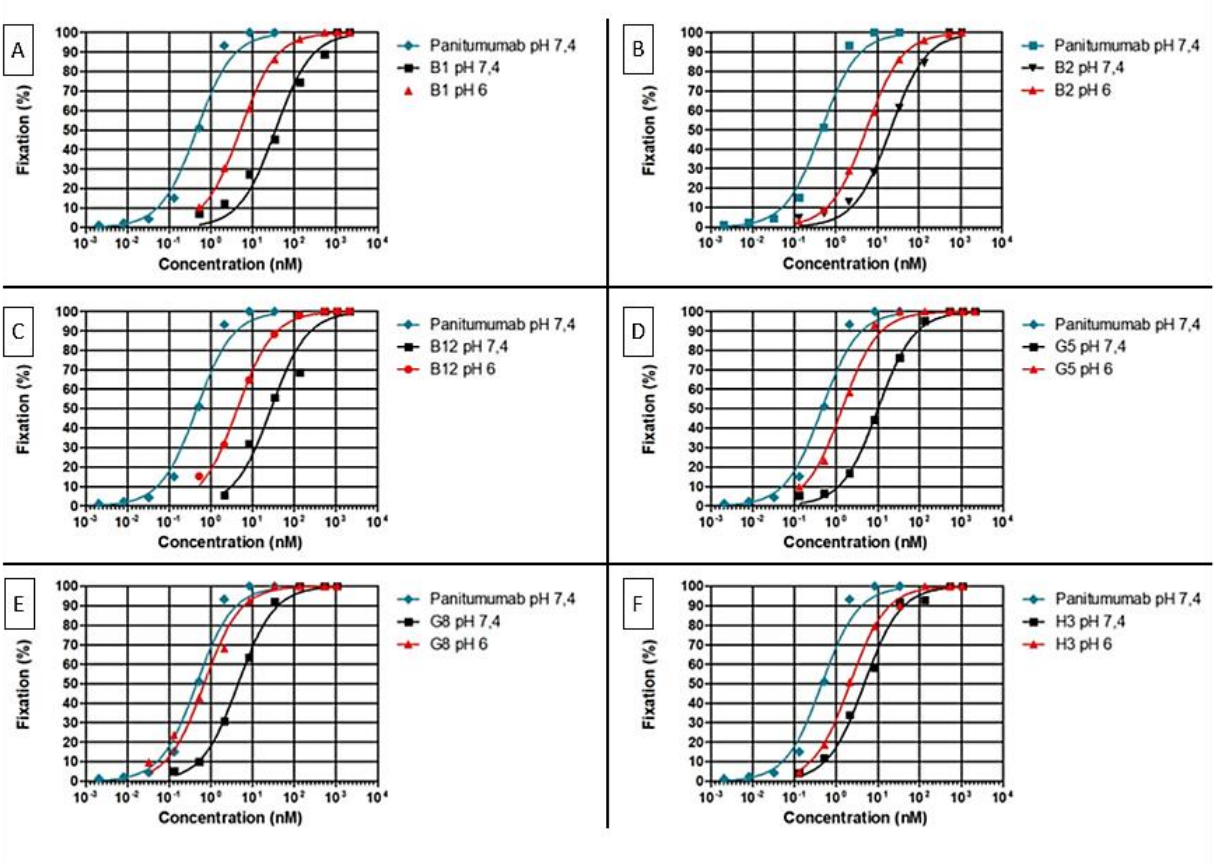


Figure 24 : Évaluation des doses réponses individualisées pour chaque anticorps en condition acide (pH = 6) en rouge et physiologique (pH = 7,4) en noir. L'anticorps contrôle Panitumumab en bleu est évalué à pH physiologique (pH = 7,4). Les six anticorps sont : B1 (A) ; B2 (B) ; B12 (C) ; G5 (D) ; G8 (E) et H3 (F).

En effet, les EC50 des anticorps diminuent toujours en condition acide au minimum d'un facteur deux pour H3 et jusqu'à un facteur sept pour B1. Ces écarts d'EC50 en fonction du pH sont recensés dans le tableau de comparaison récapitulatif ci-dessous (**Tableau 2**) :

Tableau 2 : Comparaison des EC50 des six anticorps contre la protéine hEGFR-hFc aux deux pH physiologique et acide (7,4 et 6) exprimé en nano molaire (nM) (n=1).

	EC50 pH 7,4 (nM)	**EC50 pH 6 (nM)**	**Écart des EC50**
B1	35,28	5	7,06
B2	20,6	5,42	3,80
B12	27,57	4,33	6,37
G5	10,10	1,39	7,27
G8	4,49	0,69	6,51
H3	4,72	2,15	2,20
Cetuximab	0,27	0,51	0,5
Panitumumab	0,45	0,53	0,85

2.3. BIACORE

Dans le but de confirmer tous ces premiers résultats *in vitro*, nous avons étudié plus précisément les interactions protéine/ligand par la technique de résonance plasmonique de surface (SPR) du système BIACORE. L'anticorps, piégé sur la puce par son fragment cristallisable, capte et relâche en flux continu l'EGFR humain monomérique dans le flux. La constante de vitesse d'association est définie lorsque le signal de résonance augmente à la suite de l'injection et de la captation de l'EGFR humain monomérique par notre anticorps anti EGFR (k_{on} ou ka). La fin de l'injection de l'EGFR humain monomérique entraine une phase de plateau puis de décroissance du signal de résonance, du au décrochage progressif de l'EGFR monomérique de l'anticorps anti EGFR, caractérisant la constante de vitesse de dissociation (k_{off} ou kd) (**Fig. 25**).

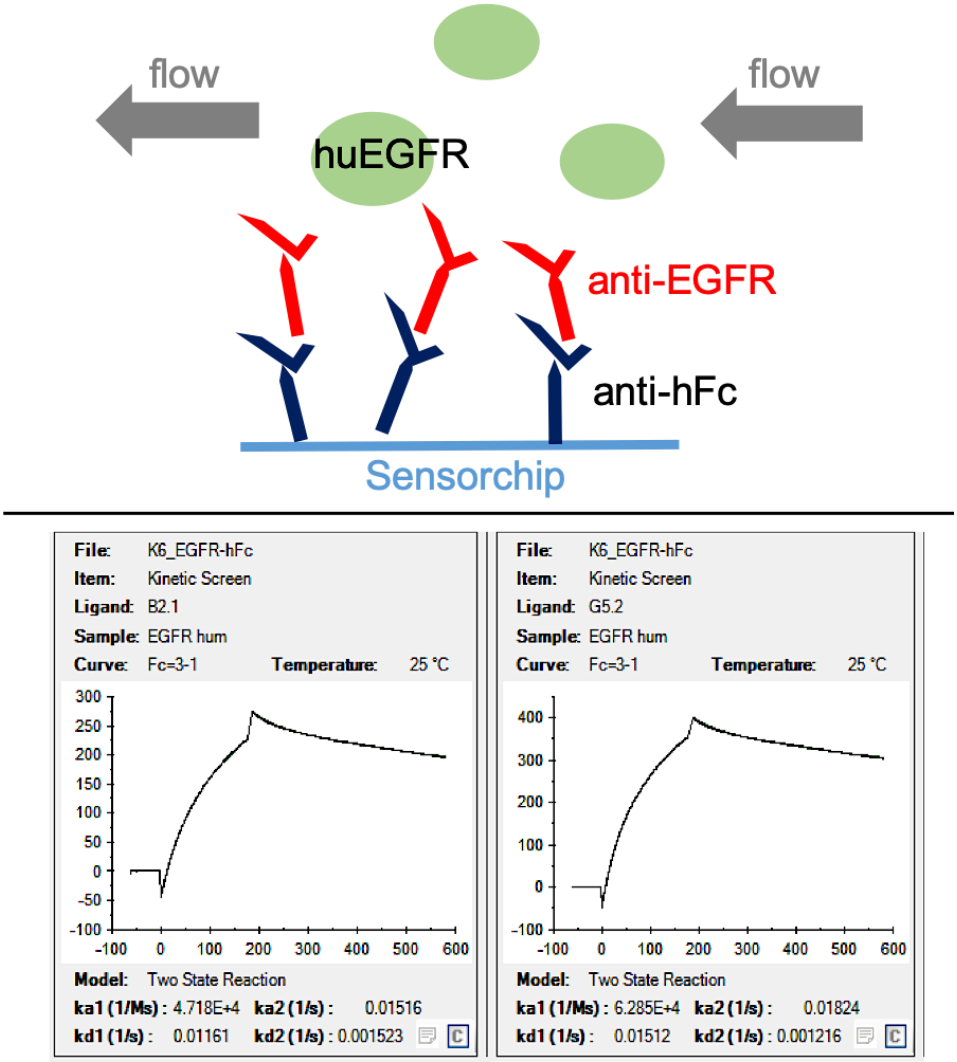


Figure 25 : Schéma du fonctionnement du BIACORE dans notre cas de figure (partie supérieure). Représentation des courbes du BIACORE pour les anticorps B2 et G5 respectivement de gauche à droite. Les phases de croissance, de plateau et de décroissance sont bien visibles. L'axe des ordonnées correspond à l'intensité de fixation à un moment précis en unité de résonance (RU) et l'axe des abscisses correspond au temps (sec).

Ces constantes de vitesses (ka et kd) sont combinées pour obtenir les valeurs de KD qui reflètent l'affinité propre de nos anticorps. Après analyse, nous retrouvons bien les groupes d'anticorps d'affinité différentes entre les anticorps de contrôle (Cetuximab et Panitumumab) de très forte affinité (de l'ordre du nM ou subnM), les anticorps G5, G8 et H3 de forte affinité, les anticorps B1 et B2 d'affinité moyenne et l'anticorps B12 d'affinité faible (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Résultats du BIACORE pour chaque anticorps selon le pH d'analyse de la solution de flux contenant le ligand huEGFR monomérique (n=1).

Ligand	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	pH d'analyse
Cetuximab	$3{,}84.10^{5}$	$6{,}09.10^{-4}$	$1{,}58.10^{-9}$	7,4
Panitumumab	$3{,}16.10^{5}$	$7{,}6.10^{-5}$	$2{,}41.10^{-10}$	7,4
B1	$5{,}4.10^{4}$	$9{,}24.10^{-4}$	$1{,}71.10^{-8}$	6
B2	$4{,}62.10^{4}$	$7{,}54.10^{-4}$	$1{,}63.10^{-8}$	6
B12	$1{,}64.10^{5}$	$5{,}2.10^{-3}$	$3{,}17.10^{-8}$	6
G5	$5{,}6.10^{4}$	$6{,}25.10^{-4}$	$1{,}12.10^{-8}$	6
G8	$5{,}39.10^{4}$	$4{,}75.10^{-4}$	$8{,}8.10^{-9}$	6
H3	$6{,}9.10^{4}$	$6{,}07.10^{-4}$	$8{,}79.10^{-9}$	6

On peut remarquer que la différence d'affinité d'un log entre les deux anticorps de contrôle est due uniquement à une dissociation plus lente pour le Panitumumab (kd plus petit et donc temps de dissociation plus long). Cette dissociation semble très intéressante pour la diffusion et pénétration d'un anticorps dans la tumeur car elle permet à l'anticorps de se détacher plus rapidement de sa cible afin qu'il diffuse plus en profondeur. On peut remarquer que notre anticorps de faible affinité détient le kd le plus grand ($5{,}2.10^{-3}$) et donc un temps de décrochage de la cible très court. A l'inverse, notre anticorps H3 de forte affinité détient un kd équivalent à celui du Cetuximab (6.10^{-4}), lui conférant un décrochage plus lent. Bien entendu, nos anticorps détiennent également une constante d'association ka plus petite (un log d'écart) que nos anticorps de contrôle, ce qui explique grandement la différence de KD du même ordre de grandeur (un log également) (**Tableau 3**).

En conclusion de cette 2nde partie, nous avons validé la fixation de nos anticorps sur protéine recombinante hEGFR-hFc. Nous avons classé nos anticorps en fonction de leur affinité et ce par rapport à nos anticorps de contrôle de très forte affinité. Nous avons quantifié précisément cette affinité par BIACORE et remarqué que nos anticorps ont tous un log de moins en affinité par rapport aux anticorps de contrôle. Enfin, nous avons évalué par dose réponse les capacités de pH dépendance de nos anticorps en se basant toujours sur nos anticorps de contrôle qui n'ont aucune capacité de pH dépendance. Cette capacité de pH dépendance de nos anticorps est variable entre un anticorps peu pH dépendant comme le H3 et un anticorps avec une pH dépendance plus prononcée comme le B1. Nous avons donc en notre possession des anticorps d'affinité diminuée par rapport aux anticorps de contrôle dotés en plus, pour certains, de capacités non négligeables de pH dépendance. La combinaison de ces caractéristiques est en faveur d'une réduction de la toxicité. Nous allons donc continuer d'étudier de façon plus prononcée *in cellulo* toutes ces caractéristiques.

3. Validation *in cellulo* des anticorps au format IgG1

3.1. Lignées cellulaires choisies

Pour valider la fixation de nos anticorps sur cellules, nous avons choisi différentes lignées cellulaires tumorales qui expriment un niveau différent de récepteurs humain à l'EGF. En effet, l'idée ici est d'avoir des lignées qui miment un tissu tumoral qui exprime fortement la cible hEGFR et, dans le même temps, des lignées qui miment un tissu sain en exprimant moyennement ou faiblement l'EGFR humain. En se basant sur la littérature, nous avons sélectionné six lignées cellulaire tumorales humaines : A431 (carcinome épidermoïde), HCC827 (cancer du poumon), BxPC3 (cancer du pancréas), MDAMB231 (cancer du sein), SKOV3 (cancer de l'ovaire) et SW620 (cancer du côlon). La première étape a été de valider ces niveaux d'expression différents de l'EGFR humain.

3.2. Quantification nombre récepteurs

Nous avons évalué le nombre de récepteurs par cellule pour chacune de ces lignées par un kit : Quantum Simply Cellular (Bangs Laboratories) basé sur une gamme de billes calibrées (anti Fc humain) pour obtenir une droite étalon de nombre croissant de sites de fixation prédéfinis. On obtient des lignées cellulaires tumorales avec un large panel de récepteurs allant d'aucun récepteurs/cellule à plusieurs millions/cellules : les lignées tumorales A431 et HCC827 sont d'expression forte d'EGFR humain, les lignées MDAMB231, BxPC3 et SKOV3 sont d'expression moyenne d'EGFR humain et SW620 est une lignée négative pour l'EGFR humain (**Fig. 26**).

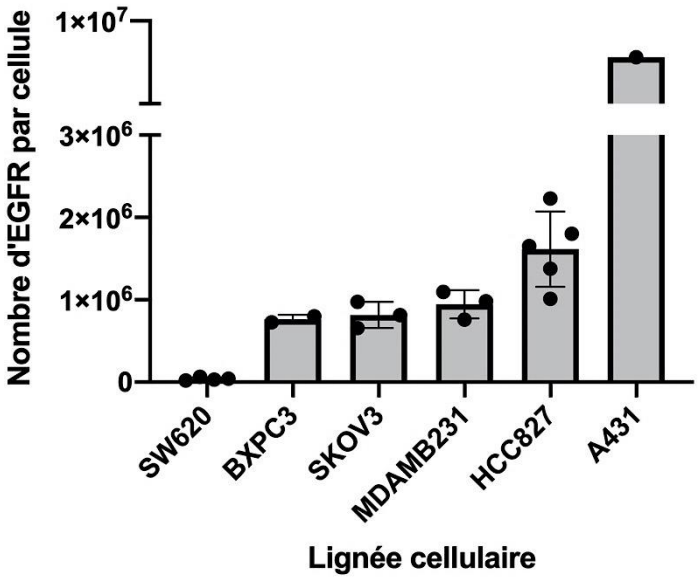


Figure 26 : Quantification du nombre de récepteurs EGFR humain par cellules pour les six lignées étudiées. Cette quantification est basée sur le Quantum Simply Cellular kit (Bangs Laboratories). Toutes les lignées ont été quantifiées au moins trois fois sauf A 431 (n=1) et BxPC3 (n=2).

L'intérêt de cette quantification est que l'on peut comparer les lignées d'expression moyenne du récepteur EGFR humain (BxPC3, SKOV3 ou MDAMB231) à du tissu sain (kératinocytes par exemple) chez l'Homme qui exprime un nombre moyen d'EGFR humain également (Puccinelli, Bertics, and Masters 2010).

3.3. Cytométrie des anticorps mutés Fc-LALAPG sur la lignée THP1

Afin de vérifier la bonne structure de nos anticorps au format Fc muté LALAPG, nous avons utilisé la lignée THP1 (monocytes humains) qui exprime les récepteurs Fcgamma I et II. La mutation LALAPG doit abolir la fixation de l'anticorps sur les récepteurs Fcgamma récepteurs I et II. Nous avons donc étudié par cytométrie à pH physiologique (7,4) la fixation ou non de nos anticorps Fc muté LALAPG sur cette lignée. On remarque une fixation très prononcée de chacun de nos anticorps Fc WT (bleu) sur cette lignée contrairement aux anticorps Fc muté LALAPG (orange). En effet, les écarts de MFI sont conséquents et les pics correspondants aux anticorps sont très distincts (décalage sur la droite si l'anticorps se fixe). Nous pouvons donc valider la présence de cette mutation LALAPG dans le fragment Fc de nos anticorps produits qui abolit la fixation de nos anticorps sur cette lignée THP1 (**Fig. 27**).

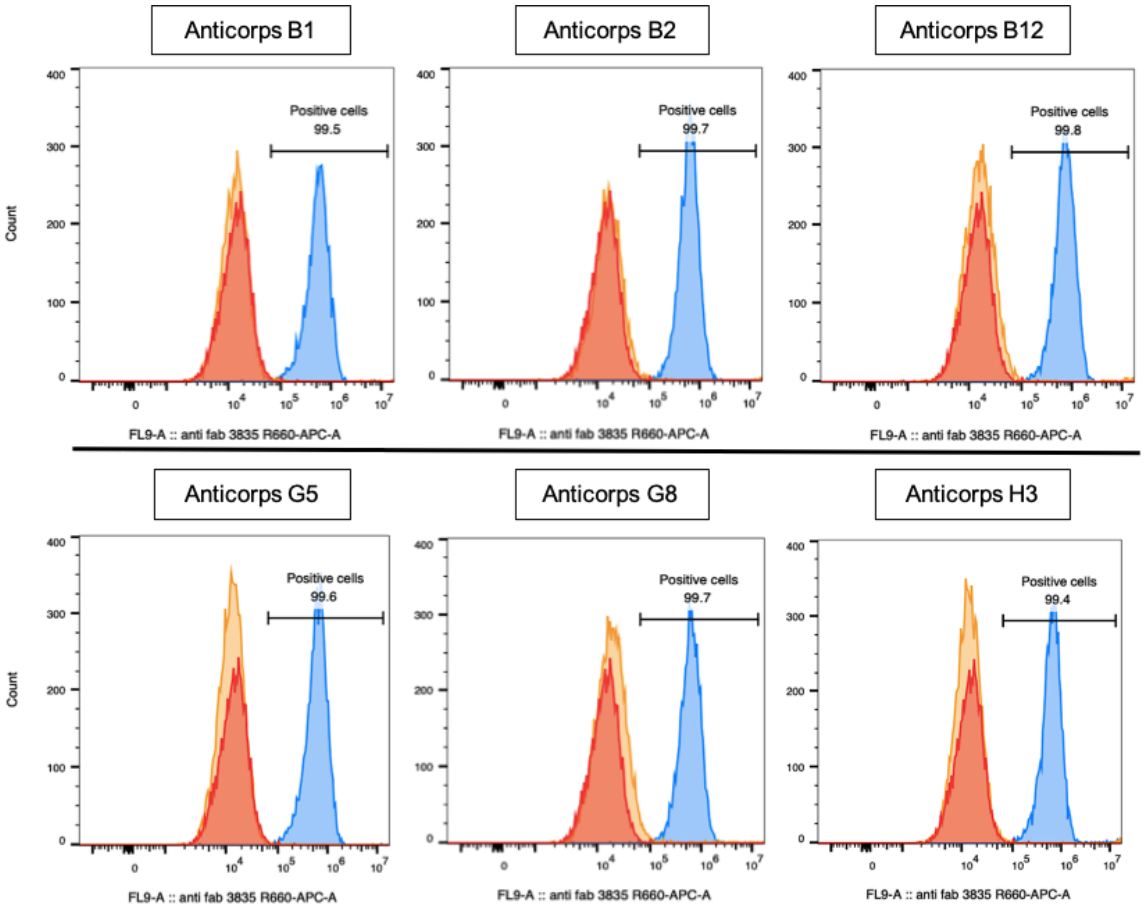


Figure 27 : Évaluation de la fixation des anticorps Fc WT (bleu), Fc muté LALAPG (orange) sur la lignée THP1. Le contrôle négatif est représenté en rouge avec le secondaire seul (anti huFab 3835).

3.4. Cytométrie des anticorps anti hEGFR

Nous avons évalué par FACS la fixation de nos anticorps sur chaque lignée cellulaire tumorale à pH physiologique (7,4). Le Cetuximab a été utilisé comme contrôle positif. Cette analyse par cytométrie est évaluée à l'aide d'un anticorps secondaire anti huFab (CSA 3835 – Thermo Fisher) marqué (Alexa Fluor 647) qui ne fournit aucun signal sur les lignées en absence de nos anticorps primaires (**Fig. 28**).

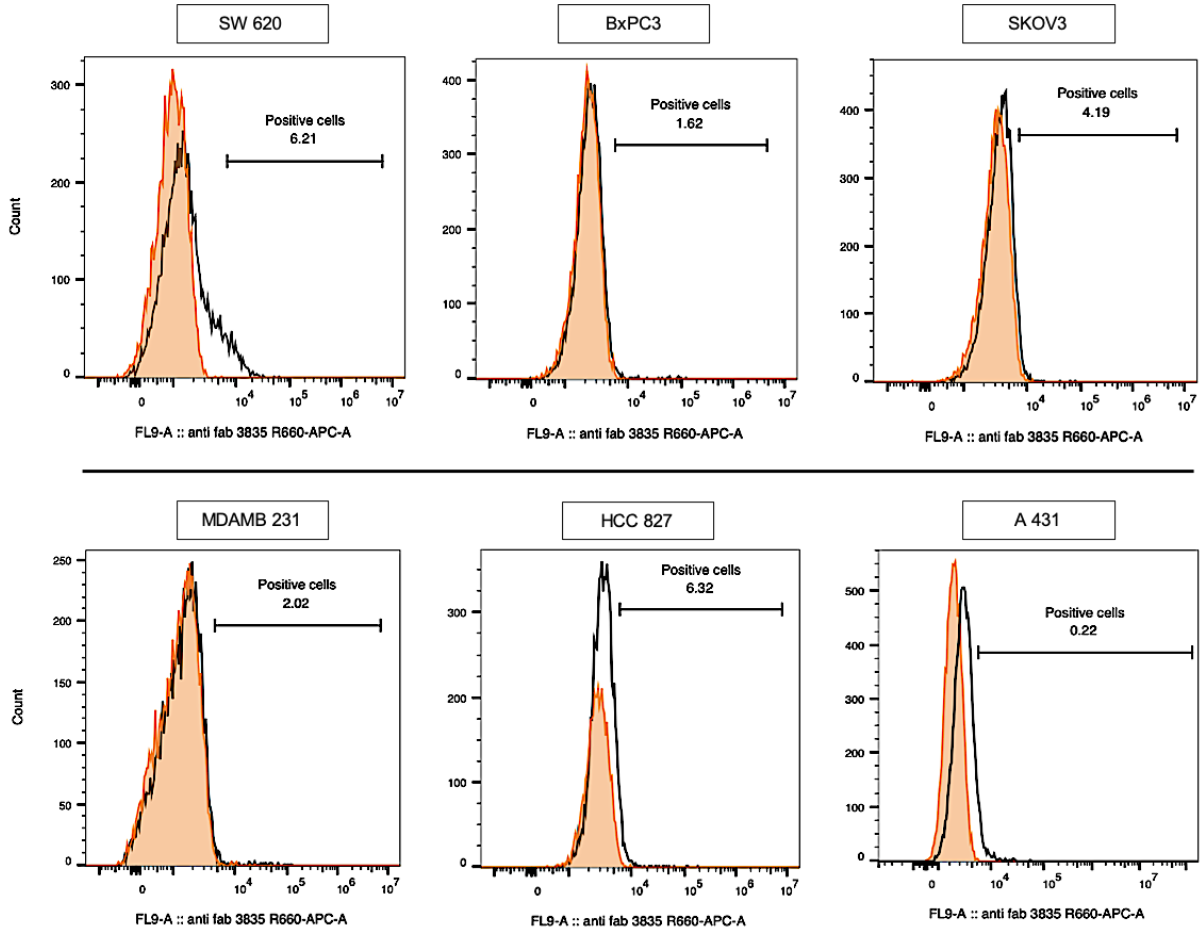


Figure 28 : Évaluation des cellules seules (orange) et de l'anticorps secondaire seul 3835 (blanc et noir) sur les six lignées étudiées dans l'ordre croissant du nombre de récepteurs hEGFR.

Nos anticorps IgG1 Fc muté LALAPG (**Fig. 29** colonne) sont testés séparément sur nos lignées (**Fig. 29** ligne) à pH physiologique (7,4). La première observation que l'on peut mettre en avant ici est qu'aucun de nos anticorps ni même l'anticorps de contrôle (Cetuximab) n'ont la capacité de se fixer sur la lignée SW620 que nous avions définie comme la lignée négative. Nous avons donc en notre possession une lignée jouant bien le rôle de témoin négatif. On retrouve ensuite toutes les caractéristiques précédentes concernant l'affinité propre de tous nos anticorps. En effet, l'anticorps de très faible affinité B12 ne se fixe sur aucune des lignées (**Fig. 29**) et très légèrement contre la lignée A431 d'expression très forte pour EGFR humain (**Fig. 30**). Son affinité à pH physiologique est trop faible

pour se fixer fortement même sur une lignée exprimant un grand nombre de récepteurs. Cet anticorps semble donc promis à un arrêt d'étude à ce stade car il n'aura aucune activité *in vivo* étant donné son incapacité de fixation. Les anticorps d'affinité moyenne, B1 et B2, sont capables de se fixer sur les lignées qui expriment fortement la cible (HCC827 et A431) (**Fig. 29 ; 30**). B2 se fixe également sur les trois lignées qui détiennent un nombre moyen de récepteurs équivalent au tissu sain (**Fig. 29**). A l'inverse, B1 perd sa capacité de fixation sur les lignées d'expression moyenne d'EGFR humain de par sa plus faible affinité. Il semblerait donc que B1 soit en capacité de se fixer sur un tissu tumoral exprimant fortement hEGFR mais d'épargner un tissu sain exprimant de façon modérée cette même cible (**Fig. 29**). Les trois anticorps de forte affinité G5, G8 et H3 ont une capacité de fixation qui se rapproche d'un anticorps de très forte affinité comme le Cetuximab. En effet, ils sont capables de se fixer à la fois sur les lignées qui expriment moyennement et fortement la cible hEGFR (**Fig. 29 ; 30**).

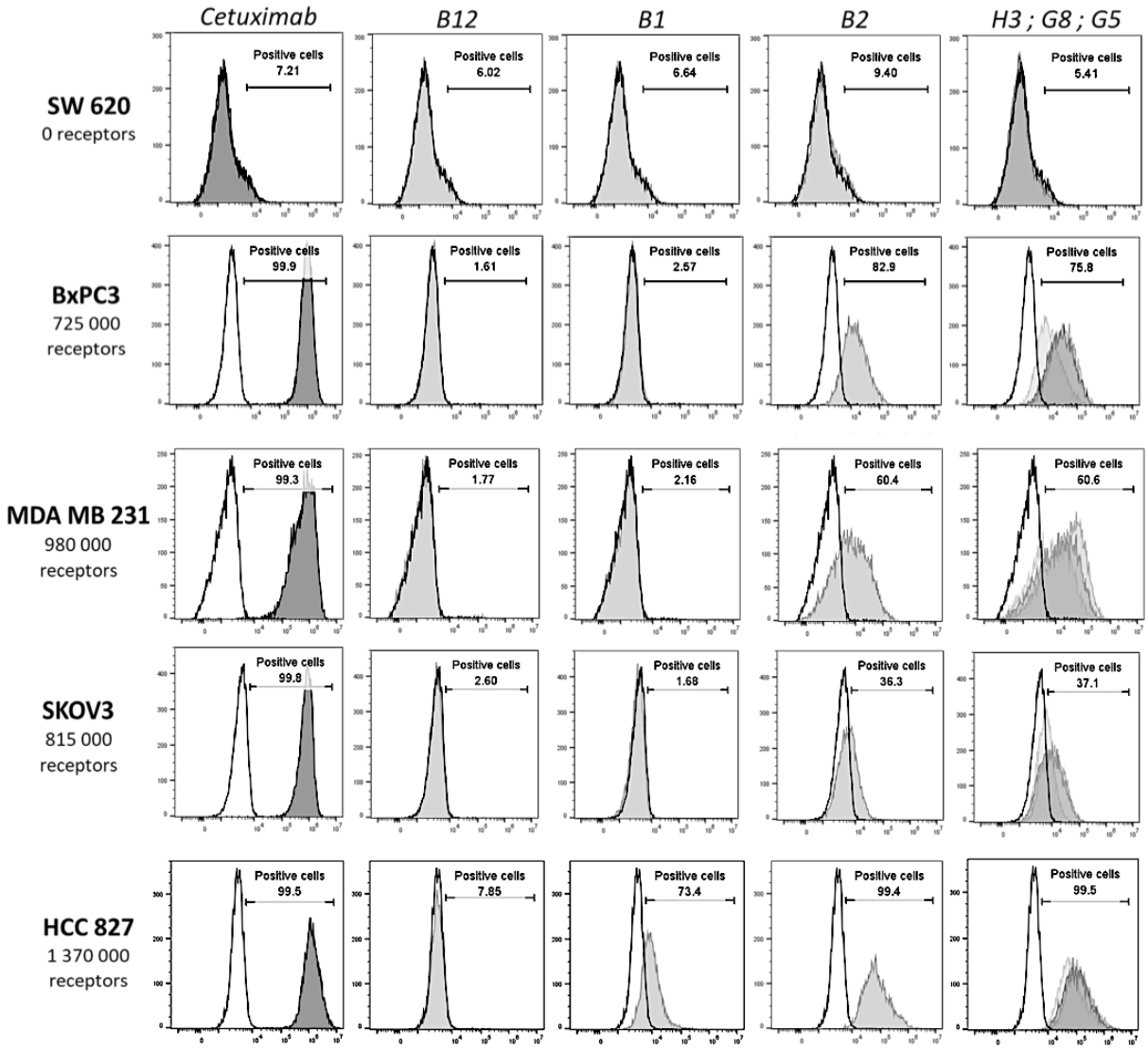


Figure 29 : Évaluation globale de la fixation des anticorps au format LALAPG sur les cinq lignées étudiées à pH physiologique (7,4). L'anticorps secondaire seul (anti hu Fab 3835) est représenté en blanc tandis que le Cetuximab est représenté en gris foncé. Tous nos anticorps sont représentés en gris clair. L'axe des ordonnées correspond au nombre d'évènements de fluorescence et l'axe des abscisses à l'intensité de fluorescence.

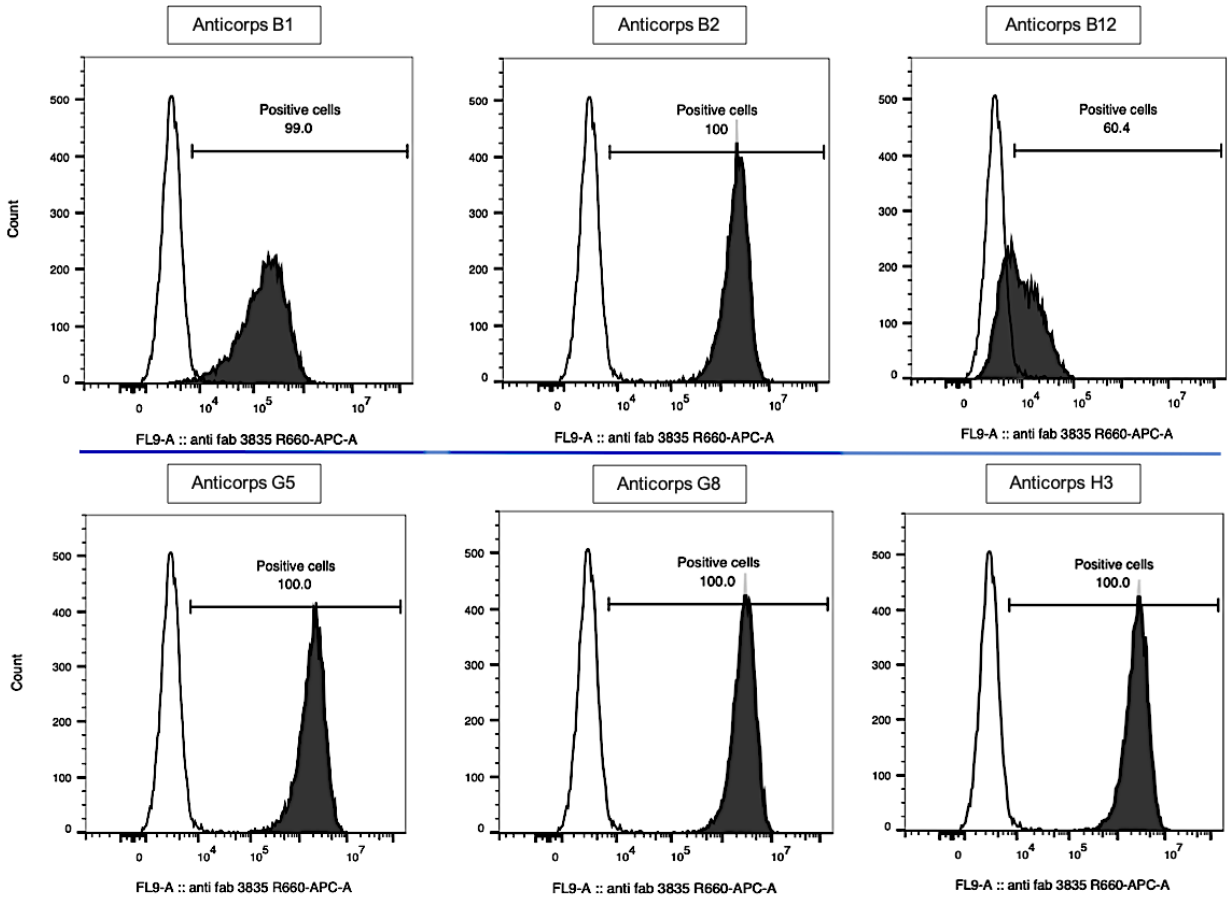


Figure 30 : Évaluation de la fixation de nos six anticorps sur la lignée A431 à pH physiologique (7,4) à l'aide d'un anticorps secondaire anti hu Fab 3835. Nos anticorps sont représentés en noir tandis que l'anticorps secondaire seul (3835) est représenté en blanc.

Les anticorps les plus prometteurs semblent être ceux de moyenne affinité B1 et B2. Nous avons donc voulu nous rendre compte si des conditions acides (pH = 6) pouvaient permettre une fixation facilitée de ces anticorps sur nos lignées cellulaires à l'aide du Tampon phosphate. Nous avons donc effectué la même démarche que précédemment avec nos anticorps B1, B2 à pH acide. Nous avons également inclus l'anticorps de très faible affinité B12 afin d'observer si sa capacité de fixation peut être récupérée sur nos lignées à pH acide. Nous avons gardé le Cetuximab comme anticorps de contrôle positif qui n'a pas de capacité de pH dépendance. La lignée SW620 est toujours un bon modèle de lignée négative pour la cible hEGFR puisqu'aucun des anticorps n'est en capacité de s'y fixer et ce même à pH acide. On remarque que la fixation du Cetuximab n'est en rien modifiée entre les conditions physiologique (pH 7,4) ou acide (pH 6) sur aucune des cinq lignées (**Fig. 31**). L'anticorps B12 semble retrouver, à pH acide, une capacité de fixation sur les lignées de forte expression d'EGFR humain étudiée ici HCC827 et A431 (**Fig. 31 ; 32**). L'anticorps d'affinité moyenne B1 retrouve une capacité de fixation sur les lignées d'expression moyenne d'EGFR humain MDAMB231, SKOV3 et BxPC3 en condition acide (**Fig. 31 ; 32**). Sa fixation sur les lignées de forte expression d'EGFR humain HCC827

et A431 est maintenue voir même renforcée en condition acide (**Fig. 31 ; 32**). Le second anticorps d'affinité moyenne B2 garde lui ses capacités de fixation sur les lignées d'expression moyenne et forte de la cible hEGFR à pH acide (**Fig. 31 ; 32**).

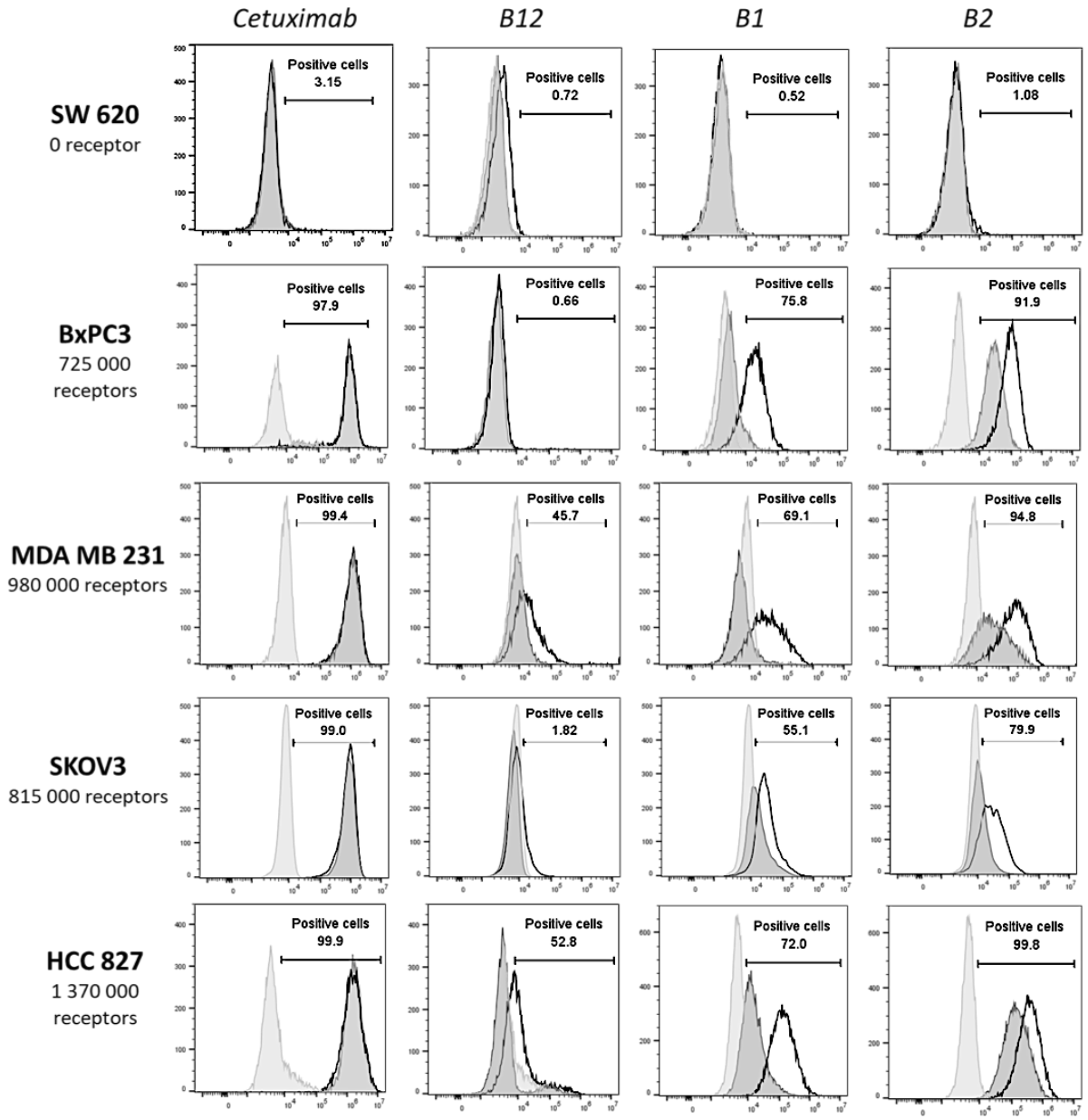


Figure 31 : Évaluation globale de la fixation des anticorps au format LALAPG sur les cinq lignées étudiées à pH acide. L'anticorps secondaire seul est représenté en gris clair tandis que les anticorps à l'étude sont représentés en gris foncé à pH physiologique (7,4) et en blanc à pH acide (6). L'axe des ordonnées correspond au nombre d'évènements de fluorescence et l'axe des abscisses à l'intensité de fluorescence

Outre nos anticorps B1, B2 et B12 déjà énoncés plus haut, nos anticorps de forte affinité G5, G8 et H3 ont également été testés à pH acide sur la lignée d'expression forte de la cible hEGFR A431

(**Fig. 32**). La fixation est très aisée sur cette lignée pour ces trois anticorps de forte affinité que ce soit à pH physiologique (7,4) ou à pH acide (6) (**Fig. 32**).

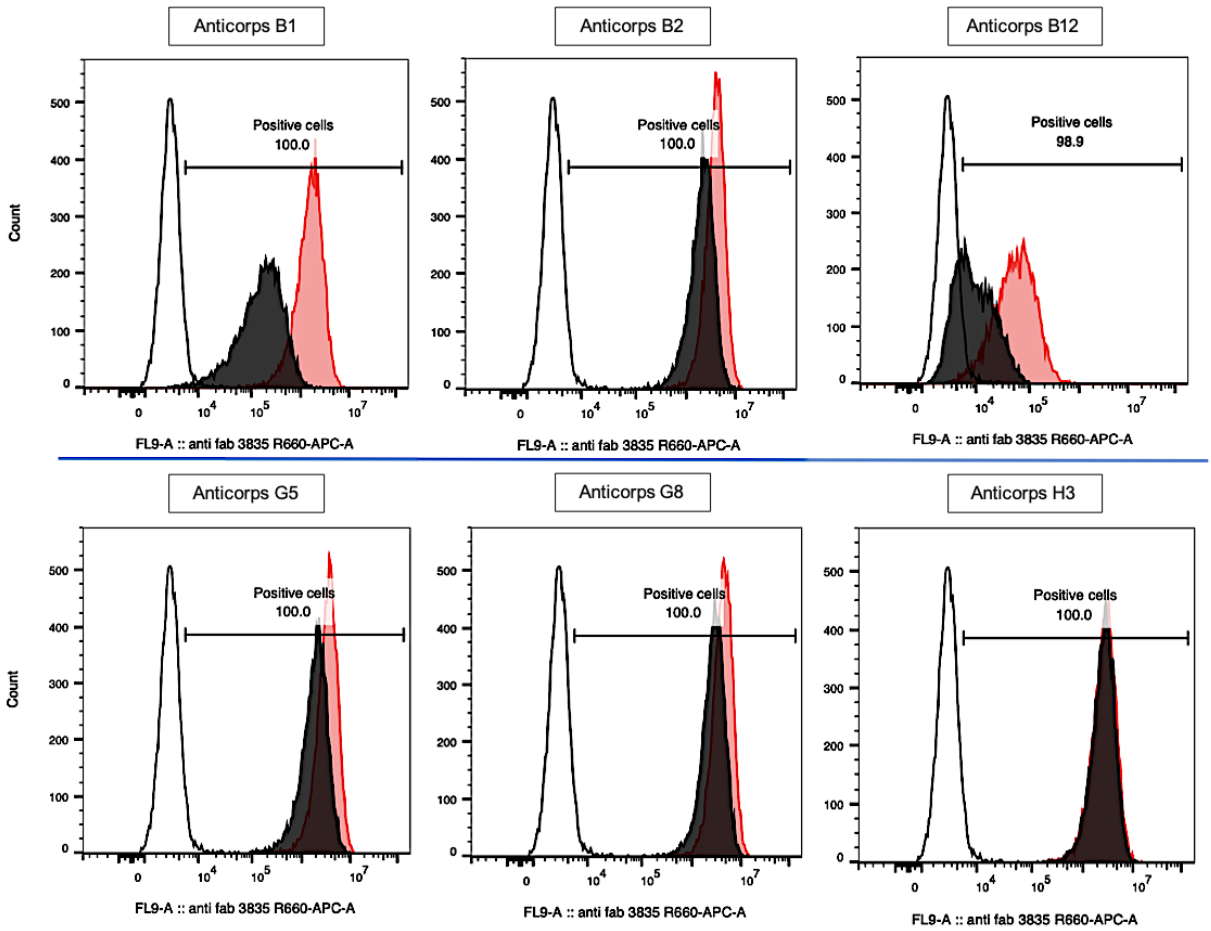


Figure 32 : Évaluation de la fixation de nos six anticorps sur la lignée A431 à pH physiologique (noir) et à pH acide (rouge). L'anticorps secondaire seul (anti hu Fab3835) est représenté en blanc.

La validation *in cellulo* de nos anticorps a confirmé les premiers résultats *in vitro*. En effet, nos anticorps de forte affinité (G5, G8 et H3) ont tendance à se comporter comme les anticorps de contrôle. Notre anticorps de faible affinité (B12) se fixe, bien que difficilement, en condition acide sur les lignées HCC827 et A431 d'expression très forte d'EGFR humain mais pas sur les lignées d'expression moyenne d'EGFR humain. Nos anticorps d'affinité moyenne (B1 et B2) se fixent aux deux pH (7,4 et 6) sur les lignées d'expression forte d'EGFR humain mais uniquement à pH acide (6) sur les lignées d'expression moyenne d'EGFR humain. Ces derniers anticorps pourraient donc être en mesure de cibler du tissu tumoral tout en épargnant un tissu sain exprimant de façon basale la même cible. Nous avons donc confirmé tous ces résultats *in vitro* et *in cellulo*. Nous avons voulu compléter ces résultats par des études *in vitro* complémentaires et des études *in vivo* dans des modèles murins xénogreffés par deux lignées cellulaires tumorales (MDAMB 231 et A 431).

4. Tests complémentaires des anticorps produits

4.1. Fixation/Internalisation des anticorps

4.1.1. Principe de l'étude

Nous avons voulu étudier l'internalisation de nos anticorps sur nos lignées cellulaires tumorales humaines d'un niveau différent d'expression d'hEGFR. Nous avons donc incubé nos anticorps à différentes concentrations d'intérêt sur les différentes lignées cellulaires (HCC 827, MDAMB 231, SW 620). Ces lignées ont été choisies pour avoir un nombre de récepteurs humain à l'EGF négatif (SW 620), médian (MDAMB 231) et élevé (HCC 827). Nous avons ensuite récolté le surnageant à différents temps (1min, 4h, 24h, 48h) afin de quantifier par ELISA (sur protéine recombinante hEGFR-Fc et à l'aide de l'anticorps secondaire anti huFab (A0293)) le résiduel d'anticorps dans le surnageant et d'en déduire ce qui a été fixé et/ou internalisé.

4.1.2. Résultats préliminaires

Dans un premier temps, nous avons voulu valider cette étude avec nos deux anticorps de contrôle Cetuximab et Panitumumab de très forte affinité pour la cible hEGFR (de l'ordre du nM ou subnM). Nos anticorps de contrôle ont été incubés au temps t=0 à la concentration de 0,05µg/mL dans le milieu de culture adéquat (DMEM ou RPMI). Après la récolte du surnageant aux différents temps, la quantification des anticorps par ELISA, on remarque que la captation est nulle pour la lignée SW 620 négative pour hEGFR (100% d'anticorps toujours présent dans le surnageant même à 48h). A l'inverse, la fixation et/ou internalisation est très important sur les deux lignées d'expression moyenne et forte d'hEGFR (MDAMB 231 et HCC 827) et ce pour les deux anticorps de contrôle. On retrouve à 4h environ 20% de fixation/internalisation des deux anticorps Cetuximab et Panitumumab avec des résultats significatifs sauf pour le Cetuximab sur la lignée MDAMB 231 (**Fig. 33**). Pour le Cetuximab, à 24h, nous obtenons une fixation/internalisation de 50% sur la lignée d'expression moyenne d'hEGFR MDAMB 231 et de plus de 80% sur la lignée d'expression forte d'hEGFR HCC 827 avec des résultats très significatifs (**Fig. 33 (A)**). A 48h, le Cetuximab a été fixé/internalisé à plus de 70% et 90% respectivement pour les lignées MDAMB 231 et HCC 827 avec des résultats très significatifs (**Fig. 33 (A)**). A 24h et 48h nous avons environ 60-70% de fixation/internalisation de l'anticorps Panitumumab sur les deux lignées avec des résultats très significatifs (**Fig. 33 (B)**).

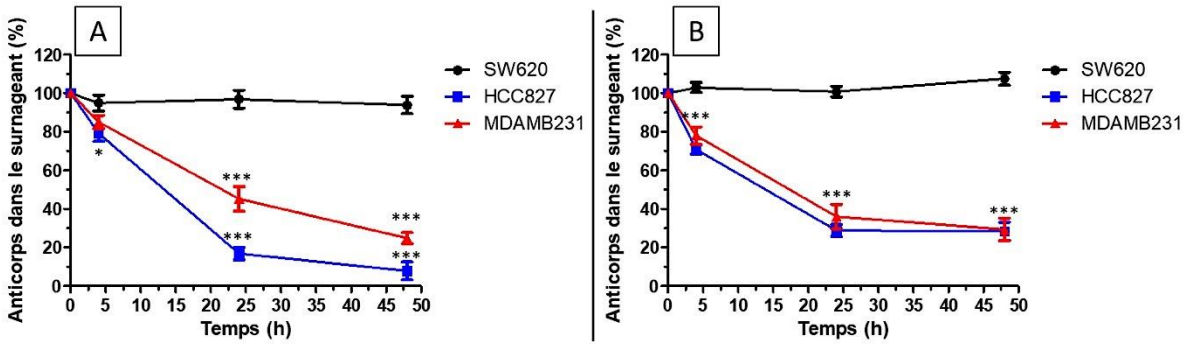


*Figure 33 : Test de fixation/internalisation pour le Cetuximab (A) et le Panitumumab (B) sur trois lignées SW 620, MDAMB 231 et HCC 827 respectivement d'expression nulle, moyenne et forte pour hEGFR. Les tests statistiques sont effectués par rapport à la lignée SW 620 par ANOVA. * = P-value < 0,05 ; *** = P-value < 0,001.*

La même procédure a été mise en place pour nos anticorps en adaptant les concentrations (0,05 ; 0,5 ; 1,25 ; 5µg/mL) pour obtenir un signal exploitable en ELISA. Malheureusement, nous devons également faire attention de ne pas trop surcharger les puits pour ne pas saturer les récepteurs au risque de ne pas pouvoir constater la fixation/internalisation. Nos résultats n'ont pas été ceux espérés car nous nous sommes confrontés aux deux problématiques précédemment citées. En effet, un signal positif saturant et constant en ELISA a été observé lorsqu'une haute concentration a été introduite dans les puits car les récepteurs ont été saturés. A l'inverse, un signal négatif en ELISA ne permettait pas d'extraire des données lorsque nous avons utilisé des concentrations non saturantes dans nos puits. Une méthode plus sensible que l'ELISA (HTRF) a été également testée sans réussite.

Nous avons obtenu les résultats escomptés pour les anticorps de contrôles mais pas pour nos anticorps d'études. Une autre étude approfondie semble nécessaire ou bien une étude par une méthode différente (microscopie).

4.2. HEK-FcTM pour modèle cellulaire d'expression de mEGFR

4.2.1. Mise au point du modèle

L'idée ici est d'obtenir une lignée cellulaire qui exprime l'EGFR murin à sa surface car nous ne détenons pas de lignée cellulaire exprimant mEGFR. En effet, certains de nos anticorps sont cross réactant EGFR humain et murin (B2, G8, H3). Cela est rendu possible grâce à la sélection par phage display sur les deux cibles hEGFR et mEGFR. Nous avons étudié la capacité de fixation de nos anticorps sur le récepteur murin à l'EGF par ELISA classique à différentes concentrations sur la protéine mEGFR-Fc (R&D system) (**Fig. 34**).

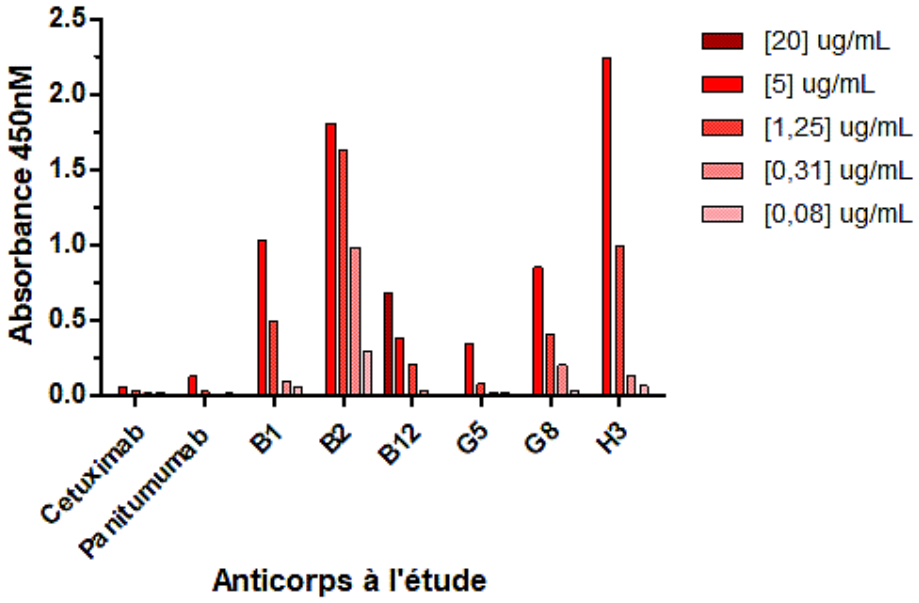


Figure 34 : ELISA sur la protéine mEGFR pour nos six anticorps d'études et nos deux anticorps de contrôle à différentes concentrations à l'aide de l'anticorps secondaire anti huFab (A0293).

Cette capacité de fixation sur l'EGFR murin pourrait permettre d'étudier le comportement de nos anticorps *in vivo* sur un modèle de souris syngénique exprimant des tumeurs mEGFR positives tout comme les tissus sains de la même souris. Il serait aisé d'étudier par la suite la répartition de nos anticorps entre le tissu tumoral et le tissu sain dans ce type de modèle décrit ci-dessous (**Fig. 35**) :

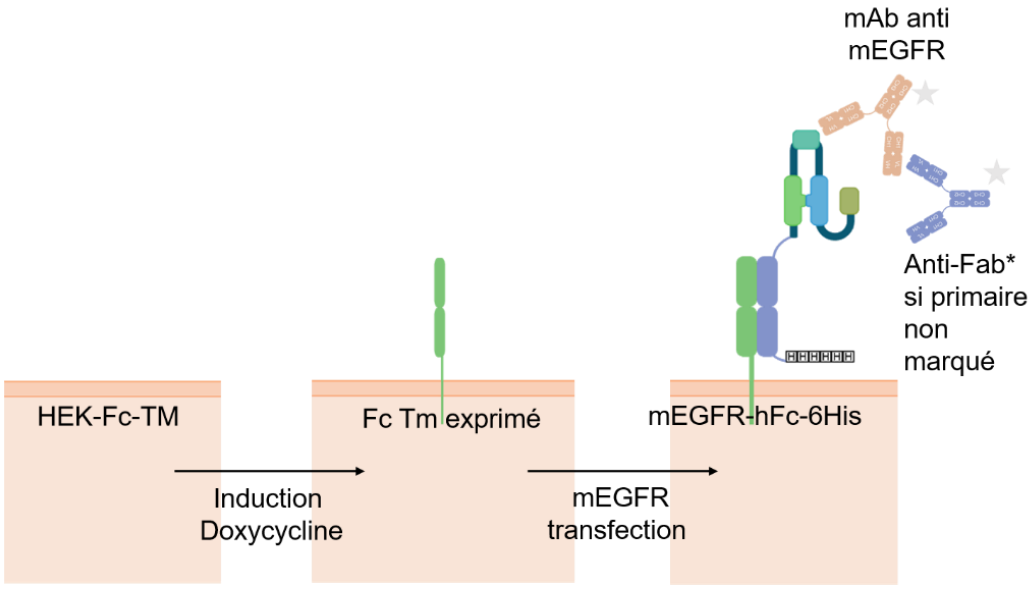


Figure 35 : Schéma explicatif de l'expression transmembranaire induite par la doxycycline du Fc couplé au domaine extracellulaire de l'EGFR murin sur la lignée stable HEK-FcTM. Un anticorps primaire marqué ne nécessite pas d'anticorps secondaire marqué mais si l'anticorps primaire n'est pas marqué, l'anticorps secondaire marqué est indispensable.

4.2.2.Validation du modèle

La première étape est la vérification de la bonne induction de nos cellules HEK-FcTM par la doxycycline. Cette induction doit déboucher sur une expression transmembranaire d'un fragment Fc et ce dans la lignée HEK-FcTM transfectée ou non. Nous avons pour cela utilisé un anticorps anti-Fc détecté par un anticorps secondaire fluorescent. L'induction à la doxycycline permet bien une expression transmembranaire d'un fragment Fc (**Fig. 36**).

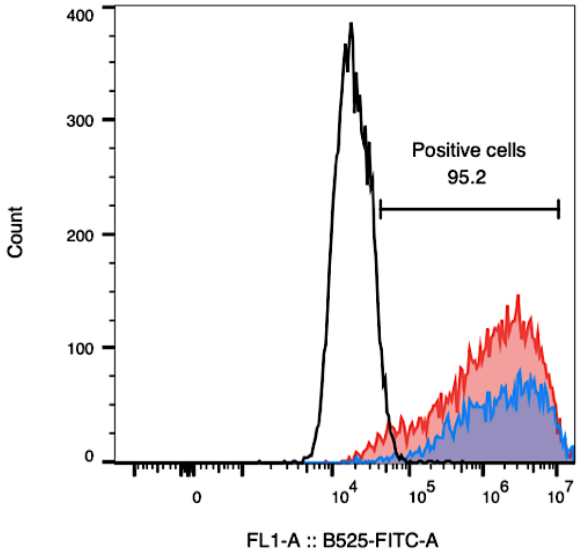


Figure 36 : Validation de l'induction du Fc transmembranaire par la doxycycline sur la lignée HEK-FcTM par un anticorps secondaire anti Fc 3236. Nous avons l'anticorps 3236 sur les HEK-FcTM non induites WT (blanc et noir), l'anticorps 3236 sur les HEK-FcTM induites (bleu) et enfin l'anticorps 3236 sur les HEK-FcTM transfectées par le vecteur mEGFR-pEF-huFc-6His (rouge).

Nous avons transfecté cette lignée avec notre vecteur mEGFR-pEF-huFc-6His. Afin de vérifier la viabilité de notre système, nous avons étudié le Cetuximab qui doit nous servir de contrôle négatif car il n'est pas capable de se fixer sur l'EGFR murin (**Fig. 34**). Malheureusement, nous pouvons voir que le Cetuximab est capable de se fixer sur les HEK-FcTM et ce même sans expression en transmembranaire du fragment Fc et/ou du vecteur mEGFR-pEF-huFc-6His (**Fig. 37**). Nous avons donc un modèle qui semble exprimer à l'état basal l'EGFR humain pour permettre la fixation du Cetuximab et il nous sera donc impossible de nous rendre compte si la fixation de nos anticorps sera due à la fixation sur l'EGFR murin transfecté ou sur l'EGFR humain présent à l'état basal. En effet, certains de nos anticorps, qui auraient pu avoir l'intérêt d'être cross réactants EGFR humain et murin (B2, G8, H3), ne pourront pas être étudiés *in cellulo* via ce modèle.

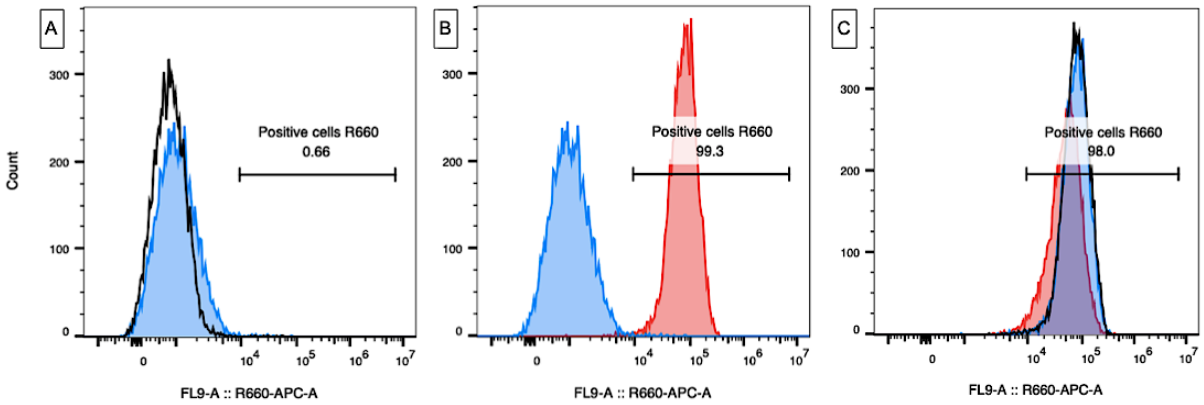


Figure 37 : Évaluation de la fixation du Cetuximab par un anticorps secondaire anti huFab 3835 sur les HEK-FcTM transfectées par le vecteur mEGFR-huFc-6His et induites par la doxycycline. L'anticorps secondaire seul est bien négatif en cytométrie sur la lignée non induite (blanc et noir) ou induite (bleu) (A). Sur la lignée induite, l'anticorps seul est négatif (bleu) et le Cetuximab est positif (rouge) (B). Le Cetuximab est positif que ce soit sur la lignée non induite (blanc), induite (bleu) et induite transfectée (rouge) (C).

Nous avons mis au point un modèle HEK-FcTM qui exprime le fragment Fc en transmembranaire par induction à la doxycycline. Cependant, ce modèle ne semble pas adapté pour l'expression de l'EGFR murin en transmembranaire du fait de l'expression basale de l'EGFR humain sur ces lignées. Une recherche approfondie d'une lignée mEGFR positive ou d'un autre modèle d'étude semble nécessaire pour étudier plus précisément la fixation d'anticorps sur l'EGFR murin.

5. Études *in vivo* de la fixation et diffusion de nos anticorps anti EGFR

5.1. Modèle d'étude

5.1.1. Choix des lignées cellulaires et du modèle murin

Nous avons entrepris une première étude *in vivo* sur un modèle de souris greffés par deux lignées cellulaire tumorales humaines choisies. Nous avons décidé de greffer des souris swiss nude (Charles River) de sept semaines sur chaque flan avec deux lignées distinctes. Ces lignées doivent permettre de mimer un tissu tumoral exprimant fortement la cible hEGFR sur un flan et un tissu sain exprimant moyennement la cible hEGFR sur l'autre flan. Nous nous sommes basés sur nos résultats précédents pour choisir la lignée A 431 comme lignée tumorale de très forte expression pour EGFR humain et MDAMB 231 comme lignée tumorale mimant le tissu via un niveau moyen d'expression de cette même cible. Nous nous sommes également basés sur nos expériences *in vivo* au sein de l'équipe et de l'institut pour choisir ces deux lignées (culture cellulaire et prise de greffe facilités par rapport à d'autres lignées). Les greffes ont eu lieu en différé car la pousse est plus rapide pour la lignée A 431 (données internes). Nous avons injecté respectivement 1 et 3.10^6 de cellules A 431 et MDAMB 231 sur chaque flan en sous-cutané. Les groupes ont été ensuite constitués de façon la plus homogène possible en fonction des prises de greffe (volume tumoral).

5.1.2. Choix des anticorps à injecter

En se basant sur nos précédents résultats *in vitro*, nous avons décidé d'injecter 300µg d'anticorps par souris (posologie de 15mg/kg pour une souris de 20g) en intra péritonéal (IP). Cette dose nous permet de se rapprocher des doses thérapeutiques chez l'homme, de saturer tous les sites de liaison de l'anticorps et ainsi de mieux appréhender la pénétration intra tumorale. Les anticorps sélectionnés sont le Cetuximab (Fc-WT), le Panitumumab (Fc-LALAPG) pour les anticorps de contrôle positif et le 13R4a (anticorps anti β galactosidase bactérienne) pour l'anticorps de contrôle négatif. Concernant nos anticorps d'études, nous avons sélectionné nos deux anticorps d'affinités moyennes B1 et B2 ainsi que deux de nos trois anticorps de fortes affinités G5 et H3 (Fc-LALAPG pour les quatre). L'anticorps de faible affinité B12 n'a pas été sélectionné.

Nous avons pu inclure trois souris avec une double prise de greffe par anticorps d'étude (trois tumeurs MDAMB 231 et A 431 pour chaque anticorps). Concernant les anticorps de contrôle, nous n'avons pas eu assez de succès en double prise de greffe pour pouvoir affilier trois souris par groupe. Nous avons réparti les groupes comme ceci : Cetuximab avec une tumeur MDAMB 231 et deux tumeurs A 431 ; Panitumumab avec une tumeur MDAMB 231 et trois tumeurs A 431 ; 13R4a avec trois tumeurs pour MDAMB 231 et trois tumeurs pour A 431 (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des tumeurs affiliées à chaque anticorps ainsi que de la posologie d'injection chez la souris.

	Nombre tumeurs MDAMB231	Nombre tumeurs A431	[C] injectée (mg/kg)
Cetuximab	1	2	15
Panitumumab	1	3	15
13R4a	3	3	15
B1	3	3	15
B2	3	3	15
G5	3	3	15
H3	3	3	15

5.2. Analyse en IHC des résultats

Nous avons récupéré les tumeurs à 96h puis la préparation des lames a été effectuée par le plateau d'immunohistochimie de l'institut (plateforme RHEM). Les deux tumeurs de la même souris ont été mises en place sur la même lame (multi-blocs/sériées) et quatre marquages ont été effectués par la plateforme : H&E ; CD31 ; anti EGFR et anti IgG humain. Nous avons quantifié le nombre cellules positives aux anticorps anti IgG humain après coloration au DAB et en se basant sur le marquage H&E et anti EGFR (DAB) pour sélectionner les zones à analyser (**Fig. 38**).

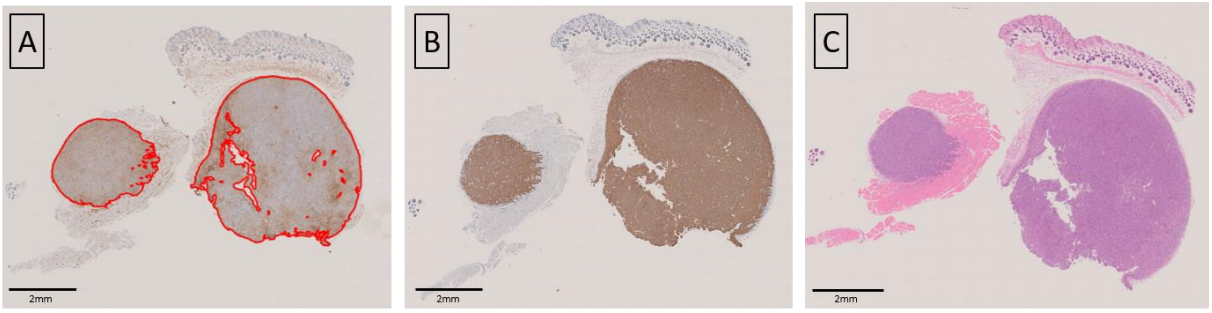


Figure 38 : Méthode d'analyse IHC de nos coupes avec comme exemple ici une tumeur MDAMB 231 post injection au Panitumumab. On quantifie notre anticorps sur le marquage anti IgG1 humain au DAB (A) en se basant sur le marquage anti EGFR au DAB (B) et le marquage H&E (C) pour choisir la zone d'analyse.

Notre quantification nous a permis de confirmer certains résultats *in vitro*. Il faut néanmoins garder en tête que nos anticorps de contrôle positif n'ont pas tous pu avoir de triplicat et que les résultats présentés ici sont à prendre comme des résultats préliminaires et à confirmer à plus grande échelle.

La quantification de nos anticorps de contrôle positif nous a permis de mettre en avant une forte fixation pour le Cetuximab et le Panitumumab sur la lignée MDAMB 231 par rapport au contrôle négatif 13R4a mais sans pouvoir effectuer un test statistique par manque de données. La fixation du

Cetuximab et du Panitumumab sur la lignée A 431 est, quant à elle, très significative. On obtient, respectivement pour le Cetuximab et le Panitumumab, une P-value < 0,05 et P-value < 0,001. Concernant nos anticorps étudiés B1, B2, G5 et H3, ils ont tous une fixation non significativement différente du contrôle négatif 13R4a sur la lignée MDAMB 231. Cela nous conforte dans l'idée que nos anticorps pourraient permettre d'éviter une fixation sur un tissu sain exprimant moyennement la cible hEGFR à l'inverse des anticorps de contrôle positif qui, eux, semblent se fixer sur cette même lignée. Sur la lignée d'expression forte de la cible hEGFR A 431, nos quatre anticorps étudiés ont une tendance de fixation supérieure à celle de l'anticorps contrôle négatif 13R4a même si seulement B2 et G5 nous délivrent un résultat significativement différent avec une P-value < 0,01 (**Fig. 39**). Nous avons également analysé la différence de fixation de nos quatre anticorps et du contrôle négatif 13R4a entre les deux lignées. On remarque que l'anticorps contrôle négatif se fixe de la même façon sur les deux lignées. Nos anticorps, eux, se fixent préférentiellement sur la lignée A 431 exprimant fortement la cible avec une tendance à la significativité pour B1 et H3 et une significativité pour B2 et G5. Les deux anticorps de contrôle positif Cetuximab et Panitumumab n'ont pas été comparé car nous n'avons qu'une valeur pour la lignée MDAMB 231. Les deux tests statistiques sont cohérents concernant les anticorps significatifs et ceux non significatifs (**Fig. 39**).

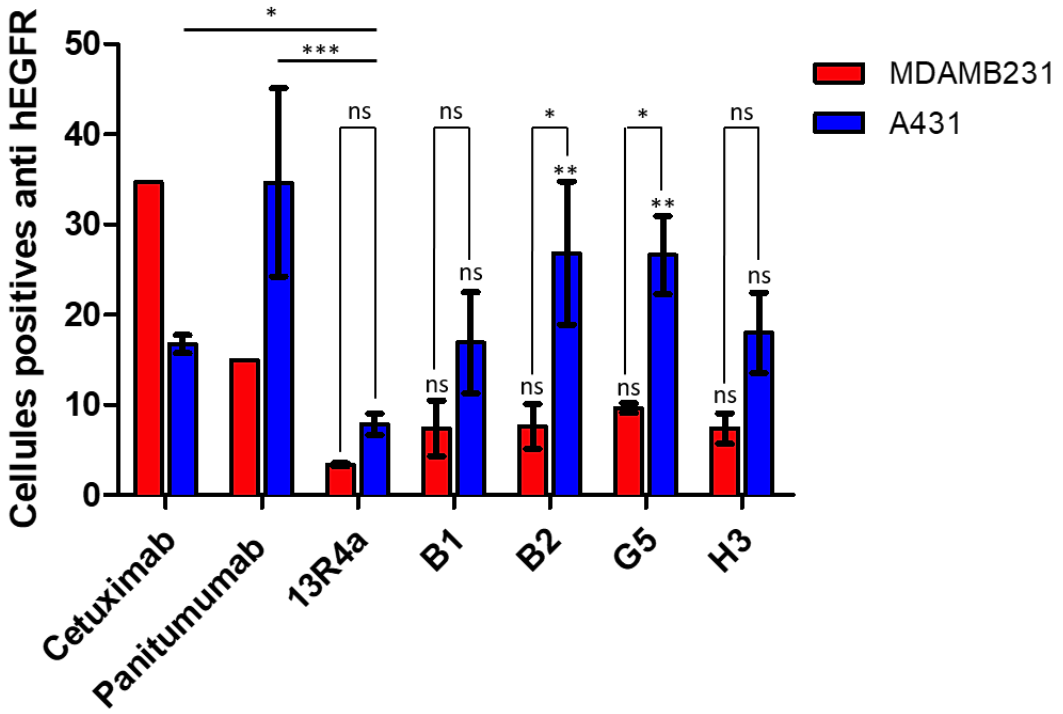


*Figure 39 : Quantification des anticorps au niveau tumoral sur les lignées A 431 (bleu) et MDAMB 231 (rouge) greffées chez la souris à 96h. Le test ANOVA de comparaison inter anticorps a été effectué systématiquement en comparaison avec l'anticorps 13R4a contrôle négatif pour les lignées cellulaires correspondantes. Le test ANOVA intra anticorps compare la fixation du même anticorps sur les deux lignées. La significativité est représentée par * < 0,05 ; ** < 0,01 ; *** < 0,001 ; ns = non significatif.*

Nous avons donc évalué et confirmé *in vivo* nos résultats *in vitro* qui consistent à mettre en avant le fait que nos anticorps d'affinité diminuée pourraient permettre un maintien de fixation et donc d'activité sur des lignées exprimant fortement la cible hEGFR (A431 = équivalent au tissu tumoral) tout en épargnant un tissu exprimant moyennement la cible hEGFR (MDAMB 231 = équivalent tissu sain) chez les patients. En effet, la différence significative pour B2 et G5 ainsi que la tendance à la significativité pour B1 et H3 est confirmé à la fois en comparaison à l'anticorps de contrôle négatif 13R4a sur chaque lignée et en comparaison entre les deux lignées pour le même anticorps. Ces résultats sont préliminaires et devraient être renforcés avec une étude *in vivo* complémentaire nous permettant d'étoffer nos tests statistiques.

6. TEP-TDM

6.1. Choix des lignées cellulaires et du modèle murin

Nous avons entrepris une seconde étude *in vivo* sur un modèle de souris greffés par deux lignées cellulaire tumorales humaines choisies. Nous avons décidé de greffer des souris athymic nude (Charles River) de quatre semaines sur chaque flan avec deux lignées distinctes. La procédure de greffe a été la même qu'à l'étude *in vivo* en IHC. Nous avons choisi la lignée A 431 comme lignée tumorale de très forte expression d'EGFR humain et MDAMB 231 comme lignée tumorale mimant le tissu via un niveau moyen d'expression de cette même cible. Ces lignées doivent permettre de mimer un tissu tumoral exprimant fortement la cible hEGFR sur un flan et un tissu sain exprimant moyennement la cible sur l'autre flan. Les greffes ont eu lieu en différé car la pousse est plus rapide pour la lignée A431. Nous avons injecté respectivement 1,5 et 5.10^6 de cellules A 431 et MDAMB 231 sur chaque flan en sous-cutané (**Fig. 40**). Les groupes ont été ensuite constitués de façon la plus homogène possible en fonction des prises de greffe (volume tumoral).

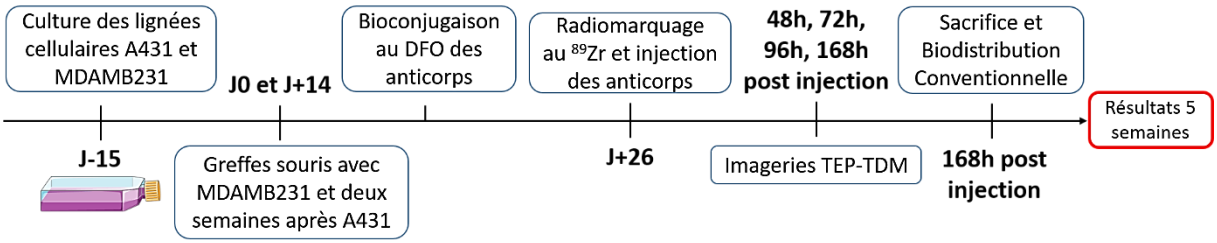


Figure 40: Echelle de temps de l'expérience in vivo TEP-TDM. Chaque étape est caractérisée par un temps en jour ou en heure. Cet échéancier est propre à cette expérience.

6.2. Choix des anticorps, bioconjugaison, radiomarquage et injection

Nous avons choisi les mêmes anticorps que pour l'étude *in vivo* en IHC à l'exception de H3 qui n'a pas été sélectionné ici car il est de forte affinité et non significatif dans nos résultats précédents *in vivo* IHC (**Fig. 39**). La bioconjugaison au DFO s'est déroulée par étapes successives aléatoirement sur les lysines libres des anticorps en condition alcaline (pH = 8). Nous avons vérifié par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) le taux de DFO moyen par anticorps post conjugaison (**Tableau 5**) en se basant sur le décalage des pics en spectrométrie de masse entre nos anticorps nus et nos anticorps bioconjugués au DFO (**Fig. 41**). La variabilité des ratios DFO/mAb est peut-être due à la variabilité de l'accessibilité des lysines des anticorps au chélateur (DFO). La fixation du DFO sur les lysines est non spécifique.

Tableau 5 : Résultats de la bioconjugaison de nos six anticorps avec le DFO. Les valeurs correspondent au pic du composé avec ou sans DFO en spectrométrie de masse. MM = masse molaire. Le ratio DFO/mAb est un ratio théorique du nombre de composé DFO par anticorps.

	Pré conj DFO	Post conj DFO	Différence	MM DFO	DFO/mAb
B1-2	146610	147285	675	752,9	**0,9**
B2-1	146539	148702	2163	752,9	**2,9**
G5-2	146440	147412	972	752,9	**1,3**
Panitumumab	146674	147584	910	752,9	**1,2**
Cetuximab	147315	149227	1912	752,9	**2,5**
13R4a	151878	152193	315	752,9	**0,4**

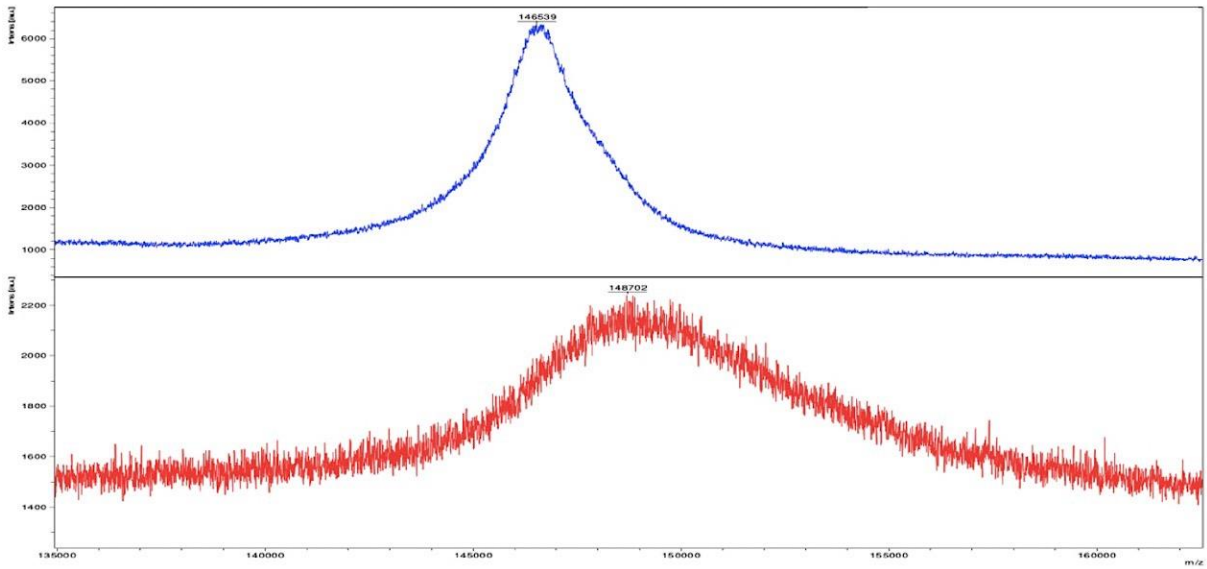


Figure 41 : Comparaison des deux résultats de la spectrométrie de masse de l'anticorps B2-1 non couplé au DFO (courbe bleue) et couplé au DFO (courbe rouge). L'axe des abscisses correspond au ratio masse/charge (m/z) et l'axe des ordonnées correspond à l'intensité du signal.

Nous avons également testé par ELISA, sur la protéine hEGFR-Fc avec l'anticorps secondaire anti huFab (A0293), les anticorps post conjugaison au DFO afin de vérifier si leurs caractéristiques de fixation n'ont pas été modifiées. On remarque que les anticorps de contrôle Cetuximab et Panitumumab ainsi que nos anticorps à l'étude B1, B2 et G5 n'ont pas été, ou que très peu, modifiés par la bioconjugaison au DFO (**Fig. 42**).

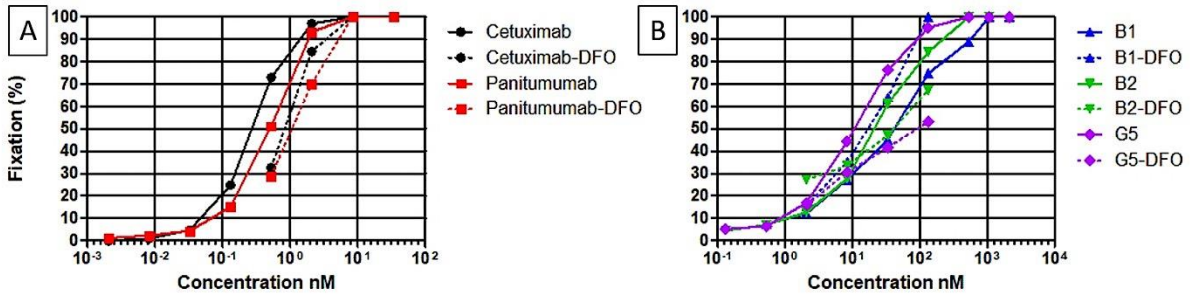


Figure 42 : Dose réponse de contrôle post bioconjugaison au DFO de tous nos anticorps avant l'imagerie PET. Nos anticorps nus sont en ligne pleine et ceux bioconjugués au DFO en ligne pointillée avec les anticorps de contrôle (A) et nos anticorps d'intérêts (B).

Cette bioconjugaison est suivie, le jour de l'injection, du radiomarquage de nos anticorps avec le radionucléide Zirconium 89 émetteur beta plus. Ce radionucléide a une demi-vie de 78,4h (3,27 jours) qui est adaptée à la pharmacocinétique d'un anticorps monoclonal *in vivo*. De plus, son taux d'émission de positon/désintégration lui permet de justifier son intérêt en imagerie TEP.

En se basant sur nos précédents résultats *in vitro* et en considérant la quantité d'anticorps disponible post bioconjugaison et radiomarquage, nous avons décidé d'injecter 200µg d'anticorps par souris (posologie de 10mg/kg pour une souris de 20g) en intra péritonéal (IP) avec une activité de 150µCi. Cette dose nous permet de nous rapprocher des doses thérapeutiques chez l'homme, de saturer tous les sites de liaison de l'anticorps et ainsi de mieux appréhender la fixation différentielle de nos anticorps sur les deux lignées greffées. Nous avons pu inclure trois ou quatre souris avec une double prise de greffe par anticorps d'étude (trois tumeurs MDAMB 231 et A 431 pour chaque anticorps) excepté pour le Cetuximab qui n'a malheureusement que deux souris (injection de l'anticorps surement dans l'intestin avec une perte de signal totale dès la première image à 48h).

6.3. Quantification par imagerie TEP-TDM

Nous avons imagé les souris au TEP-TDM à quatre différents temps 48h, 72h, 96h et 168h (Mediso NanoScan PET82S/CT80) (**Fig. 40**). L'analyse des images sur 3D Slicer (version 4.10.2) nous permet de quantifier le pourcentage d'activité injectée par volume tumoral (%IA/cm^3) afin de conclure sur la biodistribution longitudinale de nos anticorps au niveau tumoral, hépatique, cardiaque et musculaire. Nous avons pu avoir 3 souris pour chaque anticorps excepté pour le Cetuximab pour lequel nous n'avons que deux souris à l'analyse TEP-TDM.

Tout d'abord, nous pouvons remarquer sur les figures 43 et 44 de quantification par imagerie de nos anticorps que la biodistribution globale des anticorps au sein des deux tumeurs (MDAMB 231 en

rouge et A 431 en bleu) et du foie (en vert) est relativement constante dans le temps. Dans le même temps, au niveau cardiaque, nous observons une diminution de la quantification dans le temps de nos anticorps ce qui traduit une épuration progressive des anticorps injectés (**Fig. 43 ; 44(D)**). On remarque également une très faible biodistribution musculaire (pointillés gris) de nos anticorps (muscle de la cuisse) qui nous permet d'avoir un référentiel d'activité basale (**Fig. 43**).

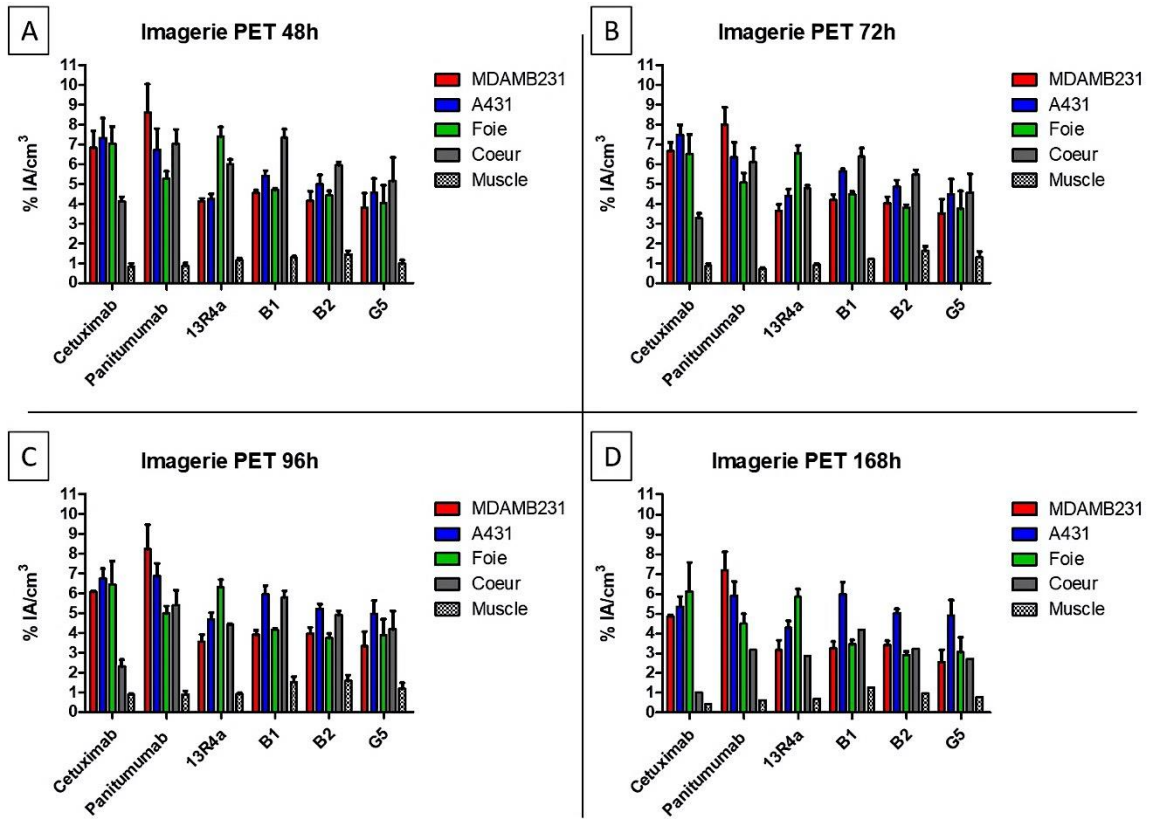


Figure 43 : Résultats de la quantification par imagerie TEP-TDM de la biodistribution de nos anticorps dans les deux tumeurs, le foie, le cœur et le muscle aux quatre temps d'analyse 48h (A), 72h (B), 96h (C) et 168h (D) exprimés en %IA/cm³.

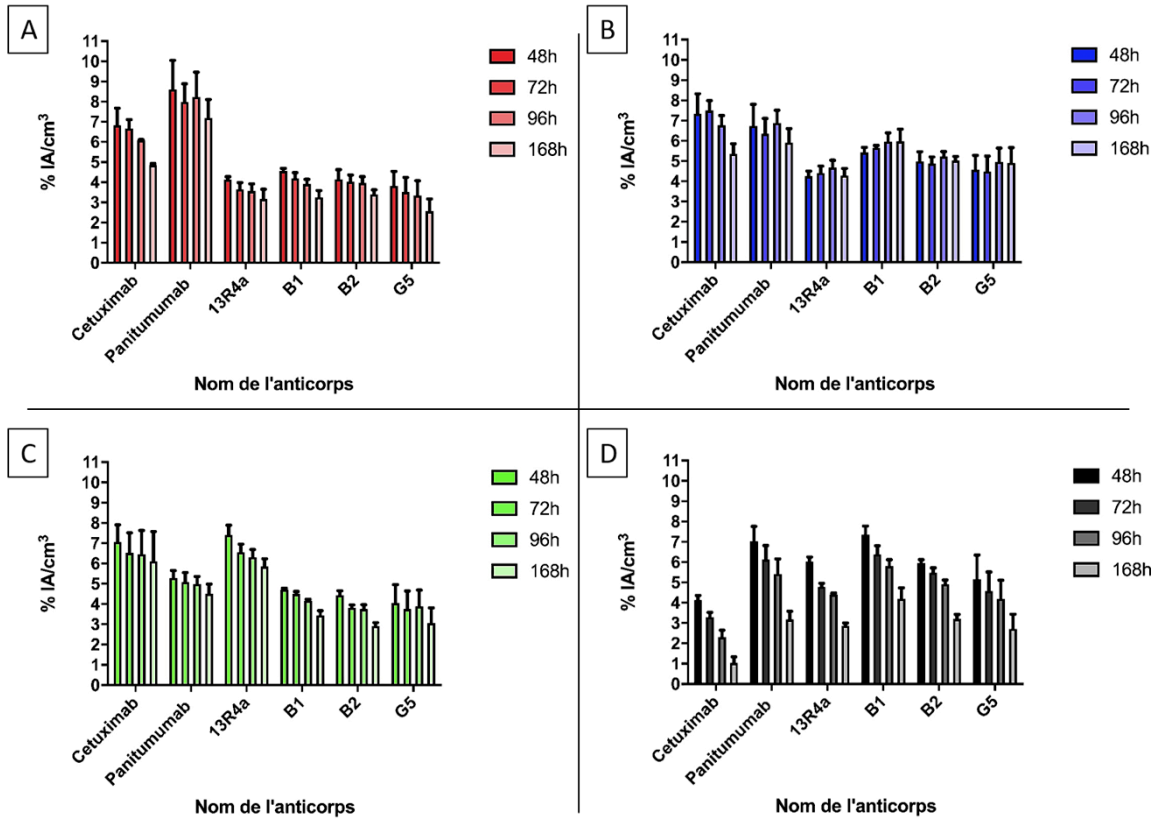


Figure 44: Résultats de la quantification par imagerie TEP-TDM de la biodistribution de nos anticorps selon le temps d'analyse sur MDAMB 231 (A) ; A 431 (B) ; foie (C) ; coeur (D) exprimés en %AI/cm³.

De plus, nous avons également quantifié, au temps 96h, la différence de fixation de nos anticorps par rapport aux anticorps de contrôle positif (Cetuximab et Panitumumab) sur chacune des deux lignées étudiées. Nous pouvons observer un résultat assez intéressant qui se traduit par une fixation significativement supérieure du Panitumumab et une tendance à la fixation supérieure du Cetuximab (malgré un test statistique non significatif) sur la lignée d'expression moyenne de la cible hEGFR MDAMB 231 par rapport à nos anticorps (**Fig. 45** en rouge). Dans le même temps, nos anticorps se fixent de manière équivalente aux deux anticorps contrôles Cetuximab et Panitumumab sur la lignée de forte expression d'hEGFR A 431 (**Fig. 45** en bleu). Nos anticorps semblent donc être en mesure de se fixer de manière équivalente à des anticorps de forte affinité sur une lignée exprimant fortement la cible (hEGFR) équivalent au tissu tumoral tout en se fixant bien moins sur une lignée exprimant moyennement la cible (hEGFR) équivalent au tissu sain chez le patient (**Fig. 45**).

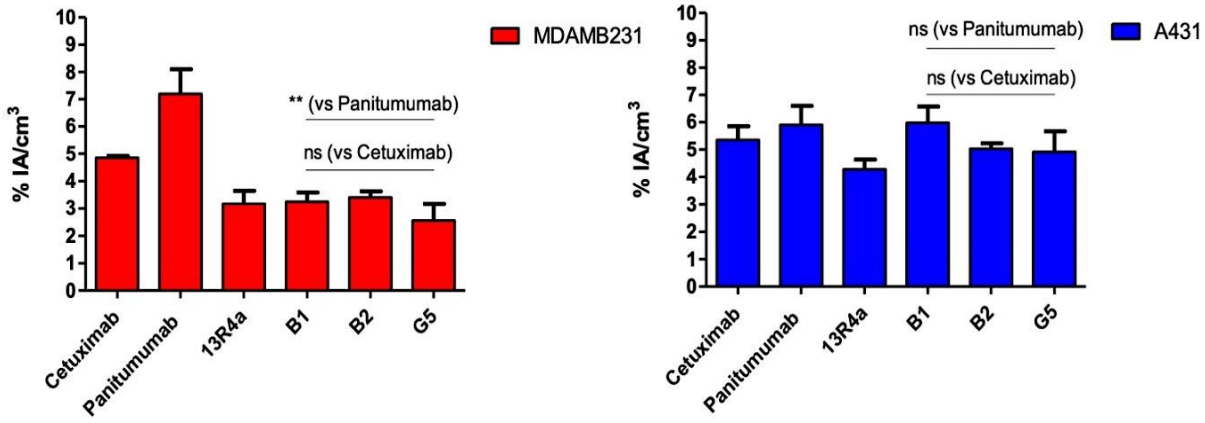


*Figure 45 : Résultats de la comparaison de nos trois anticorps à l'étude par rapport à nos deux anticorps de contrôle positif par quantification via imagerie TEP-TDM à 96h sur la lignée MDAMB 231 (en rouge à gauche) et A 431 (en bleu à droite). Un test 1way ANOVA a été effectué. La significativité est représentée par * < 0,05 ; ** < 0,01 ; *** < 0,001 ; ns = non significatif.*

Nous avons ensuite comparé la capacité de fixation de nos anticorps indépendamment sur chaque lignée à 168h. On remarque que les anticorps de contrôle positif (Cetuximab et Panitumumab) ainsi que celui de contrôle négatif (13R4a) se fixent de manière équivalente (test non significatif) sur les deux lignées d'expression moyenne et forte d'hEGFR. A l'inverse, nos anticorps ont tendance à se fixer préférentiellement sur la lignée d'expression forte d'hEGFR, la lignée A 431 en bleu, par rapport à la lignée d'expression moyenne MDAMB 231 en rouge. En effet, nous avons une différence significative pour les anticorps B1 et G5 et une tendance, néanmoins non significative, pour B2 quant au fait de se fixer préférentiellement sur la lignée de forte expression d'hEGFR (**Fig. 46**).

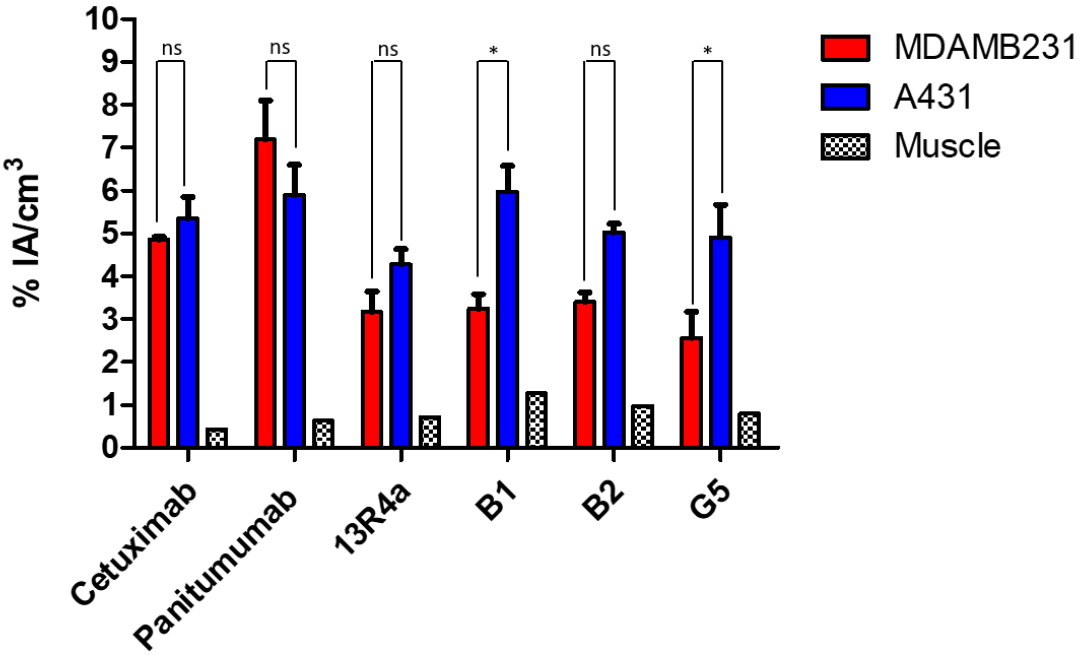


*Figure 46 : Quantification par imagerie TEP-TDM à 168h de la répartition entre les deux tumeurs (MDAMB 231 et A 431) ainsi que dans le muscle de nos anticorps. Un test 1way ANOVA a été effectué. La significativité est représentée par * < 0,05 ; ** < 0,01 ; *** < 0,001 ; ns = non significatif.*

Enfin, nous avons mis en avant certaines images issues de l'analyse au TEP-TDM à 168h pour corroborer les graphiques précédents (ces images sont celles ayant permis d'obtenir les figures 43, 44 et 46). Les différentes coupes nous permettent d'apprécier le ciblage tumoral de nos anticorps sous plusieurs vues. Nous pouvons voir sur la figure 47 ci-dessous les images de l'injection de l'anticorps B1 d'affinité modérée. On remarque très rapidement que l'anticorps se fixe préférentiellement sur les tumeurs de forte expression d'hEGFR A 431 localisables par les flèches blanches. A l'inverse, les flèches rouges nous montrent la tumeur d'expression moyenne de la cible hEGFR MDAMB 231 qui est, quant à elle, très peu ciblée par l'anticorps B1 (**Fig. 47**). Cet anticorps d'affinité modérée semble donc être en mesure de cibler préférentiellement la tumeur d'expression forte de la cible hEGFR.

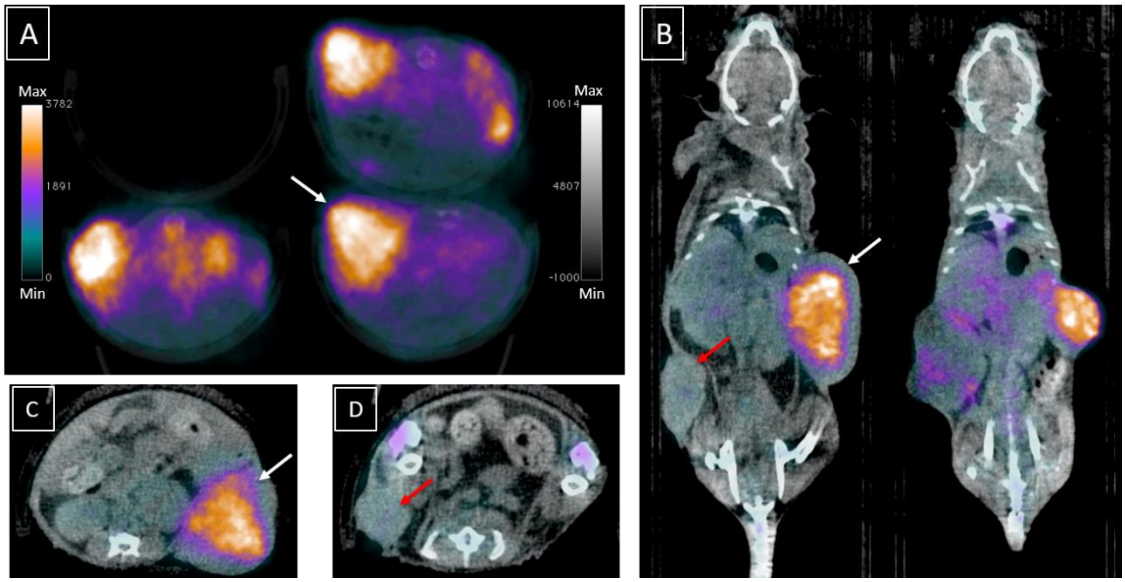


Figure 47 : Images TEP-TDM des souris injectées par l'anticorps B1 en intra péritonéal (IP) à 168h. On retrouve des coupes coronale (B) et axiales (A; C; D). Les flèches blanches représentent la même tumeur de forte expression d'hEGFR (A 431) tandis que les flèches rouges nous montrent la même tumeur d'expression moyenne de la cible (MDAMB 231) chez la même souris.

La figure 48 nous montre la fixation équivalente d'un des anticorps de contrôle positif, le Panitumumab, sur les deux tumeurs. En effet, les flèches blanche et rouge nous montrent respectivement la fixation du Panitumumab sur la lignée A 431 (équivalent tissu tumoral) et MDAMB 231 (équivalent tissu sain) (**Fig. 48**). Nous avons donc un anticorps contrôle qui se fixe sur du tissu exprimant hEGFR et ce indépendamment du nombre de récepteurs. Les images du second anticorps de contrôle positif, le Cetuximab, sont similaires à celles du Panitumumab. Cela conforte notre conclusion de fixation équivalente de ces deux anticorps sur les deux lignées.

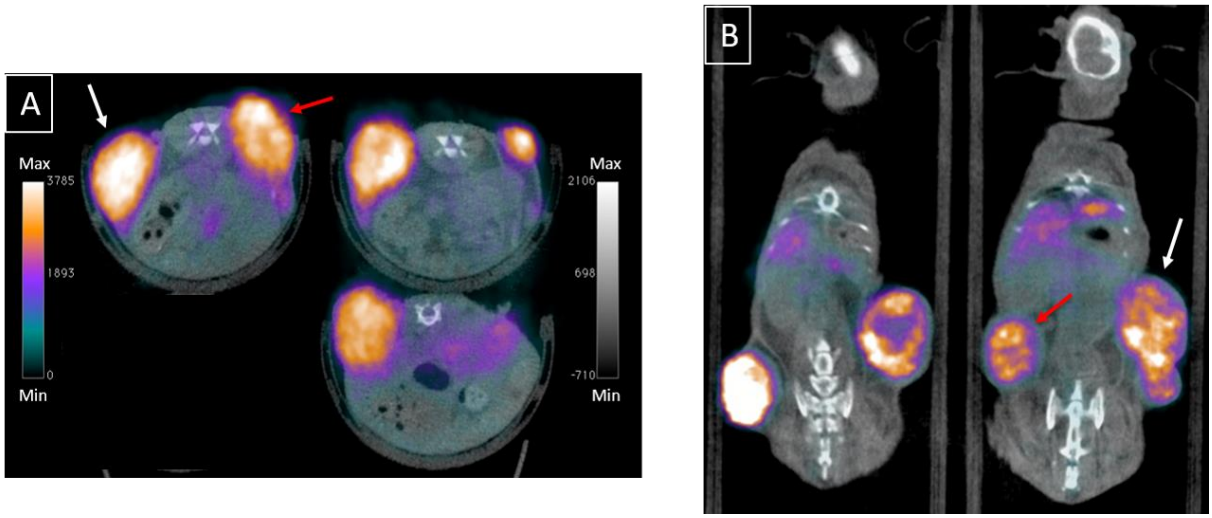


Figure 48 : Images TEP-TDM des souris injectées par l'anticorps Panitumumab en intra péritonéal (IP) à 168h. On retrouve des coupes coronale (B) et axiales (A). Les flèches blanches représentent la même tumeur de forte expression d'hEGFR (A 431) tandis que les flèches rouges nous montrent la même tumeur d'expression moyenne de la cible (MDAMB 231) chez la même souris.

6.4. Biodistribution conventionnelle des anticorps

La biodistribution conventionnelle sur le foie et les deux tumeurs est effectuée après sacrifice des souris à 168h (nous nous sommes focalisés sur les organes les plus relevants). Les organes sont pesés et l'activité de chaque organe est mesurée au compteur Gamma (résultats en CPM). Cela permet de quantifier l'activité présente dans l'organe par rapport à l'activité injectée rapportée au poids de ce même organe (%IA/g) à 168h.

Nos résultats de biodistribution conventionnelle nous permettent de confirmer ceux de l'imagerie TEP-TDM. En effet, nous avons de nouveau comparé la capacité de fixation de chacun des anticorps sur les deux lignées. On remarque que les anticorps de contrôle positif (Cetuximab et Panitumumab) et négatif (13R4a) se fixent de façon équivalente sur les deux lignées A 431 et MDAMB 231. A l'inverse, nos anticorps se fixent préférentiellement sur la lignée A 431 qui exprime fortement la cible hEGFR avec une tendance forte pour B1 et G5 (non significatif) et un test significatif pour B2 qui, pour rappel, n'était pas significatif en imagerie TEP-TDM (**Fig. 49**). Ces résultats complètent donc les résultats d'imagerie TEP-TDM et nous permettent de conclure que nos anticorps semblent en mesure d'épargner un tissu sain par moindre fixation tout en maintenant une activité sur un tissu tumoral quand les anticorps utilisés en clinique se fixent sur les tissus sains et tumoraux.

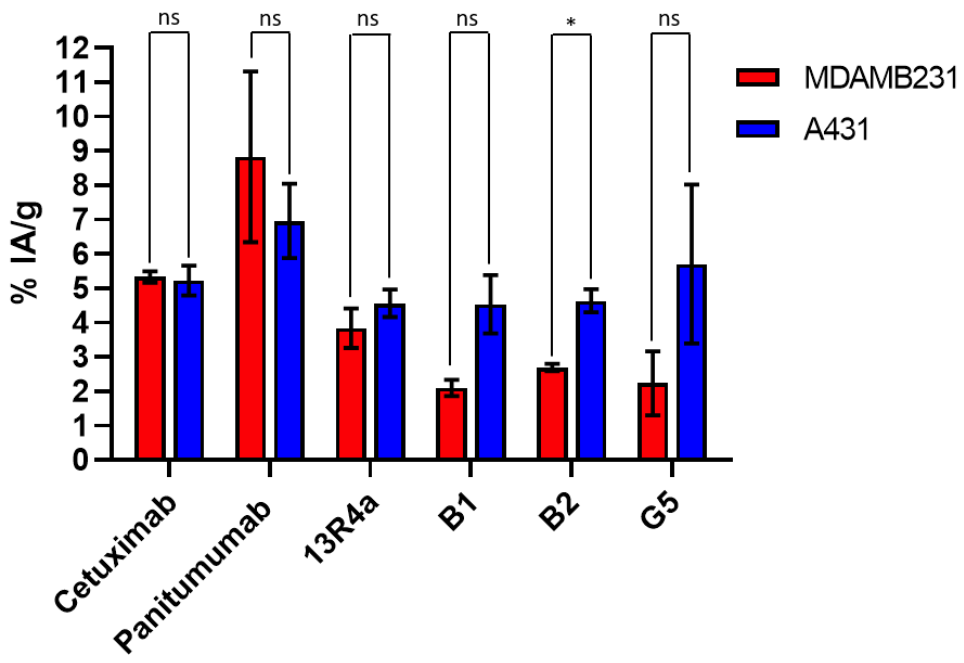


*Figure 49 : Résultats de la biodistribution conventionnelle effectuée sur les deux tumeurs (MDAMB 231 et A 431) pour chacun de nos anticorps à 168h exprimés en % AI/g. Un test 1way ANOVA a été effectué. La significativité est représentée par * < 0,05 ; ** < 0,01 ; *** < 0,001 ; ns = non significatif.*

Notre étude *in vivo* d'imagerie TEP-TDM complétée par une biodistribution conventionnelle nous a permis de quantifier de façon longitudinale la biodistribution de nos anticorps. Cette méthode très sensible nous a permis de confirmer tous nos résultats précédents. En effet, nos anticorps d'études (B1, B2 et G5), semblent être en mesure de se fixer préférentiellement sur la lignée d'expression forte d'hEGFR équivalente à du tissu tumoral et de réduire considérablement cette fixation sur la lignée d'expression moyenne d'hEGFR équivalente à du tissu sain.

CONCLUSION ET DISCUSSION

Le monde de l'immunothérapie est en constante amélioration afin de lutter toujours plus efficacement et précisément sur la maladie. Les antigènes ciblés par ces immunothérapies dans le cancer sont très souvent retrouvés, même à l'état basal, dans de nombreux tissus sains (HER2, EGFR). Cela entraine des toxicités appelées « **on target off tumor** » qui peuvent être à l'origine d'un arrêt précoce de développement d'un candidat médicament ou d'un échec thérapeutique chez le patient. Afin de réduire cette toxicité sur le tissu sain chez le patient, nous avons cherché à obtenir puis caractériser des anticorps d'affinité réduite pour la cible. Cette affinité réduite doit permettre de maintenir une fixation de l'anticorps sur un tissu tumoral exprimant fortement la cible tout en épargnant un tissu sain exprimant de façon modérée ou faible cette même cible. Une seconde voie d'optimisation basée sur les caractéristiques acides du micro environnement tumoral peut également permettre de réduire la fixation sur du tissu sain tout en maintenant une localisation tumorale de nos anticorps dits « pH dépendants » qui se fixent préférentiellement sur leur cible à pH acide.

Tout d'abord, le **premier objectif** de cette thèse a été de cribler et caractériser *in vitro* et *in cellulo* nos anticorps d'affinité réduite et, pour certains, définir leurs propriétés de pH dépendance. Pour cela, nous nous sommes basés sur un modèle d'étude très bien décrit, à savoir le récepteur au facteur de croissance épidermique humain (hEGFR). Il est surexprimé dans de nombreux cancers (colorectal, pulmonaire, épidermoïde) et une sélection par phage display sur hEGFR à pH physiologique (7,4) et à pH acide (6) a été effectuée en ce sens au sein de notre équipe (GenAc).

Nous avons donc sélectionné des clones positifs qui semblaient détenir des affinités différentes pour la cible hEGFR après sélection par phage display. Certains de ces clones semblaient également détenir des capacités de pH dépendance variées. Après production et mise au format IgG1 des clones sélectionnés, nos premières études *in vitro* (ELISA et BIACORE) ont validé les différences d'affinité entre nos anticorps permettant de les classer du plus affin au moins affin H3>G5>G8>B2>B1>B12. De plus, les doses réponses (ELISA) aux deux pH, physiologique et acide, permettent de confirmer cette classification des anticorps au niveau de leur affinité ainsi que, pour certains, leur capacité de pH dépendance notable (B1, G5 et G8 pour les plus pH dépendants). Ensuite, les études *in cellulo* ont confirmé les capacités de fixation différentes de nos anticorps sur les lignées de niveau d'expression d'hEGFR différent. Certains anticorps semblent capables de se fixer sur les lignées d'expression forte de la cible (HCC 827 et A 431) et d'épargner les lignées d'expression moyenne de la cible (MDAMB 231, SKOV3 ou BxPC3) équivalent aux tissus sains. Les capacités de pH dépendance observées *in cellulo* confirment les résultats *in vitro*.

Tous ces anticorps se fixent sur la même cible hEGFR. Cependant, une étude plus précise de la structure des Fab et de leur liaison avec leur cible pourrait permettre d'expliquer, en partie, cette différence d'affinité (encombrement stérique, mutations dans les séquences VH/VL) comme cela a

déjà été effectué pour des anticorps anti EGFR utilisés en clinique comme le Cetuximab (S. Li et al. 2005; Kamat et al. 2008) et le Panitumumab (Makabe et al. 2021). En effet, ces deux anticorps thérapeutiques se lient sensiblement sur le même domaine III extracellulaire de l'EGFR humain. La différence d'affinité entre eux n'est donc pas due au lieu de fixation qui n'est pas différent.

Il serait également intéressant de compléter ces recherches structurelles des Fab par une étude en BIACORE de compétition de nos anticorps sur la même cible hEGFR. Cela doit être complété également par la comparaison aux anticorps Cetuximab et Panitumumab déjà utilisés en clinique. En plus de la connaissance des sites précis de liaison de nos anticorps sur le domaine extracellulaire du récepteur à l'EGF, nous pourrions ainsi définir si cette fixation peut engendrer des phénomènes d'encombrement stérique pouvant expliquer cette compétition.

Ce récepteur hEGFR pourrait subir des changements de conformation en fonction des conditions de pH. Il serait intéressant d'étudier l'accessibilité des sites de fixation de nos anticorps sur cette cible en fonction des conditions du microenvironnement tumoral (pH physiologique ou acide). Une étude de cristallographie du récepteur EGFR à pH acide et physiologique pourrait permettre de voir si les sites de fixations de l'anticorps peuvent en être impactés. Le LDL-r est un exemple de récepteur changeant de conformation au pH endosomal acide afin de relarguer le cholestérol fixé (Rudenko et al 2008).

Certaines mutations dans le domaine III extracellulaire de l'EGFR, comme celle S468R (nommée ainsi dans la séquence de la protéine mature car sinon aussi retrouvée sous le nom S492R), engendre des résistances au Cetuximab mais pas au Panitumumab malgré leur site de liaison commun (Sickmier et al. 2016b). Il serait également intéressant de compléter ces résultats par des tests similaires avec nos anticorps sur ce même domaine muté. Cependant, de nombreuses autres mutations déjà connues sur les cascades de phosphorylations en aval d'EGFR (NRAS, KRAS, BRAF, PI3K …) sont indépendantes du domaine extracellulaire et engendrent des résistances dans de nombreux cas (Zhao et al. 2017).

L'étude de la fixation des anticorps sur un modèle HEK-Fc-TM a été entravée par la fixation du Cetuximab sur la lignée non induite dès les tests initiaux. La lignée sauvage HEK293 initiale n'exprime pas l'EGFR (F. Zhang et al. 2015). Une fixation aspécifique semble être la piste la plus probable mais une simple vérification en amont de la fixation ou non du Cetuximab sur cette lignée aurait permis de le confirmer ou de l'infirmer.

Ensuite, le **second objectif** de cette thèse a été de valider *in vivo* ces résultats en immunohistochimie après greffe chez la souris de deux tumeurs (A 431 et MDAMB 231 respectivement d'expression forte et moyenne d'EGFR humain), injection en IP de nos anticorps B1, B2, G5 et H3 et des anticorps de contrôle Cetuximab, Panitumumab et 13R4a.

Nous avons pu confirmer nos résultats *in vitro* et *in cellulo* à l'aide de cette étude *in vivo*. En effet, nos anticorps de contrôle positif semblent se fixer fortement aux deux tumeurs sans faire de distinction entre les niveaux d'expression différents des deux lignées. Néanmoins, une réserve est de mise car la lignée MDAMB 231 ne nous a pas permis d'avoir trois échantillons à tester pour ces deux anticorps de contrôle. Concernant nos anticorps, ils sont tout d'abord tous en capacité d'épargner significativement la lignée exprimant le récepteur à l'EGF humain de façon modérée (MDAMB 231). De plus, ils sont capables de se fixer significativement sur la lignée d'expression forte d'EGFR humain (A 431) pour deux d'entre eux (B2 et G5) et non significativement (mais avec une tendance positive) pour les deux autres anticorps (B1 et H3). Une étude plus robuste avec plus d'animaux devrait permettre de renforcer les conclusions de ces résultats préliminaires. De nombreuses études ont montré *in vivo* cette capacité de fixation sur les tumeurs seulement d'expression forte de la cible (Arteaga et al. 2007; Junttila et al. 2014; Wong et al. 2018; Slaga et al. 2018b; Qiu et al. 2019). De plus, une lignée de kératinocytes immortalisés pourrait remplacer la lignée MDAMB231 d'expression moyenne de la cible. Ces kératinocytes seraient un modèle de tissu sain inéressant afin de venir confirmer nos résultats *in cellulo* et *in vivo* (lignée HaCat).

La diffusion des anticorps au sein des tumeurs solides est également un sujet étudié. Il est dépendant de nombreux paramètres comme la quantité antigénique, l'internalisation des récepteurs ou encore l'affinité des anticorps. En effet, il a été montré sur la cible HER2 par Cilliers et son équipe que, en saturant les récepteurs périphériques de la masse tumorale par des concentrations saturantes d'anticorps froids, on observe une répartition intra tumorale beaucoup plus homogène des anticorps marqués (Cilliers et al. 2018). Une affinité plus faible réduit la contrainte de fixation et permet d'améliorer la constante de dissociation (k_{off}). On pourrait, en ce sens, penser qu'une dissociation plus rapide pourrait permettre de favoriser la pénétration intra tumorale en réduisant la contrainte de fixation périphérique des anticorps. L'étude de la diffusion de nos anticorps serait intéressante.

Fierle et son équipe ont mis en avant l'intérêt de ne pas se focaliser uniquement sur les candidats d'affinité très élevée. Ils ont démontré cette théorie sur un modèle de sélection de scFv-CAR dirigés contre l'antigène associé aux tumeurs mésotheline (gène MSLN) exprimé à l'état basal dans de nombreux tissus (plèvre, péricarde) mais sur exprimé dans certains cancers comme l'ovaire, le pancréas ou encore le mésothéliome pleural (Fierle et al. 2022; Yu et al. 2017).

Concernant les caractéristiques de pH dépendance de nos anticorps, cela n'a pas été étudié ici mais il serait intéressant de savoir si ces lignées acidifient le micro environnement tumoral. La mesure du pH *in vitro* et *in cellulo* peut être indicative et relativement facile à obtenir. Cependant, la corrélation i*n vivo* n'est pas toujours évidente et quelques techniques *in vivo* tentent de mesurer cette acidification comme l'imagerie peptide pHLIP® (Viola-Villegas et al. 2014), la CEST-MRI (K. M. Jones et al. 2017) ou encore l'imagerie TEP via le métabolisme glucidique de manière indirecte (Scafoglio et al. 2015). Cela

pourrait permettre de tirer des conclusions complémentaires aux premiers résultats *in vitro* et *in cellulo* sur la capacité de fixation de nos anticorps en fonction du pH du micro environnement tumoral.

D'autres voies d'optimisation sont à l'étude comme celle de la réduction de la taille pour une meilleure fixation et pénétration tumorale de la protéine. En effet, Galgoczy et son équipe ont mis en avant une preuve de concept, à l'aide de polymères de glucose de différentes tailles, sur la matrice extra cellulaire (MEC) avec un intérêt d'utilisation d'un format réduit pour une meilleure pénétration (Galgoczy et al. 2014). Cependant, les conclusions *in vivo* ont montré jusqu'à aujourd'hui un niveau d'anticorps au niveau du site tumoral similaire qu'importe le format d'anticorps à l'étude (petit format ou format classique IgG1) (Deonarain et al. 2018 ; Freeman et al. 2012). Ces formats réduits sont cependant déjà utilisés en diagnostique avec un avantage certain. En effet, ces petits formats permettent de réduire le temps de séjour du produit pour obtenir des hauts ratios signaux/bruits (Küppers et al. 2021; Orcutt et al. 2017).

Il pourrait également être très intéressant d'étudier plus précisément les propriétés de cross réactivité de nos anticorps pour l'EGFR humain et murin. En effet, un modèle syngénique de souris exprimant une tumeur mEGFR positive pourrait permettre d'étudier directement la différence de fixation de nos anticorps entre la tumeur et le tissu sain de la souris exprimant lui aussi mEGFR mais à des niveaux d'expressions moyen ou faible. Dans l'idéal, nos anticorps étant cross réactants pour certains, il serait envisageable de pouvoir passer d'un modèle de souris syngénique à un modèle humain directement en clinique (Brägelmann et al. 2021; Chuntova et al. 2022).

Enfin, le **dernier objectif** de cette thèse a été de confirmer les résultats *in vitro* et *in vivo* précédents par une seconde étude de biodistribution par imagerie TEP-TDM de nos anticorps B1, B2 et G5 et les anticorps de contrôle Cetuximab, Panitumumab et 13R4a radiomarqués au Zirconium 89 chez des souris greffées par les deux tumeurs A 431 et MDAMB 231.

Nos quantifications d'activité par imagerie aux différents temps nous ont permis de confirmer nos premiers résultats *in vivo* d'IHC. En effet, nos anticorps de contrôle positif Cetuximab et Panitumumab, de par leur forte affinité pour la cible hEGFR, se répartissent dans les deux tumeurs, indépendamment du nombre de récepteurs à l'EGF humain. L'anticorps de contrôle négatif, le 13R4a, se retrouve également sur ces tumeurs. Cela peut être expliqué par la quantité injectée relativement élevée (200µg), le temps de demi-vie long, la vascularisation péri-tumorale importante mais détenant des capillaires fenestrés (Jain et albumine au niveau tumoral) et la forte sensibilité de l'imagerie TEP. Ce 13R4a n'est pas spécifique d'un antigène humain ou murin mais d'une enzyme bactérienne ce qui temps à confirmer une diffusion passive expliquant cette localisation. Un second anticorps irrelevant aurait pu permettre de confirmer cette fixation qui semble aspécifique. Nos anticorps d'étude B1, B2 et G5 semblent avoir la capacité de se fixer préférentiellement sur la lignée d'expression forte d'EGFR

humain (A 431) par rapport à la lignée d'expression moyenne d'EGFR humain (MDAMB 231). En plus de cette analyse, nous avons des résultats qui tendent à confirmer ceux énoncés dans notre papier en cours de rédaction (**Annexe**) qui traitaient de la moindre localisation hépatique des anticorps détenant une mutation LALAPG dans leur fragment Fc. Nos anticorps B1, B2 et G5 sont Fc muté LALAPG et semblent moins se localiser au niveau hépatique par rapport au Cetuximab ou au 13R4a. Il faut garder en tête que le rapport DFO/mAb est variable d'un facteur deux entre les anticorps pouvant impacter la quantité de radio-isotope complexé et donc l'image TEP. Cela est peut-être dû à une différence d'accessibilité des lysines entre les anticorps (lieu de fixation du DFO).

Une étude de comparaison *in vivo* chez l'homme avec un cancer EGFR+ entre un traitement par un anticorps de haute affinité comme le Cetuximab versus un anticorps d'affinité diminuée pourrait permettre de définir l'intérêt thérapeutique ou non de ce type d'immunothérapie tant sur l'efficacité de réduction tumorale que sur la tolérance (réduction du « **on target off tumor** » et donc des toxicitées). Cela pourrait avoir un intérêt encore plus important sous le format ADC (Joubert et al. 2020). En effet, les toxicités induites par ces thérapies sont souvent plus importantes sur du tissu sain que le même anticorps nu à la même dose du fait de la présence des molécules cytotoxiques. La réduction du ciblage sur le tissu sain permettrait de réduire ces toxicités tout en maintenant une activité anti tumorale importante. Un ADC anti EGFR couplé à la drogue pyrrolobenzodiazépine (PBD), le Serclutamab Talirine (laboratoire AbbVie), est actuellement en étude clinique (phase I) avec une affinité plus faible que le Cetuximab pour l'EGFR humain (200nM vs 2nM) et qui semble être bien toléré *in vitro* en étude préclinique (Anderson et al. 2020). On pourrait même extrapoler ces résultats sur de nombreuses autres cibles potentielles (HER2, Trop-2 …) dans le cas où elles sont exprimées également par le tissu sain.

Un intérêt diagnostique de réduction d'affinité pourrait également être mis en avant afin de réduire le bruit de fond du signal sur le tissu sain et ainsi augmenter le ratio de signal tumeur/tissu sain. On pourrait donc optimiser la localisation tumorale à condition d'injecter des quantités d'anticorps relativement faible afin de bien discriminer les zones de localisation tumorale et saine. De plus, cet intérêt de réduction d'affinité pourrait être complété de l'intérêt d'utiliser un anticorps Fc muté LALAPG afin de réduire la localisation au foie et ainsi augmenter d'autant plus le ratio signal tumeur/tissu sain. Vivier et son équipe ont déjà mis en avant par imagerie TEP l'intérêt d'une déglycosylation pour réduire les interactions avec les FcγRI et ainsi réduire la localisation hépatique (Vivier et al. 2019).

Notre biodistribution conventionnelle effectuée sur les deux tumeurs et le foie est venue confirmer nos résultats sur imagerie concernant nos deux tumeurs. En effet, nous remarquons que nos anticorps de contrôle positif Cetuximab et Panitumumab sont localisés à la fois sur les tumeurs de forte et moyenne expression d'EGFR humain (A 431 et MDAMB 231). Nos anticorps, eux, se retrouvent

préférentiellement sur les tumeurs de forte expression d'EGFR humain (A 431). Tous les anticorps mutés LALAPG dans leur fragment cristallisable se retrouvent moins dans le foie contrairement au Cetuximab et 13R4a qui eux détiennent un Fc non muté.

Lors de cette thèse, nous avons donc mis en avant l'intérêt d'une sélection d'anticorps d'affinité diminuée *in vitro*, *in cellulo* et *in vivo* afin de réduire la fixation sur du tissu sain exprimant un nombre faible ou moyen de récepteurs (« **on target off tumor** ») tout en maintenant une fixation sur du tissu tumoral sur exprimant ces mêmes récepteurs (« **on target on tumor** »). On pourrait donc être en mesure de réduire la toxicité sur le tissu sain chez le patient tout en maintenant une activité anti tumorale équivalente à un anticorps d'affinité élevée pour cette même cible. Des études à plus grande échelle et chez le patient pourraient permettre de mettre en avant toutes ces hypothèses.

MATERIELS ET METHODES

1. Sélection des clones spécifiques et mise au format Immunoglobuline G

1.1. Sélection des séquences VH/VL

Une sélection par phage display sur les protéines humaine et murine EGFR a été effectuée au sein de notre équipe (plateforme GenAc). Cette sélection s'est effectuée en trois tours : 1er tour sur la protéine hEGFR-hFc, 2nd tour sur la protéine mEGFR-hFc + saturation BSA 4%, 3ième tour sur la protéine hEGFR-hFc + saturation lait 2%. Le coating de la protéine d'intérêt s'effectue en PBS à l'aide du complexe Streptavidine Tris-NTA-NiSO4, la déplétion 1 s'articule sur une protéine irrelevant et la déplétion 2 sr le Fc nu (Evitria). L'enrichissement des phages est contrôlé par ELISA classique sur les protéines d'intérêts hEGFR-hFc et mEGFR-hFc et la protéine irrelevante DDR1.

Les phages du 3ième tour sont utilisés pour infecter les bactéries suppressives HB2151 (reconnaissance codon Ambre comme un codon stop pour sécréter les scFv en surnageant). Les bactéries infectées sont diluées et étalées sur boîtes de gélose Luria-Bertani + Ampicilline (LB-Ampi à 100µg/mL) + Glucose 2%. Les boîtes sont incubées sur la nuit à 37°C. Le lendemain, on pique 96 clones que l'on remet en culture dans une plaque 96 puits (300 µL milieu 2xTY avec ampicilline à 100µg/mL + glucose 1%) sur la nuit à 200rpm et 37°C. On prélève 10 µL de chaque clone que l'on remet en culture dans du milieu 2xTY avec ampicilline à 100µg/mL + glucose 0,1%. On ajoute l'IPTG (1 mM) lorsque la DO est environ à 0,8 pour induire la sécrétion dans le milieu des scFv. Après 4h d'incubation à l'IPTG (30°C et 200rpm), on centrifuge la plaque à 1000rpm pour culotter les bactéries et on récupère le surnageant détenant les scFv de chaque clone que l'on transfère dans une nouvelle plaque 96 puits pour l'ELISA futur.

Enfin, nous avons sélectionné des séquences positives pour les protéines EGFR humaine et murine (hEGFR et mEGFR). Ces séquences positives sont donc issues de l'ELISA monoclonal des clones positifs mis au format scFv sur la protéine d'intérêt hEGFR-hFc ou mEGFR-hFc. Les VH et VL correspondants à ces séquences positives ont été extraits et commandés chez Twist.

1.2. Réactions de Golden Gate

1.2.1. Clonage des VH/VL dans le vecteur pEF-hu-IgG1

Ces séquences de chaînes lourde et légère variables (VH et VL) sont commandées avec un site de clonage BbsI (appelé aussi BpiI) de chez ThermoFisher ou NEB. Ce site va permettre d'intégrer ces séquences par une réaction de Golden Gate au sein d'un vecteur (ici pEF-hu-IgG1) à l'aide de l'enzyme BbsI. On resuspend les solutions VH et VL dans de l'eau stérile à la concentration finale de 50ng/µL. Nous avons ici 13 réactions de Golden Gate prévues pour les clones suivants : A8 ; A10 ; B1 ; B2 ; B5 ; B9 ; B10 ; B12 ; F6 ; G2 ; G5 ; G8 ; H3. On prépare ensuite un mix pour le nombre de tubes de réaction Golden Gate souhaités + 1 (Tableau Mix réaction de Golden Gate) :

	Concentration	Mix pour 1 tube	Mix pour 14 tubes
Vecteur pEF-hu-IgG1	340 ng/µL	75 ng soit 0,22 µL	3,09 µL
Tampon G 10X (fermentas)	10 mM	2 µL	28 µL
ATP	10 mM	1 µL	14 µL
BpI1 (NEB)	20 units/µL	0,5 µL	7 µL
T4 DNA Ligase (fermentas)	5 units/µL	0,4 µL	5,6 µL
H2O	/	QSP 19,6 µL	QSP 274,4 µL

On utilise 19,6µL de ce mix dans lequel on rajoute 0,2µL de VH et 0,2µL de VL (pour avoir une quantité de 10ng d'ADN pour la réaction). S'en suit le lancement du programme de PCR « ligation » sur l'appareil thermocycleur Nexus. Ce programme s'articule autour de digestion/ligation sans gradient : 30 x (1' à 37°C puis 1' à 16°C) ; 20' à 65°C ; maintient à 4°C.

1.2.2. Clonage des VH/VL dans le vecteur pEF-hu-IgG1-LALAPG

La procédure est la même que pour le vecteur pEF-hu-IgG1. Le vecteur pEF-hu-IgG1-LALAPG est à la concentration de 500 ng/µL soit 0,15µL 75ng par tube.

1.2.3. Clonage mEGFR-ECD dans le vecteur pEF-huFc-6His

Le vecteur pEF-huFc-6His est issu de notre laboratoire et l'EGFR murin est issu de R&D Systems. Le clonage s'effectue avec l'enzyme Bsa1 avec un mix résumé dans le tableau ci-dessous :

	Concentration	Mix pour 1 tube
Vecteur pEF-huFc-6His	340 ng/µL	75 ng soit 0,22 µL
muEGFR-ECD	50 ng/µL	1,5 µL
CutSmart	10 mM	2 µL
ATP	10 mM	1 µL
Bsa1	20 units/µL	0,5 µL
T4 DNA Ligase	5 units/µL	0,4 µL
H2O	/	QSP 20 µL

On lance le programme « golden gate Bsa1 » sur l'appareil à PCR : 30 x (1' à 37°C puis 1' à 16°C) ; 20' à 65°C ; maintient à 4°C.

1.3. Amplification bactérienne de la construction Golden Gate

On utilise des bactéries TOP10 compétentes. Ces bactéries sont préparées selon un protocole précis contenant du milieu Luria-Bertani (LB), du sulfate de magnésium (MgSO4), du TFB1 (KOAc + RbCl + CaCl2 + MnCl2 + Glycérol 100% et ajustement du pH à 5,8 avec de l'acide acétique CH3COOH) et du TFB2 (PIPES ou MOPS + RbCl + CaCl2 + Glycérol 100% et ajustement du pH à 6,5 avec de l'hydroxyde de potassium KOH).

On utilise 5uL du produit PCR issu du Golden Gate avec 50µL de bactéries TOP10 compétentes dans des eppendorfs (produit PCR 10% v/v maximum). On laisse 30min sur glace avant un choc thermique

permettant l'intégration du produit PCR dans la bactérie (45 secondes environ à 42°C au bain marie puis 2min de nouveau sur glace). On ajoute ensuite 1mL de milieu LB Low Salt (LB LS) ou 2XTY afin de laisser pousser pendant 30min à 37°C et 200 rotations par minute (rpm). On étale ensuite les bactéries sur les boîtes de gélose préchauffées à plusieurs dilutions (afin d'anticiper un éventuel tapis bactérien si trop de matériel déposé) et on y ajoute également de l'antibiotique d'intérêt (Zéocine de InvivoGen) à 25µg/mL (tube mère). La pousse des bactéries s'effectue ensuite à 37°C sur la nuit dans l'incubateur fixe.

1.4. Criblage PCR, séquençage et production d'ADN

1.4.1. Contrôle clonage VH/VL dans les vecteurs pEF-hu-IgG1 et pEF-hu-IgG1-LALAPG

Le contrôle de la séquence des clones (insertion vecteur pEF-hu-IgG1 + VH + VL) s'effectue par PCR sur colonies. Les amorces utilisées (pEF_Ig2.for et pEF_Ig.rev ; Eurofins Genomics) détiennent les séquences suivantes et sont diluées au 1/10^{ième} par rapport à la solution stock :

pEF_Ig2.for	TTCTGTTCTGCGCCGTTAC
pEF_Ig.rev	ACCGGTTCGGGGAAGTAGT

Un clone isolé est piqué sur les boîtes de gélose et mis transitoirement dans une barrette de tube PCR contenant 20µL de mix suivant (n + 1 tubes) :

	Mix pour 1 tube PCR (20 µL)	Mix pour 20 tubes PCR
Dream Taq Green mix x2 (thermo)	10 µL	200 µL
pEF_Ig2.for (10 pM/µL)	0,6 µL	12 µL
pEF_Ig.rev (10 pM/µL)	0,6 µL	12 µL
H2O (QSP 20 µL)	8,8 µL	176 µL

Le programme PCR est lancé sur l'appareil à PCR (sans gradient) avec le programme « dream taq » suivant : 3' à 95°C ; 30 x (30'' à 95°C ; 30'' à 53°C ; 1' à 72°C) ; 5' à 72°C ; maintient à 15°C. Le clone piqué est ensuite remis dans 3mL de milieu LB LS + Zéocine sur la nuit à 37°C et 200rpm.

S'en suit le contrôle du poids moléculaire par gel d'agarose 1% ou envoi pour séquençage. Le gel d'agarose est coulé après ébullition de 0,4gr d'agarose dans 40mL de Tris Acétate EDTA (TAE) 1X et ajout de l'intercalent de l'ADN SYBR Green (1µL pour 10mL d'agarose de ThermoFisher Scientifc). On dépose ensuite 5µL du produit de PCR dans chaque puit avec 6µL de marqueur de poids moléculaire (1kb plus de ThermoFisher Scientific). La migration s'effectue pendant 20min à 100V (appareil VWR).

Le second contrôle s'effectue par envoie d'ADN à Genewiz (20µL à 80ng/µL) avec les primer pEF_Ig2.for et pEF_Ig.rev (dilution au 1/10^{ième}) pour analyser les séquences. Ce second contrôle s'effectue à la suite d'une production bactérienne en plus grande quantité d'ADN d'intérêt par miniprep (cf protocole d'extraction NucleoSpin Plasmid EasyPure de Macherey-Nagel). On récupère

les 3mL de milieu LB LS + Zéocine mis en culture sur la nuit et 2mL servent à cette purification dite miniprep et 1mL pour stock glycérol 15% à stocker au -20°C. L'analyse des séquences s'effectue par superposition des séquences théoriques et celles obtenues sur le logiciel ApE (version 2.0.49.0). La quantité d'ADN récoltée est mesuré à l'aide du NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Pour obtenir une quantité plus importante d'ADN on peut purifier un volume de bactérie plus important (200mL) par le kit d'extraction midiprep NucleoSpin Plasmid EasyPure de Macherey-Nagel (cf protocole). L'ADN est ensuite filtré sur minifiltre 0,22µm (Minisart de Sartorius) et stocké à -20°C.

1.4.2. Contrôle clonage mEGFR-ECD dans le vecteur pEF-huFc-6His

Le contrôle du clonage s'effectue par double digestion du vecteur avec les enzymes de restriction Sac1 (Takara) et Nco1 (Takara) selon le mix suivant :

	Concentration	**Mix pour 1 tube**
Vecteur pEF-huFc-6His	340 ng/µL	1 µg soit 3 µL
Sac1	10 units/µL	1 µL
Nco1	10 units/µL	1 µL
Tango	10 x	2 µL
H2O	/	QSP 20 µL

La réaction s'effectue durant 1h30 à 37°C. Le dépôt sur un gel d'agarose 1% (protocole décrit précédemment) permet de vérifier les bandes d'intérêts.

2. Production au format IgG en Cellules Embryonnaires Humaines de rein (HEK 293T) :

2.1. Culture et transfection en cellule HEK 293T

Les cellules HEK 293T sont cultivées avec du milieu Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) supplémenté en F12 (Gibco) + Sérum Veau Fœtal 10% (Eurobio #8301). Ces cellules sont des cellules adhérentes en boîtes de pétri ou flasques (Sarstedt où Falcon). Elles sont amplifiées ici en Pétri de diamètre 150mm^3 (P 150). La transfection s'effectue lorsque la confluence cellulaire des HEK 293T est d'environ 70-80%.

Pour cette transfection on utilise une solution mix composée de :

- 120µg de Polyéthylènimine (PEI à 1mg/mL de Polysciences #23966-1) dans 500µL de Chlorure de Sodium (NaCl) stérile à 150mM
- 20µg d'ADN également dans du NaCl stérile (QSP 500µL)

Les deux composants de ce mix doivent être préparés séparément et l'assemblage s'effectue avec le transfert du PEI sur l'ADN (meilleur taux de transfection qu'avec ADN sur PEI). Le tableau ci-dessous est un exemple de la préparation de ces composants :

	[C] (µg/mL)	**Volume ADN à prélever** (1 P 150) **pour 20µg**	**Volume ADN à prélever** (2 P 150)	**QSP 500 µL NaCl stérile** (1 P 150)	**QSP 500 µL NaCl stérile** (2 P 150)
Clone B1	999,4	20,0 µL	40,0 µL	480,0 µL	960,0 µL
		Volume PEI à prélever (1 P 150)	**Volume PEI à prélever** (2 P 150)	**QSP 500 µL NaCl stérile** (1 P 150)	**QSP 500 µL NaCl stérile** (12 P 150)
PEI	1000	120 µL	240 µL	380 µL	760 µL

On vortex vigoureusement le mélange avant une incubation de 10min à température ambiante (TA). A la suite de cette incubation, la transfection s'effectue par dépôt de 1mL de ce mix au goutte à goutte sur chaque boîte avec une répartition le plus homogène possible. Le milieu DMEM F12 + SVF 10% est enlevé puis remplacé après 4-6h par du milieu DMEM F12 sans SVF. La production s'effectue pendant 5-7 jours et les protéines solubles sont sécrétées dans le surnageant.

2.2. Récupération du surnageant

Le surnageant est récupéré et centrifugé pendant 5' à 1000rpm 4°C pour éliminer les cellules mortes flottantes. Une nouvelle centrifugation sur le surnageant permet d'éliminer les débris cellulaires pendant 15' à 3000rpm à 4°C. Le surnageant est ensuite filtré sur minifiltre 0,22µm (Minisart de Sartorius) ou unité de filtration (Millipore de Merck) si le volume est trop important et transféré dans des falcons de 50mL.

2.3. Purification des protéines recombinantes d'intérêt

La purification s'effectue à l'aide de billes d'agarose pourvues de protéines A (Sino Biological) capable de fixer la partie Fc des anticorps produits dans le surnageant par les HEK 293T. On sait que 1mL de billes-protéine A peut fixer en théorie jusqu'à 30mg d'anticorps (informations données par le fournisseur). On sait également par expérience qu'une production d'anticorps en HEK 293T nous donne un rendement final compris entre 2-25µg/mL. On peut calculer quel volume de billes-protéine A est nécessaire pour fixer toute la production d'anticorps. Attention, il faut tenir compte dans le calcul du volume que les billes-protéine A sont stockées dans de l'éthanol 70% et que les billes ne représentent que 2/3 du volume total prélevé.

Le volume de billes-protéine A prélevé est lavé sur un eppendorf spin-X de diamètre 0,45µm (Costar) à l'eau milliQ et au Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS de Gibco) sans calcium ni magnésium (-/-). Entre chaque lavage est effectué une centrifugation de 1' à 5000rpm. On resuspend les billes-protéine A dans le volume total d'intérêt de DPBS -/-. Enfin, la répartition du volume de billes-protéine A s'effectue dans les falcons contenant le surnageant et on laisse tourner sur roue rotative à 4°C sur la nuit (ou au moins 5-6h).

Le lendemain, les falcons sont récupérés et centrifugés pendant 5' à 4000rpm et 4°C afin de culotter l'ensemble des billes-protéine A ayant trappées l'anticorps. Le surnageant est éliminé et les billes sont

récoltés puis transférées sur une membrane d'eppendorf Spin-X 0,45µm. Les falcons sont lavés avec du DPBS -/- afin de récupérer le maximum de billes-protéine A et l'ensemble est transféré sur l'eppendorf Spin-X 0,45µm. La membrane d'eppendorf Spin-X 0,45µm avec les billes-protéine A est également lavée par DPBS -/- et à chaque fois centrifugée 1' à 5000rpm. Les billes-protéines restent accrochées sur la membrane. Elles sont éluées à l'aide d'une solution de tampon Glycine 0,1M à pH2,7 (laisser 45sec de contact entre le tampon et les billes avant la centrifugation) et d'une centrifugation de 1' à 7500rpm. Cette solution permet de décrocher la partie Fc des anticorps des billes-protéine A. Ce décrochage est récolté dans une eppendorf contenant un tampon Tris 1M à pH9 (volume de tampon Tris = 10% du volume total) pour obtenir une solution finale à pH neutre (environ 7,4). Plusieurs fractions d'élution sont nécessaires pour tout éluer (surtout si la production est importante). Le dosage au Nanodrop qui s'en suit permet de quantifier le rendement de production.

Il est conseillé également d'effectuer ensuite une étape dite de « dessalage » afin de ne pas laisser les anticorps dans la solution de tampon Tris-Glycine. On utilise pour cela une colonne PD10 Minitrap G-25, Miditrap ou Dessalting columns (GE Healthcare ou Cytiva). Après avoir rincé cette colonne avec du DPBS -/-, on y dépose la totalité du tampon Tris-Glycine contenant l'anticorps. On fait passer successivement 12 fois 100µL de DPBS -/- dans la colonne et on récolte l'éluât dans 12 eppendorfs. On peut enfin retourner doser toutes les fractions au Nanodrop pour estimer la quantité finale d'anticorps récolté. Les anticorps sont prêts à être utilisé pour des tests in vitro et ils doivent être filtrés sur minifiltre 0,22µm (Minisart de Sartorius) de façon stérile (de préférence sous une hotte) pour une utilisation *in vivo*.

3. Caractérisation in vitro des clones

3.1. Le tampon phosphate

Ce tampon ($H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$) est adapté du guide de Calbiochem® nommé « A guide for the preparation and use of buffers in biological system ». Il est préparé à l'aide d'un mélange de sodium phosphate dibasique (Na_2HPO_4) et de sodium phosphate monobasique dihydraté ($Na_2HPO_4.2\ H_2O$).

On prépare une solution stock au pH voulu de tampon phosphate à 200mM en mélangeant des volumes précis des solutions de phosphate monobasique et dibasique. La solution de phosphate monobasique 200mM est préparée en mélangeant 3,12gr de phosphate monobasique dihydraté (Sigma-Aldrich ; 156,01g/mol) dans 100mL d'eau milliQ déminéralisée. La solution de phosphate dibasique 200mM est préparée en mélangeant 2,85gr de phosphate dibasique anhydre (Sigma-Aldrich ; 141,96g/mol) dans 100mL d'eau milliQ. Les volumes précis à mélanger des deux solutions pour obtenir le pH souhaité sont recensés dans le tableau ci-dessous (Tableau …) :

Tableau 6 : Équilibre des deux solutions de phosphate mono et dibasique pour obtenir une solution finale de tampon phosphate à un pH donné.

pH	**5,65**	**5,8**	**6,0**	**6,2**	**6,4**	**6,6**	**6,8**	**7,0**	**7,2**	**7,4**	**7,6**	**7,8**	**8,0**
Phosphate monobasique (mL)	96	92	87,5	81,5	73,5	62,5	51,0	39,0	28,0	19,0	13,0	8,5	5,3
Phosphate dibasique (mL)	4	8	12,5	18,5	26,5	37,5	49,0	61,0	72,0	81,0	87,0	91,5	94,7

Pour obtenir les solutions filles de travail à Phosphate 20mM + NaCl 150mM, on utilise nos solutions stocks à 200mM au pH souhaité + NaCl 5M + eau milliQ. Pour 100mL de solution fille on mélange : 10mL de solution stock 200mM + 3mL de NaCl à 5m + 77mL d'eau milliQ. Autant pour le pH des solutions stocks que pour les solutions filles de travail, on vérifie le pH à l'aide d'un pH mètre et on ajoute si besoin au goutte à goutte de l'HCl (acide fort) ou du NaOH (base forte) à 1M.

3.2. ELISA

Les protéines dites de « coating » sont immobilisées sur la plaque ELISA 96 puits (F96 MaxiSorp Nunc-Immuno Plate à fond plat de chez Thermo Fisher Scientific) à 1µg/mL dans 100µL (solution mère de concentration [100] µg/mL) dans du PBS 1X stérile sur la nuit à 4°C recouvert de Parafilm (Bemis). La protéine immobilisée ici est de l'EGFR Fc humain (R&D Systems ou Sino Biological).

Le lendemain, les puits sont lavés avec 3 x 200µL de PBS 1X + 0,1% de Tween (détergent non ionique). 200µL de lait 2% dans du PBS 1X (saturant) est ajouté dans chaque puit et s'en suit une incubation de 1h30 minimum à TA. Après avoir retiré le saturant, l'anticorps primaire est ajouté à la concentration souhaitée dans un mélange PBS 1X – Tween 0,1% - Lait 2% (100µL) pour une incubation de 1 heure à TA. La plaque est lavée comme précédemment et l'anticorps secondaire (A0293 de chez Sigma Aldrich à diluer au 1/5000 selon le fournisseur ; anticorps anti IgG humain Fab spécifique) est ajouté dans 100µL du mélange PBS 1X – Tween 0,1% - Lait 2% pour une incubation de 1 heure à TA. La plaque est lavée comme précédemment et la révélation (coloration bleue) s'effectue pendant environ 5min avec 100µL de Tétraméthylbenzidine (Ultra TMB ELISA de chez Thermo Scientific). La réaction est arrêtée (coloration jaune) à l'aide de 50µL d'acide sulfurique 1M (H_2SO_4). La plaque est lue au Phérastar FS (BMG Labtech) ou au Multiskan EX Plate (Thermo) à la longueur d'onde de 450nm. L'analyse s'effectue sur le logiciel GraphPad Prism (version 8.0.1).

Un ELISA dose réponse s'effectue selon presque le même protocole avec comme seule différence un anticorps primaire incubé dans plusieurs puits à plusieurs concentrations croissantes (dilution puit par puit ou en cascade).

3.3. BIACORE

L'analyse de l'affinité (interaction protéine/ligand) des anticorps est effectuée à l'aide du BIACORE (T200 Cytiva) et selon la technique de Résonance Plasmonique de Surface (ou SPR) (plateforme PP2I) au sein d'un tampon composé de 10mM PBS pH 7,4 + 0,05% P2O. Cette technique se base sur les mesures de variations de l'angle de réfraction d'un faisceau de lumière incident monochromatique sur une puce contenant la protéine ou ligand d'intérêt. L'anticorps d'intérêt est piégé à la surface de la puce à 20nM (600-1000 RU) par un anti-Fc préalablement immobilisé de façon covalente par liaison amine la puce de capteur CM5S (couche de dextran sur une feuille d'or et une plaque de verre prise en sandwich entre une micro fluidique et un prisme). On injecte, en flux continu (50µL/min), l'antigène d'intérêt (EGFR humain monomérique) à 100nM pour le Cetuximab et Panitumumab et 200nM pour les autres dans un tampon phosphate 20mM NaCl 150mM pH6 ou 7,4 avec 0,05% de surfactant P2O à 25°C. Les interactions protéine/ligand font varier l'angle de réfraction (ou angle de résonance) et la mesure est relevée en unité de résonance (ou RU) sur le logiciel T200 3.0. On peut donc en déduire les constantes d'association (k_{on}) puis de dissociation (k_{off}) avec une solution tampon neutre à l'aide du graphique « Fit en changement de conformation ». On combine ces deux constantes afin de quantifier le Kd en utilisant un modèle Langmuir 1 :1 et en soustrayant le signal du tampon de contrôle (sans protéine immobiliée). On obtient enfin l'affinité (en molaire) par la formule : Affinité = 1/Kd.

4. Analyse cellulaire des anticorps

4.1. Culture cellulaire

Les lignées sont cultivées en DMEM + SVF10% ou en Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640 de Gibco) + SVF10% selon les recommandations du fournisseur (ATCC). Nous avons utilisé les lignées adhérentes HCC 827 (adénocarcinome du poumon, CRL-2868), MDAMB 231 (adénocarcinome de la glande mammaire, HTB-26), SW 620 (adénocarcinome du colon, CCL-227), BxPC3 (adénocarcinome du pancréas, CRL-1687), SKOV3 (adénocarcinome de l'ovaire, HTB-77) ou encore A 431 (carcinome épidermoïde, CRL-1555). Pour un contrôle nous avons également utilisé la lignée THP1 (monocytes issus de leucémie aiguë monoblastique, TIB-202).

Lors d'un passage d'une lignée, les cellules sont lavées avec du DPBS +/+ stérile et décollées à l'aide de Trypsine (0,05% Trypsine-EDTA de chez Gibco) à 37°C dans l'incubateur fixe. Une fois décollées, la centrifugation à 1000rpm pendant 5' permet d'éliminer les cellules mortes flottantes et de récupérer le culot qui est réparti dans le nombre de flasques/boîtes (Sarstedt ou Falcon) d'intérêts à la dilution voulue dans le milieu adéquat.

4.2. Expression de la protéine mEGFR-pEF-huFc-6His en transmembranaire

La lignée stable HEK-FcTM permet une expression d'immunoglobuline (Ig) transmembranaire (domaine transmembranaire IgG1 + CH2 + CH3 + région charnière). Cette lignée a été obtenue par transduction lentivirale sur HEK293 sauvage et l'expression transmembranaire de l'Ig est sous le contrôle de l'opérateur TetO inductible à la doxycycline. Elle est cultivée en DMEM + SVF10% supplémentée en antibiotiques Hygromycine (InvivoGen à 1g/mL) et Blasticidine (InvivoGen à 50mg/mL) : pour un volume de 20mL de DMEM + SVF10%, on ajoute 20µL d'Hygromycine et 5µL de Blasticidine.

Quatre jours avant la transfection, 400 000 cellules sont ensemencées dans 1mL dans une plaque 6 puits (Sarstedt). Les cellules sont transfectées (protocole précédemment décrit) avec du muEGFR-pEF-huFc-6His et du PEI (ratio 1:6). 4 à 6h après la transfection, le milieu est remplacé avec du milieu DMEM + SVF10% et Doxycycline (1µg/mL). 36 heures après, les cellules sont récupérées après trypsination dans du PBS-BSA 3% et transférées dans une plaque 96 puits à fond rond (Sarstedt). Les anticorps primaire et secondaire sont successivement ajoutés et entrecoupés de lavages. Les cellules sont resuspendues dans 200µL de PBS.

L'analyse s'effectue sur le Cytoflex (Beckman Coulter) par Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). Nous arrêtons l'analyse à 10 000 évènements. Les résultats sont traités à l'aide du logiciel FlowJo (version 10.8.1).

4.3. Quantification du nombre de récepteurs à l'EGF sur les lignées cellulaires

Elle s'effectue à l'aide d'un kit Quantum Simply Cellular (Bangs Laboratories) sur les lignées cellulaires choisies (lignées exprimant EGFR dans notre cas). Une population de 5 billes est fournie détenant chacune une capacité croissante de fixation de l'anticorps par sa portion Fc (Antibody Binding Capacity ou ABC). L'anticorps anti-EGFR (lot clinique de Cetuximab ERBITUX®) est directement conjugué avec de la fluorescence et est utilisé sur les billes et sur les lignées. Le marquage s'effectue par réduction douce au Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) des anticorps pour casser les ponts disulfures. La complexation du maléimide couplé à la fluorescence Alexa Fluor 680 s'effectue sur les fonctions thiols libres pendant 2h (en théorie 8 sites possibles mais souvent 4-6 molécules fluo pour 1 anticorps). Une étape terminale de dessalage, comme décrite précédemment, est nécessaire.

On prépare 100 000 cellules (dans 100µL de PBS + Albumine Sérique Bovine (BSA) 3%) ou billes (50µL flacon mère + 50µL PBS-BSA 3%) par puits dans une plaque 96 puits à fond rond (Sarstedt). On utilise l'anticorps fluorescent à la concentration de 1µg/mL (10 excès molaire d'anticorps par rapport aux sites de fixations) directement dans les puits avec les cellules ou les billes. Après 1h d'incubation à 4°C et à l'abri de la lumière, les puits sont lavés 3 fois avec 200µL de PBS-BSA 3% (centrifugation 5' ; 1000rpm ; 4°C entre chaque lavage). Tout est resuspendu dans 200µL de PBS-BSA 3% et analysé au cytomètre.

L'analyse s'effectue sur le Cytoflex (Beckman Coulter) par Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). Nous arrêtons l'analyse à 10 000 évènements. Les résultats sont traités à l'aide du logiciel FlowJo (version 10.8.1).

4.4. Cytométrie des anticorps mutés Fc-LALAPG sur la lignée THP1

Les cellules THP1 sont récupérées et mises dans des plaques 96 puits à fond rond (Sarstedt) à hauteur de 200 000 cellules par puit dans 100µL de PBS-BSA 3%. Les anticorps primaires sont incubés à la concentration saturante de 20µg/mL pendant 1h à TA. Le lavage est effectué 3 fois avec 200µL de PBS-BSA 3% (centrifugation 5' ; 1000rpm ; 4°C entre chaque lavage). L'anticorps secondaire est ajouté (Alexa Fluor 647 - CSA 3835 de chez Thermo Fisher ; anticorps de souris anti Fab IgG humaine) dans 100µL de PBS-BSA 3% (dilution au 1/1000^{ième} recommandée par le fournisseur) pendant 1h sous aluminium à 4°C. Les mêmes lavages sont effectués et l'on resuspend les cellules avec 200µL de PBS.
L'analyse s'effectue sur le Cytoflex (Beckman Coulter) par Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). Nous arrêtons l'analyse à 10 000 évènements. Les résultats sont traités à l'aide du logiciel FlowJo (version 10.8.1).

4.5. Cytométrie et fixation des anticorps sur les lignées

Les cellules d'intérêts en culture sont récupérées et mises dans des plaques 96 puits à fond rond (Sarstedt) à hauteur de 200 000 cellules par puit dans 100µL de PBS-BSA 3%. L'anticorps primaire d'intérêt est incubé à la concentration saturante de 20µg/mL pendant 1h à TA. Le lavage est effectué 3 fois avec 200µL de PBS-BSA 3% (centrifugation 5' ; 1000rpm ; 4°C entre chaque lavage). L'anticorps secondaire est ajouté (Alexa Fluor 647 - CSA 3835 de chez Thermo Fisher ; anticorps de souris anti Fab IgG humaine) dans 100µL de PBS-BSA 3% (dilution au 1/1000^{ième} recommandée par le fournisseur) pendant 1h sous aluminium à 4°C. Les mêmes lavages sont effectués et l'on resuspend les cellules avec 200µL de PBS.
Les cellules HEK-FcTM exprimant l'EGFR murin en extracellulaire via une insertion transmembranaire sont utilisées pour évaluer la fixation de nos anticorps anti EGFR murin. Le même protocole que précédemment est utilisé en utilisant les anticorps primaires d'intérêts à la concentration saturante de 20µg/mL.
L'analyse s'effectue sur le Cytoflex (Beckman Coulter) par Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). Nous arrêtons l'analyse à 10 000 évènements. Les résultats sont traités à l'aide du logiciel FlowJo (version 10.8.1).

4.6. Test fixation/internalisation des anticorps

Les cellules utilisées pour ce test sont les lignées HCC 827, MDAMB 231 et SW 620 cultivées dans DMEM ou RPMI + SVF10%. Elles sont transférées dans des plaques 12 puits (Sarstedt) à hauteur de

300 000 cellules/mL/puit. Deux jours plus tard, les cellules sont à 70-80% de confluence et le milieu est changé pour 2mL du milieu sans SVF afin de ralentir la pousse. Les anticorps d'intérêts anti-EGFR sont ajoutés à la concentration souhaitée (par exemple : 20µL Cetuximab pour une [C]f = 0,05µg/mL) et à différents temps (1min, 4h, 12h, 24h). Nos anticorps ont été testés à différentes concentrations : [C]f = 0,05 ; 0,5 ; 1,25 ; 5µg/mL. On récolte 400µL de surnageant de chaque puit.

On quantifie ensuite cette fixation/internalisation en effectuant un ELISA sur ce surnageant (cf protocole ELISA de fixation 3.1). L'inverse de la quantité d'anticorps retrouvée dans le surnageant correspond donc à celle fixée et/ou internalisée au fil du temps (temps de référence 1min). L'analyse statistique est effectuée à l'aide d'un test 2way ANOVA groupé avec * si P-value < 0,05 ou *** si P-value < 0,001.

5. Tests *in vivo*

5.1. Immunohistochimie (IHC)

5.1.1. Culture cellulaire, xénogreffe et suivi de taille

Les lignées cellulaires A 431 (DMEM + SVF10%) et MDAMB 231 (RPMI + SVF10%) sont cultivées et amplifiées pour obtenir un total de 50.10^6 (A 431) et 150.10^6 (MDAMB 231) cellules le jour de la greffe. Les cellules sont testées myco free (1mL de surnageant testé) et murin free (1.10^6 de cellules en culot sec) en vue de la xénogreffe. Les cellules sont trypsinées (Gibco), comptées (lames KOVA) et concentrées dans du milieu sans sérum. Tout est effectué en salle de culture sous la hotte pour garantir un produit final stérile.

Les souris sont des femelles swiss nude au nombre de 31 (Charles River) reçues à 6 semaines. Elles sont greffées avec 1.10^6 (A 431) et 3.10^6 (MDAMB 231) de cellules dans 100µL de milieu sans sérum en sous cutané (SC) selon les recommandations du comité d'éthique. Les deux lignées sont greffées en décalé (11 jours) pour tenir compte de la vitesse de pousse différente entre les deux lignées. Chaque animal reçoit sur son flanc droit les cellules A 431 et sur son flanc gauche les cellules MDAMB 231.

Le suivi de pousse tumorale est effectué à raison de 2 fois par semaines pendant 2 semaines puis 3 fois par semaines à l'aide d'une mesure au pied à coulisse (volume tumoral en mm^3 = longueur x largeur x épaisseur). L'injection des anticorps s'effectue J+30 post greffe MDAMB 231 et J+20 post greffe A431 sur des tumeurs de taille variable entre 250 et 1400mm3 pour A 431 et entre 100 et 800mm3 pour MDAMB 231. Cette variabilité a été prise en considération par répartition homogène des tumeurs de tailles différentes entre chaque groupe d'anticorps.

5.1.2. Injection des anticorps

Les anticorps stériles sont injectés chez la souris en intra péritonéal (IP). La quantité de 300µg d'anticorps a été choisie et le volume d'injection varie entre 100-500µL en fonction des concentrations

de chaque anticorps. Le volume maximum de 500µL n'a pas été dépassé (volume limite correspondant à 10% du poids de l'animal).

5.1.3. Sacrifice et quantification IHC

Le point limite est défini à 1500mm3. Les souris sont sacrifiées 96h post injection des anticorps par inhalation de CO2 (cage à CO2) suivant un cycle précis respectant les règles éthiques. Les tumeurs sur les deux flans sont récupérées après dissection en gardant de la peau pour l'orientation de la tumeur et un contrôle de tissu sain. Ces tumeurs sont mises en cassettes dans du formol pendant 24h dans des flacons prévus à cet effet. Le lendemain, les cassettes sont rincées avec du PBS (3 rinçages par flacon) et stockées dans de l'éthanol à 70% (Éthanol mère à 96% de chez HoneyWell).

Les flacons sont transmis au Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier (RHEM) afin qu'ils effectuent le protocole de mise en bloc de paraffine, de coupe (multi-blocs/sériées) d'épaisseur 3µm et de marquage immuno histochimique effectué à l'aide d'un anti EGFR (Roche ; Cat#790-4347) dilué au ½, d'un anti IgG (Dako ; Cat#A0423) dilué au 1/2000 et d'un anti CD31 (Abcam ; Cat#Ab28364). Ils ont également effectué la coloration H&E (hematoxylin II cat#790-2208). Pour l'EGFR, le renforcement du signal a été effectué à l'aide d'un kit de détection anti-lapin OmniMap (Cat#05266548001) tandis que pour l'IgG et le CD31 le kit de détection Discovery HRP anti-HQ (Cat#07017936001) a été utilisé. Ce marquage a été effectué sur l'instrument de coloration automatisé VENTANA discovery ultra (Ventana Medical Systems) avec une récupération des épitopes par la solution CC1 (Cat#950-224) à 95°C. L'imagerie a été effectuée sur microscope à fond clair au grossissement x20 (Hamamatsu NanoZoomer 2.0-HT scanner).

L'analyse IHC est effectuée à l'aide des logiciels NDP.view 2 (coloration H&E) et Qupath 0.3.2 (quantification du marquage humain IgG des coupes). Les zones d'intérêts du marquage IgG anti EGFR sont définies en regard des zones positives à l'EGFR (excluant donc les zones nécrotiques). L'analyse sur QuPath est effectuée à haute résolution (0,88 µm/px), sur la coloration au DAB (chromogène HRP classique de coloration marron, Cat#05266645001) et avec un seuil de 0,2 fixé selon les recommandations du logiciel. Les valeurs supérieures à 0,2 sont définies comme positives et celle inférieures comme négatives. Les résultats sont extraits et mis en forme à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 8.0.1). L'analyse statistique est effectuée à l'aide de tests 1way ou 2way ANOVA groupé avec * si P-value < 0,05 ; ** si P-value < 0,01 ; *** si P-value < 0,001 et ns pour absence de significativité.

5.2. Tomographie par Émission de Positons (TEP)

5.2.1. Culture cellulaire, xénogreffe et suivi de taille

Les lignées cellulaires A 431 (DMEM + SVF10%) et MDAMB 231 (RPMI + SVF10%) sont cultivées et amplifiées pour obtenir un total de 150.10^6 (A 431) et 300.10^6 (MDAMB 231) cellules le jour de la

greffe. Les cellules sont testées myco free (1mL de surnageant testé) et murin free (1.10^6 de cellules en culot sec) en vue de la xénogreffe. Les cellules sont trypsinées (Gibco), comptées (lames KOVA) et concentrées dans du milieu sans sérum. Tout est effectué en salle de culture sous la hotte pour garantir un produit final stérile.

Les souris sont des femelles athymic nude au nombre de 40 (Charles River) reçues à 4 semaines. Elles sont greffées avec $1,5.10^6$ (A 431) et 5.10^6 (MDAMB 231) de cellules dans 100µL de milieu sans sérum en sous cutané (SC) selon les recommandations du comité d'éthique. Les deux lignées sont greffées en décalé (14 jours) pour tenir compte de la vitesse de pousse différente entre les deux lignées. Chaque animal reçoit sur son flanc droit les cellules A 431 et sur son flanc gauche les cellules MDAMB 231.

Le suivi de pousse tumorale est effectué à raison de 2 fois par semaines pendant 2 semaines puis 3 fois par semaines à l'aide d'une mesure au pied à coulisse (volume tumoral en mm^3 = longueur x largeur x épaisseur). L'injection des anticorps s'effectue J+26 post greffe MDAMB 231 et J+12 post greffe A431 sur des tumeurs de taille variable entre 100 et 1000mm3 pour A 431 et entre 125 et 1000mm3 pour MDAMB 231. Cette variabilité a été prise en considération par répartition homogène des tumeurs de tailles différentes entre chaque groupe d'anticorps.

5.2.2. Bioconjugaison des anticorps

Les anticorps sont bioconjugués avec l'agent chélateur pSCN-Bn-déféroxamine (pSCN-Bn-DFO), adéquat pour le radiomarquage au Zirconium. On garde de côté 10µL des anticorps avant la bioconjugaison afin de comparer la spectrométrie de masse au MALDI-TOF avant et après la bioconjugaison. On doit changer la solution tampon initiale des anticorps (DPBS -/-) par une solution de DPBS dit « chelex » dépourvue de métaux. Cette solution est obtenue par ajout de 5gr de résine Chelex (Bio-Rad) dans 100mL de solution DPBS -/- et est agitée sur la nuit à température ambiante. Le lendemain, elle est filtrée sur filtre 0,22µm (Merck-Stericup Quick Release) et le pH est ajusté jusqu'à 7,4 par ajout d'acide chlorhydrique (HCl). On transfère le volume total des anticorps dans un filtre Amicon Ultra-4 (Merck-Millipore) que l'on centrifuge à 4000rpm pendant 10min. Cette centrifugation se base sur une exclusion de taille (*cut off* 30kDa) qui permet de garder en amont du filtre les anticorps. On ajoute le PBS chelexé (3,5mL) et on centrifuge de nouveau à 4000rpm pendant 15 minutes jusqu'à obtenir un volume final X en amont du filtre permettant d'avoir une concentration d'anticorps finale > à 2mg/mL. Cette concentration est vérifiée au Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) et on doit récupérer minimum 80% de la quantité initiale.

Le pH de la solution d'anticorps-PBS chelexé est ajustée à 8,4 par ajout progressif (10µL) de carbonate de sodium (Na_2CO_3 à 0,2M) afin que les lysines de l'anticorps soient déprotonées et accessibles au pSCN-Bn-DFO. Le pSCN-Bn-DFO est solubilisé, au préalable, dans du diméthylsulfoxide (DMSO) (très peu soluble dans l'eau) à une concentration finale de 10mg/mL. Le pSCN-Bn-DFO est ensuite ajouté en

excès (ratio DFO/mAb compris entre 15 et 20) avec un volume inférieur à 10% du volume de la solution anticorps-PBS chelexé. L'ajout du pSCN-Bn-DFO (quelques µL) est effectué très délicatement pour éviter la précipitation totale du chélateur. L'ensemble est mis à 37°C sur un agitateur pendant au moins 90 minutes.

Après l'étape de bioconjugaison, la purification est effectuée à l'aide d'une colonne PD-10 (Thermo Fisher Scientific - Cytiva) préalablement conditionnée par du PBS chelexé (25mL). On y ajoute l'anticorps bioconjugué dans du PBS chelexé (2,6mL). On élue à l'aide de 2mL de PBS chelexé et on transfert l'éluat dans un Amicon Ultra-4 (Merck-Millipore). On ajoute 2mL de tampon PBS chelexé et on centrifuge à 4000rpm pendant 8min. On récupère un volume d'environ 300µL en amont du filtre que l'on dose au Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). On récupère 10µL du produit final pour l'analyse au MALDI-TOF. Le dosage final peut être sûr estimé si notre ratio pSCN-Bn-DFO /mAb > 2 et, dans ce cas, il faudra ajuster la concentration mesurée. Les anticorps sont conservés à 4°C.

Cette bioconjugaison a été supervisée par la plateforme IPAM. L'analyse au MALDI-TOF a été effectuée par le Dr Valette Gilles du laboratoire des mesures physiques (LMP) de l'Université de Montpellier (Institut des Biomolécules Max Mousseron - IBMM).

5.2.3. Radiomarquage et injection des anticorps

Les anticorps-DFO sont mis en solution avec le [89Zr]Zr-oxalate (Perkin Elmer) (30 MBq) préalablement neutralisé à un pH de 6,9-7,2 avec du Na_2CO_3 à 1M. Le complexe anticorps-DFO + [89Zr]Zr-oxalate sont incubés à température ambiante pendant 1 heure avec une agitation douce. La pureté et l'efficacité du radiomarquage sont déterminées par chromatographie sur couche mince avec comme phase mobile du citrate de sodium à pH 5 (0,1M). Le rendement du radiomarquage et la pureté radiochimique sont en routine > 99%. Aucune étape de purification n'est effectuée par la suite. Les radioimmunoconjugués sont obtenus avec une activité spécifique de 200MBq/mg et mis en solution dans du NaCl 0,9% pour une utilisation *in vivo*.

Les anticorps ^{89}Zr-DFO-Ab sont injectés en voie intra péritonéale (200µg, 150µCi) à chaque souris au sein de leurs groupes respectifs.

Ce radiomarquage et l'injection des anticorps ont été supervisé par la plateforme IPAM.

5.2.4. Imagerie TEP-TDM

Les images TEP puis TDM s'effectuent aux temps 48h, 72h, 96h et 168h après anesthésie des souris à l'isofluorane 4%. Les images sont obtenues à l'aide d'un système Mediso NanoScan PET82S/CT80 (NN-803039-PC). L'acquisition ainsi que la reconstruction des images s'effectue avec le logiciel Nucline NanoScan 3.00.020.000. Les acquisitions sont effectuées pendant 20min pour les temps 48h et 72h, pendant 30min pour le temps 96h et pendant 1h pour le temps 168h (coïncidence mode 1-5 et coïncidence time windows : 5ns). Le traitement des images s'effectue grâce au logiciel Inteview™

FusionTM ou 3D Slicer (version 4.10.2). Les régions d'intérêts sont définies manuellement sur les images TDM sur plusieurs plans afin d'obtenir des résultats reconstruits en trois dimensions de l'organe (protocole « Wholebody » et resolution « normal ») et les résultats sont exprimés en % d'activité injecté par cm^3 à l'aide de l'activité fournie via l'image TEP. La même méthodologie est appliquée à tous les organes étudiés. Les résultats sont extraits et mis en forme à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 8.0.1) en tenant compte de la décroissance radioactive propre du radio-isotope Zirconium 89. L'analyse statistique est effectuée à l'aide de tests 1 way ou 2way ANOVA groupé avec * si P-value < 0,05 ; ** si P-value < 0,01 ; *** si P-value < 0,001 et ns pour absence de significativité. L'imagerie TEP-TDM a été contrôlée et effectuée par la plateforme IPAM.

5.2.5.Sacrifice et biodistribution conventionnelle

Le point limite est défini à 1500mm3. Les souris sont sacrifiées 168h post injection des anticorps par inhalation de CO2 (cage à CO2) suivant un cycle précis ou par dislocation cervicale respectant les règles d'éthiques dans les deux cas. Les tumeurs sur les deux flans sont récupérées après dissection ainsi que le foie pour effectuer une biodistribution conventionnelle. Le nombre de coups par minute (CPM) est déterminé par compteur gamma (LabLogic ScienceTec – Hidex AMG-425-601) et les résultats sont exprimés en % d'activité injectée (AI) par gramme de tissus en tenant compte de la décroissance radioactive propre du radio-isotope Zirconium 89. Nous avons ensuite comparé ces résultats avec ceux de l'imagerie TEP-TDM. Les résultats sont extraits et mis en forme à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 8.0.1). L'analyse statistique est effectuée à l'aide de tests 1way ou 2way ANOVA groupé avec * si P-value < 0,05 ; ** si P-value < 0,01 ; *** si P-value < 0,001 et ns pour absence de significativité.
La biodistribution conventionnelle a été supervisée par la plateforme IPAM.

BIBLIOGRAPHIE

Adams, Gregory P, Robert Schier, Adrian M McCall, Heidi H Simmons, Eva M Horak, R Katherine Alpaugh, James D Marks, and Louis M Weiner. 2001. 'High Affinity Restricts the Localization and Tumor Penetration of Single-Chain Fv Antibody Molecules', June, 7.

Ahmed, Alysia A., Sravya R. Keremane, Jost Vielmetter, and Pamela J. Bjorkman. 2016. 'Structural Characterization of GASDALIE Fc Bound to the Activating Fc Receptor FcγRIIIa'. *Journal of Structural Biology* 194 (1): 78–89. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.02.001.

Al Ojaimi, Yara, Timothée Blin, Juliette Lamamy, Matthieu Gracia, Aubin Pitiot, Caroline Denevault-Sabourin, Nicolas Joubert, et al. 2022. 'Therapeutic Antibodies – Natural and Pathological Barriers and Strategies to Overcome Them'. *Pharmacology & Therapeutics* 233 (May): 108022. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.108022.

Allen, Kevin J. H., Rubin Jiao, Jason Li, Denis R. Beckford-Vera, and Ekaterina Dadachova. 2022. 'In Vitro and In Vivo Characterization of 89Zirconium-Labeled Lintuzumab Molecule'. *Molecules* 27 (19): 6589. https://doi.org/10.3390/molecules27196589.

Anderson, Mark G., Hugh D. Falls, Michael J. Mitten, Anatol Oleksijew, Kedar S. Vaidya, Erwin R. Boghaert, Wenqing Gao, et al. 2020. 'Targeting Multiple EGFR-Expressing Tumors with a Highly Potent Tumor-Selective Antibody–Drug Conjugate'. *Molecular Cancer Therapeutics* 19 (10): 2117–25. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0149.

Arnold, James N., Mark R. Wormald, Robert B. Sim, Pauline M. Rudd, and Raymond A. Dwek. 2007. 'The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins'. *Annual Review of Immunology* 25 (1): 21–50. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702.

Arribas, Joaquín, José Baselga, Kim Pedersen, and Josep Lluís Parra-Palau. 2011. 'P95HER2 and Breast Cancer'. *Cancer Research* 71 (5): 1515–19. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3795.

Arteaga, Maria Elene, Nuris Nuris Ledon, Angel Casaco, Balia Pardo, Miriam Garcia, Magela Boleda, Lisel Vina, et al. 2007. 'Systemic and Skin Toxicity in Cercopithecus Aethiops Sabaeus Monkeys Treated during 26 Weeks with a High Intravenous Dose of the Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Nimotuzumab'. *Cancer Biology & Therapy* 6 (9): 1386–91. https://doi.org/10.4161/cbt.6.9.4539.

Baah, Stephanie, Mark Laws, and Khondaker Miraz Rahman. 2021. 'Antibody–Drug Conjugates—A Tutorial Review'. *Molecules* 26 (10): 2943. https://doi.org/10.3390/molecules26102943.

Bargh, Jonathan D., Stephen J. Walsh, Albert Isidro-Llobet, Soleilmane Omarjee, Jason S. Carroll, and David R. Spring. 2020. 'Sulfatase-Cleavable Linkers for Antibody-Drug Conjugates'. *Chemical Science* 11 (9): 2375–80. https://doi.org/10.1039/C9SC06410A.

Bargmann, C. I., and R. A. Weinberg. 1988. 'Oncogenic Activation of the Neu-Encoded Receptor Protein by Point Mutation and Deletion.' *The EMBO Journal* 7 (7): 2043–52. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03044.x.

Baron, Jeffrey, and Eunice S. Wang. 2018. 'Gemtuzumab Ozogamicin for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia'. *Expert Review of Clinical Pharmacology* 11 (6): 549–59. https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1478725.

Bergman, Joakim, Joachim Burman, Tommy Bergenheim, and Anders Svenningsson. 2021. 'Intrathecal Treatment Trial of Rituximab in Progressive MS: Results after a 2-Year Extension'. *Journal of Neurology* 268 (2): 651–57. https://doi.org/10.1007/s00415-020-10210-0.

Bergman, Joakim, Joachim Burman, Jonathan D. Gilthorpe, Henrik Zetterberg, Elena Jiltsova, Tommy Bergenheim, and Anders Svenningsson. 2018. 'Intrathecal Treatment Trial of Rituximab in Progressive MS: An Open-Label Phase 1b Study'. *Neurology* 91 (20): e1893–1901. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006500.

Bindon, C I, G Hale, M Brüggemann, and H Waldmann. 1988. 'Human Monoclonal IgG Isotypes Differ in Complement Activating Function at the Level of C4 as Well as C1q.' *Journal of Experimental Medicine* 168 (1): 127–42. https://doi.org/10.1084/jem.168.1.127.

Bird, B. R.J. H., and S. M. Swain. 2008. 'Cardiac Toxicity in Breast Cancer Survivors: Review of

Potential Cardiac Problems'. *Clinical Cancer Research* 14 (1): 14–24. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1033.

Bonvin, Pauline, Sophie Venet, Gaëlle Fontaine, Ulla Ravn, Franck Gueneau, Marie Kosco-Vilbois, Amanda El Proudfoot, and Nicolas Fischer. 2015. ' *De Novo* Isolation of Antibodies with PH-Dependent Binding Properties'. *MAbs* 7 (2): 294–302. https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1006993.

Brägelmann, Johannes, Carina Lorenz, Sven Borchmann, Kazuya Nishii, Julia Wegner, Lydia Meder, Jenny Ostendorp, et al. 2021. 'MAPK-Pathway Inhibition Mediates Inflammatory Reprogramming and Sensitizes Tumors to Targeted Activation of Innate Immunity Sensor RIG-I'. *Nature Communications* 12 (1): 5505. https://doi.org/10.1038/s41467-021-25728-8.

Budde, Lihua E., Sarit Assouline, Laurie H. Sehn, Stephen J. Schuster, Sung-Soo Yoon, Dok Hyun Yoon, Matthew J. Matasar, et al. 2022. 'Single-Agent Mosunetuzumab Shows Durable Complete Responses in Patients With Relapsed or Refractory B-Cell Lymphomas: Phase I Dose-Escalation Study'. *Journal of Clinical Oncology* 40 (5): 481–91. https://doi.org/10.1200/JCO.21.00931.

Cartenì, G., R. Fiorentino, L. Vecchione, B. Chiurazzi, and C. Battista. 2007. 'Panitumumab a Novel Drug in Cancer Treatment'. *Annals of Oncology* 18 (June): vi16–21. https://doi.org/10.1093/annonc/mdm218.

Carter, P, L Presta, C M Gorman, J B Ridgway, D Henner, W L Wong, A M Rowland, C Kotts, M E Carver, and H M Shepard. 1992. 'Humanization of an Anti-P185HER2 Antibody for Human Cancer Therapy.' *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (10): 4285–89. https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4285.

Casalini, Patrizia, Marilena V. Iorio, Enrico Galmozzi, and Sylvie Ménard. 2004. 'Role of HER Receptors Family in Development and Differentiation: HERs IN DEVELOPMENT AND DIFFERENTIATION'. *Journal of Cellular Physiology* 200 (3): 343–50. https://doi.org/10.1002/jcp.20007.

Castellarin, Mauro, Caroline Sands, Tong Da, John Scholler, Kathleen Graham, Elizabeth Buza, Joseph A. Fraietta, Yangbing Zhao, and Carl H. June. 2020. 'A Rational Mouse Model to Detect On-Target, off-Tumor CAR T Cell Toxicity'. *JCI Insight* 5 (14): e136012. https://doi.org/10.1172/jci.insight.136012.

Chan, Conrad, Humphrey Fonge, Karen Lam, and Raymond M. Reilly. 2020. 'Effectiveness and Normal Tissue Toxicity of Auger Electron (AE) Radioimmunotherapy (RIT) with [111In]In-Bn-DTPA-Nimotuzumab in Mice with Triple-Negative or Trastuzumab-Resistant Human Breast Cancer Xenografts That Overexpress EGFR'. *Nuclear Medicine and Biology* 80–81 (January): 37–44. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2019.10.001.

Chang, Hwai Wen, Gerhard Frey, Haizhen Liu, Charles Xing, Lawrence Steinman, William J. Boyle, and Jay M. Short. 2021. 'Generating Tumor-Selective Conditionally Active Biologic Anti-CTLA4 Antibodies via Protein-Associated Chemical Switches'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118 (9): e2020606118. https://doi.org/10.1073/pnas.2020606118.

Chapman, Kenneth R., Frank C. Albers, Bradley Chipps, Xavier Muñoz, Gilles Devouassoux, Miguel Bergna, Dmitry Galkin, et al. 2019. 'The Clinical Benefit of Mepolizumab Replacing Omalizumab in Uncontrolled Severe Eosinophilic Asthma'. *Allergy* 74 (9): 1716–26. https://doi.org/10.1111/all.13850.

Chen, Yang, Guanghua Liu, Lifang Guo, Hui Wang, Yan Fu, and Yongzhang Luo. 2015. 'Enhancement of Tumor Uptake and Therapeutic Efficacy of EGFR-Targeted Antibody Cetuximab and Antibody-Drug Conjugates by Cholesterol Sequestration: Enhancement of Uptake and Efficacy of EGFR-Targeted Agents'. *International Journal of Cancer* 136 (1): 182–94. https://doi.org/10.1002/ijc.28950.

Chirmule, Narendra, Vibha Jawa, and Bernd Meibohm. 2012. 'Immunogenicity to Therapeutic Proteins: Impact on PK/PD and Efficacy'. *The AAPS Journal* 14 (2): 296–302. https://doi.org/10.1208/s12248-012-9340-y.

Chistiakov, Dimitry A., Ivan V. Chekhonin, and Vladimir P. Chekhonin. 2017. 'The EGFR Variant III Mutant as a Target for Immunotherapy of Glioblastoma Multiforme'. *European Journal of Pharmacology* 810 (September): 70–82. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.064.

Chung, Christine H. 2008. 'Cetuximab-Induced Anaphylaxis and IgE Specific for Galactose- α-1,3-Galactose', 13.

Chuntova, Pavlina, Yafei Hou, Ryosuke Naka, Akane Yamamichi, Tiffany Chen, Yitzhar Goretsky, Ryusuke Hatae, et al. 2022. 'Novel EGFRvIII-CAR Transgenic Mice for Rigorous Preclinical Studies in Syngeneic Mice'. *Neuro-Oncology* 24 (2): 259–72. https://doi.org/10.1093/neuonc/noab182.

Cilliers, Cornelius, Bruna Menezes, Ian Nessler, Jennifer Linderman, and Greg M. Thurber. 2018. 'Improved Tumor Penetration and Single-Cell Targeting of Antibody–Drug Conjugates Increases Anticancer Efficacy and Host Survival'. *Cancer Research* 78 (3): 758–68. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1638.

Coiffier, B. 2007. 'Rituximab Therapy in Malignant Lymphoma'. *Oncogene* 26 (25): 3603–13. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210376.

Cragg, Mark S., Suzanne M. Morgan, H. T. Claude Chan, B. Paul Morgan, A. V. Filatov, Peter W. M. Johnson, Ruth R. French, and Martin J. Glennie. 2003. 'Complement-Mediated Lysis by Anti-CD20 MAb Correlates with Segregation into Lipid Rafts'. *Blood* 101 (3): 1045–52. https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1761.

Dall'Acqua, William F., Melissa M. Damschroder, Jingli Zhang, Robert M. Woods, Lusiana Widjaja, Julie Yu, and Herren Wu. 2005. 'Antibody Humanization by Framework Shuffling'. *Methods* 36 (1): 43–60. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.01.005.

Dall'Acqua, William F., Peter A. Kiener, and Herren Wu. 2006. 'Properties of Human IgG1s Engineered for Enhanced Binding to the Neonatal Fc Receptor (FcRn)'. *Journal of Biological Chemistry* 281 (33): 23514–24. https://doi.org/10.1074/jbc.M604292200.

Davies, Andrew, Francesco Merli, Biljana Mihaljević, Santiago Mercadal, Noppadol Siritanaratkul, Philippe Solal-Céligny, Axel Boehnke, et al. 2017. 'Efficacy and Safety of Subcutaneous Rituximab versus Intravenous Rituximab for First-Line Treatment of Follicular Lymphoma (SABRINA): A Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial'. *The Lancet Haematology* 4 (6): e272–82. https://doi.org/10.1016/S2352-3026(17)30078-9.

Davis, Joshua S., David Ferreira, Emma Paige, Craig Gedye, and Michael Boyle. 2020. 'Infectious Complications of Biological and Small Molecule Targeted Immunomodulatory Therapies'. *Clinical Microbiology Reviews* 33 (3): e00035-19. https://doi.org/10.1128/CMR.00035-19.

Della-Torre, Emanuel, Corrado Campochiaro, Emanuele Bozzalla Cassione, Luigi Albano, Simonetta Gerevini, Stefania Bianchi-Marzoli, Enrica Bozzolo, et al. 2018. 'Intrathecal Rituximab for IgG $_4$ -Related Hypertrophic Pachymeningitis'. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 89 (4): 441–44. https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-316519.

Desnoyers, Luc R., Olga Vasiljeva, Jennifer H. Richardson, Annie Yang, Elizabeth E. M. Menendez, Tony W. Liang, Chihunt Wong, et al. 2013. 'Tumor-Specific Activation of an EGFR-Targeting Probody Enhances Therapeutic Index'. *Science Translational Medicine* 5 (207). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006682.

Deveuve, Quentin, Valérie Gouilleux-Gruart, Gilles Thibault, and Laurie Lajoie. 2019. 'La région charnière des anticorps thérapeutiques: L'importance capitale d'une courte séquence'. *médecine/sciences* 35 (12): 1098–1105. https://doi.org/10.1051/medsci/2019218.

Di Roberto, Raphaël B., Rocío Castellanos-Rueda, Samara Frey, David Egli, Rodrigo Vazquez-Lombardi, Edo Kapetanovic, Jakub Kucharczyk, and Sai T. Reddy. 2020. 'A Functional Screening Strategy for Engineering Chimeric Antigen Receptors with Reduced On-Target, Off-Tumor Activation'. *Molecular Therapy* 28 (12): 2564–76. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.08.003.

DiLillo, David J., and Jeffrey V. Ravetch. 2015. 'Fc-Receptor Interactions Regulate Both Cytotoxic and Immunomodulatory Therapeutic Antibody Effector Functions'. *Cancer Immunology Research* 3 (7): 704–13. https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0120.

Donaghy, Heather. 2016. 'Effects of Antibody, Drug and Linker on the Preclinical and Clinical Toxicities of Antibody-Drug Conjugates'. *MAbs* 8 (4): 659–71. https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1156829.

Douglass, Jacqueline, Emily Han-Chung Hsiue, Brian J. Mog, Michael S. Hwang, Sarah R. DiNapoli, Alexander H. Pearlman, Michelle S. Miller, et al. 2021. 'Bispecific Antibodies Targeting Mutant *RAS* Neoantigens'. *Science Immunology* 6 (57): eabd5515. https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abd5515.

Drago, Joshua Z., Shanu Modi, and Sarat Chandarlapaty. 2021. 'Unlocking the Potential of Antibody–Drug Conjugates for Cancer Therapy'. *Nature Reviews Clinical Oncology* 18 (6): 327–44. https://doi.org/10.1038/s41571-021-00470-8.

Drent, Esther, Maria Themeli, Renée Poels, Regina de Jong-Korlaar, Huipin Yuan, Joost de Bruijn, Anton C.M. Martens, et al. 2017. 'A Rational Strategy for Reducing On-Target Off-Tumor Effects of CD38-Chimeric Antigen Receptors by Affinity Optimization'. *Molecular Therapy* 25 (8): 1946–58. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.04.024.

Dugel, Pravin U., Adrian Koh, Yuichiro Ogura, Glenn J. Jaffe, Ursula Schmidt-Erfurth, David M. Brown, Andre V. Gomes, James Warburton, Andreas Weichselberger, and Frank G. Holz. 2020. 'HAWK and HARRIER: Phase 3, Multicenter, Randomized, Double-Masked Trials of Brolucizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration'. *Ophthalmology* 127 (1): 72–84. https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2019.04.017.

Ehlerding, Emily B., Saige Lacognata, Dawei Jiang, Carolina A. Ferreira, Shreya Goel, Reinier Hernandez, Justin J. Jeffery, Charles P. Theuer, and Weibo Cai. 2018. 'Targeting Angiogenesis for Radioimmunotherapy with a 177Lu-Labeled Antibody'. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 45 (1): 123–31. https://doi.org/10.1007/s00259-017-3793-2.

EMA. 2017. 'Removab withdrawal public statement'. European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/documents/public-statement/public-statement-removab-withdrawal-marketing-authorisation-european-union_en.pdf.

———. n.d. 'Résumé caractéristique produit - Cetuximab'. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/erbitux-epar-product-information_fr.pdf.

———. n.d. 'Résumé caractéristique produit - Pertuzumab'. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/perjeta-epar-product-information_fr.pdf.

———. n.d. 'Résumé caractéristiques produit - Panitumumab'. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/vectibix-epar-product-information_fr.pdf.

Engelberts, Patrick J., Ida H. Hiemstra, Bart de Jong, Danita H. Schuurhuis, Joyce Meesters, Irati Beltran Hernandez, Simone C. Oostindie, et al. 2020. 'DuoBody-CD3xCD20 Induces Potent T-Cell-Mediated Killing of Malignant B Cells in Preclinical Models and Provides Opportunities for Subcutaneous Dosing'. *EBioMedicine* 52 (February): 102625. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.102625.

Ensign, Laura M., Richard Cone, and Justin Hanes. 2012. 'Oral Drug Delivery with Polymeric Nanoparticles: The Gastrointestinal Mucus Barriers'. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (6): 557–70.

https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.12.009.

Feagan, Brian G., Paul Rutgeerts, Bruce E. Sands, Stephen Hanauer, Jean-Frédéric Colombel, William J. Sandborn, Gert Van Assche, et al. 2013. 'Vedolizumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis'. *New England Journal of Medicine* 369 (8): 699–710. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215734.

Ferrante, Marc, Remo Panaccione, Filip Baert, Peter Bossuyt, Jean-Frederic Colombel, Silvio Danese, Marla Dubinsky, et al. 2022. 'Risankizumab as Maintenance Therapy for Moderately to Severely Active Crohn's Disease: Results from the Multicentre, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Withdrawal Phase 3 FORTIFY Maintenance Trial'. *The Lancet* 399 (10340): 2031–46. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00466-4.

Fierle, Julie K., Johan Abram-Saliba, Vasileios Atsaves, Matteo Brioschi, Mariastella de Tiani, Patrick Reichenbach, Melita Irving, George Coukos, and Steven M. Dunn. 2022. 'A Cell-Based Phenotypic Library Selection and Screening Approach for the de Novo Discovery of Novel Functional Chimeric Antigen Receptors'. *Scientific Reports* 12 (1): 1136. https://doi.org/10.1038/s41598-022-05058-5.

Freed, Daniel M., Nicholas J. Bessman, Anatoly Kiyatkin, Emanuel Salazar-Cavazos, Patrick O. Byrne, Jason O. Moore, Christopher C. Valley, et al. 2017. 'EGFR Ligands Differentially Stabilize Receptor Dimers to Specify Signaling Kinetics'. *Cell* 171 (3): 683-695.e18. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.017.

Frogel, Michael. 2010. 'A Systematic Review of Compliance with Palivizumab Administration for RSV Immunoprophylaxis'. *Journal of Managed Care Pharmacy* 16 (1): 46–58. https://doi.org/10.18553/jmcp.2010.16.1.46.

Frost, Gregory I. 2007. 'Recombinant Human Hyaluronidase (RHuPH20): An Enabling Platform for Subcutaneous Drug and Fluid Administration'. *Expert Opinion on Drug Delivery* 4 (4): 427–40. https://doi.org/10.1517/17425247.4.4.427.

Fuentes, Gloria, Maurizio Scaltriti, José Baselga, and Chandra S Verma. 2011. 'Synergy between Trastuzumab and Pertuzumab for Human Epidermal Growth Factor 2 (Her2) from Colocalization: An in Silicobased Mechanism'. *Breast Cancer Research* 13 (3): R54. https://doi.org/10.1186/bcr2888.

Gaborit, Nadège, Moshit Lindzen, and Yosef Yarden. 2016. 'Emerging Anti-Cancer Antibodies and

Combination Therapies Targeting HER3/ERBB3'. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 12 (3): 576–92. https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1102809.

Galgoczy, Roland, Isabel Pastor, Adai Colom, Alicia Giménez, Francesc Mas, and Jordi Alcaraz. 2014. 'A Spectrophotometer-Based Diffusivity Assay Reveals That Diffusion Hindrance of Small Molecules in Extracellular Matrix Gels Used in 3D Cultures Is Dominated by Viscous Effects'. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 120 (August): 200–207. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.017.

Gan, Hui K., Matthew Burge, Benjamin Solomon, Sze Ting Lee, Kyle D. Holen, Yumin Zhang, Marika Ciprotti, et al. 2021. 'A Phase 1 and Biodistribution Study of ABT-806i, an ^{111} In-Radiolabeled Conjugate of the Tumor-Specific Anti-EGFR Antibody ABT-806'. *Journal of Nuclear Medicine* 62 (6): 787–94. https://doi.org/10.2967/jnumed.120.253146.

Gao, Jennifer J., Christy L. Osgood, Yutao Gong, Hui Zhang, Erik W. Bloomquist, Xiling Jiang, Junshan Qiu, et al. 2021. 'FDA Approval Summary: Pertuzumab, Trastuzumab, and Hyaluronidase–Zzxf Injection for Subcutaneous Use in Patients with HER2-Positive Breast Cancer'. *Clinical Cancer Research* 27 (8): 2126–29. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-3474.

Garcia, Josep, Herbert I. Hurwitz, Alan B. Sandler, David Miles, Robert L Coleman, Regula Deurloo, and Olivier L Chinot. 2020. 'Bevacizumab (Avastin®) in Cancer Treatment: A Review of 15 Years of Clinical Experience and Future Outlook'. *Cancer Treatment Reviews* 86 (June): 102017. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102017.

Geiger, Martina, Kay-Gunnar Stubenrauch, Johannes Sam, Wolfgang F. Richter, Gregor Jordan, Jan Eckmann, Carina Hage, et al. 2020a. 'Protease-Activation Using Anti-Idiotypic Masks Enables Tumor Specificity of a Folate Receptor 1-T Cell Bispecific Antibody'. *Nature Communications* 11 (1): 3196. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16838-w.

———. 2020b. 'Protease-Activation Using Anti-Idiotypic Masks Enables Tumor Specificity of a Folate Receptor 1-T Cell Bispecific Antibody'. *Nature Communications* 11 (1): 3196. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16838-w.

Gerding, Dale N, Ciaran P Kelly, Galia Rahav, Christine Lee, Erik R Dubberke, Princy N Kumar, Bruce Yacyshyn, et al. 2018. 'Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent Clostridium Difficile Infection in Patients at Increased Risk for Recurrence'. *Clinical Infectious Diseases* 67 (5): 649–56.

https://doi.org/10.1093/cid/ciy171.

Giraud, Julia, Mathurin Fatou, and Olivier Dellis. 2016. 'EGFR, régénération et carcinogenèse hépatiques : quelle responsabilité ?' *médecine/sciences* 32 (8–9): 710–13. https://doi.org/10.1051/medsci/20163208016.

Goede, Valentin, Kirsten Fischer, Raymonde Busch, Anja Engelke, Barbara Eichhorst, Clemens M. Wendtner, Tatiana Chagorova, et al. 2014. 'Obinutuzumab plus Chlorambucil in Patients with CLL and Coexisting Conditions'. *New England Journal of Medicine* 370 (12): 1101–10. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1313984.

Goel, Niti, and Sue Stephens. 2010. 'Certolizumab Pegol'. *MAbs*, Landes Bioscience, 2 (2): 137–47. https://doi.org/10.4161/mabs.2.2.11271.

Golay, Josée, and Ronald P. Taylor. 2020. 'The Role of Complement in the Mechanism of Action of Therapeutic Anti-Cancer MAbs'. *Antibodies* 9 (4): 58. https://doi.org/10.3390/antib9040058.

Goldsmith, Stanley J. 2010. 'Radioimmunotherapy of Lymphoma: Bexxar and Zevalin'. *Seminars in Nuclear Medicine* 40 (2): 122–35. https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2009.11.002.

Graziano, Robert F., and John J. Engelhardt. 2019. 'Role of FcγRs in Antibody-Based Cancer Therapy'. In *Fc Mediated Activity of Antibodies*, edited by Jeffrey V. Ravetch and Falk Nimmerjahn, 423:13–34. Current Topics in Microbiology and Immunology. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/82_2019_150.

Guilleminault, L., D. Carmier, N. Heuzé-Vourc'h, P. Diot, and E. Pichon. 2015. 'Immunothérapie dans le cancer bronchique non à petites cellules : inhibition de la voie PD1/PDL1'. *Revue de Pneumologie Clinique* 71 (1): 44–56. https://doi.org/10.1016/j.pneumo.2014.11.004.

Hallqvist, Andreas, Karin Bergmark, Tom Bäck, Håkan Andersson, Pernilla Dahm-Kähler, Mia Johansson, Sture Lindegren, et al. 2019. 'Intraperitoneal α-Emitting Radioimmunotherapy with ^{211}At in Relapsed Ovarian Cancer: Long-Term Follow-up with Individual Absorbed Dose Estimations'. *Journal of Nuclear Medicine* 60 (8): 1073–79. https://doi.org/10.2967/jnumed.118.220384.

Hamblett, Kevin J., Carl J. Kozlosky, Sophia Siu, Wesley S. Chang, Hua Liu, Ian N. Foltz, Esther S.

Trueblood, et al. 2015. ‘AMG 595, an Anti-EGFRvIII Antibody–Drug Conjugate, Induces Potent Antitumor Activity against EGFRvIII-Expressing Glioblastoma’. *Molecular Cancer Therapeutics* 14 (7): 1614–24. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-1078.

HAS. 2005. ‘Avis commission transparence - Cetuximab’. https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/ct031761.pdf.

———. 2014. ‘Avis commission transparence - Panitumumab’. https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2014-09/vectibix_mci_avispostaudition_ct13386.pdf.

———. 2015. ‘Avis commission de transparence - Cetuximab’. https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-14100_ERBITUX_PIC_REEV_Avis3_CT14100.pdf.

Hong, Chae Moon, Byeong-Cheol Ahn, So-Young Choi, Do-Hoon Kim, Sang-Woo Lee, Tae-Geon Kwon, and Jaetae Lee. 2012. ‘Implications of Three-Phase Bone Scintigraphy for the Diagnosis of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw’. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 46 (3): 162–68. https://doi.org/10.1007/s13139-012-0144-x.

Hsiue, Emily Han-Chung, Katharine M. Wright, Jacqueline Douglass, Michael S. Hwang, Brian J. Mog, Alexander H. Pearlman, Suman Paul, et al. 2021. ‘Targeting a Neoantigen Derived from a Common *TP53* Mutation’. *Science* 371 (6533): eabc8697. https://doi.org/10.1126/science.abc8697.

Hu, Xin-yue, Rong Wang, Jie Jin, Xiu-jun Liu, A-long Cui, Lian-qi Sun, Yan-ping Li, et al. 2019. ‘An EGFR -targeting Antibody–Drug Conjugate LR 004- VC - MMAE : Potential in Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Other Malignancies’. *Molecular Oncology* 13 (2): 246–63. https://doi.org/10.1002/1878-0261.12400.

Hummel, Horst-Dieter, Peter Kufer, Carsten Grüllich, Ruth Seggewiss-Bernhardt, Barbara Deschler-Baier, Manik Chatterjee, Maria-Elisabeth Goebeler, et al. 2021. ‘Pasotuxizumab, a BiTE ® Immune Therapy for Castration-Resistant Prostate Cancer: Phase I, Dose-Escalation Study Findings’. *Immunotherapy* 13 (2): 125–41. https://doi.org/10.2217/imt-2020-0256.

Hutchings, Martin, Franck Morschhauser, Gloria Iacoboni, Carmelo Carlo-Stella, Fritz C. Offner, Anna Sureda, Gilles Salles, et al. 2021. ‘Glofitamab, a Novel, Bivalent CD20-Targeting T-Cell–Engaging Bispecific Antibody, Induces Durable Complete Remissions in Relapsed or Refractory B-Cell

Lymphoma: A Phase I Trial'. *Journal of Clinical Oncology* 39 (18): 1959–70. https://doi.org/10.1200/JCO.20.03175.

Idusogie, Esohe E., Pin Yee Wong, Leonard G. Presta, Helene Gazzano-Santoro, Klara Totpal, Mark Ultsch, and Michael G. Mulkerrin. 2001. 'Engineered Antibodies with Increased Activity to Recruit Complement'. *The Journal of Immunology* 166 (4): 2571–75. https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.4.2571.

Jacobson, Orit, Qing Li, Haojun Chen, Gang Niu, Dale O. Kiesewetter, Lan Xu, Kimberly Cook, et al. 2017. 'PET-Guided Evaluation and Optimization of Internalized Antibody–Drug Conjugates Targeting Erythropoietin-Producing Hepatoma A2 Receptor'. *Journal of Nuclear Medicine* 58 (11): 1838–44. https://doi.org/10.2967/jnumed.117.192245.

Jauw, Yvonne W.S., Joseph A. O'Donoghue, Josée M. Zijlstra, Otto S. Hoekstra, C. Willemien Menke-van der Houven van Oordt, Franck Morschhauser, Jorge A. Carrasquillo, et al. 2019. '^{89} Zr-Immuno-PET: Toward a Noninvasive Clinical Tool to Measure Target Engagement of Therapeutic Antibodies In Vivo'. *Journal of Nuclear Medicine* 60 (12): 1825–32. https://doi.org/10.2967/jnumed.118.224568.

Jo, Migyeong, Hyeong Sun Kwon, Kwang-Hoon Lee, Ji Chul Lee, and Sang Taek Jung. 2018. 'Engineered Aglycosylated Full-Length IgG Fc Variants Exhibiting Improved FcγRIIIa Binding and Tumor Cell Clearance'. *MAbs* 10 (2): 278–89. https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1402995.

Jones, Kyle M., Edward A. Randtke, Eriko S. Yoshimaru, Christine M. Howison, Pavani Chalasani, Robert R. Klein, Setsuko K. Chambers, Phillip H. Kuo, and Mark D. Pagel. 2017. 'Clinical Translation of Tumor Acidosis Measurements with AcidoCEST MRI'. *Molecular Imaging and Biology* 19 (4): 617–25. https://doi.org/10.1007/s11307-016-1029-7.

Jones, P. T., P. H. Dear, J. Foote, M. S. Neuberger, and G. Winter. 1986. 'Replacing the Complementarity-Determining Regions in a Human Antibody with Those from a Mouse'. *Nature* 321 (6069): 522–25. https://doi.org/10.1038/321522a0.

Josefsson, Anders, Jessie R. Nedrow, Sunju Park, Sangeeta Ray Banerjee, Andrew Rittenbach, Fabien Jammes, Benjamin Tsui, and George Sgouros. 2016. 'Imaging, Biodistribution, and Dosimetry of Radionuclide-Labeled PD-L1 Antibody in an Immunocompetent Mouse Model of Breast Cancer'. *Cancer Research* 76 (2): 472–79. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2141.

Joubert, Nicolas, Alain Beck, Charles Dumontet, and Caroline Denevault-Sabourin. 2020. 'Antibody–Drug Conjugates: The Last Decade'. *Pharmaceuticals* 13 (9): 245. https://doi.org/10.3390/ph13090245.

Junttila, Teemu T., Ji Li, Jennifer Johnston, Maria Hristopoulos, Robyn Clark, Diego Ellerman, Bu-Er Wang, et al. 2014. 'Antitumor Efficacy of a Bispecific Antibody That Targets HER2 and Activates T Cells'. *Cancer Research* 74 (19): 5561–71. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3622-T.

Kamat, Vishal, Joshua M. Donaldson, Csaba Kari, Marlene R.D. Quadros, Peter I. Lelkes, Irwin Chaiken, Simon Cocklin, John C. Williams, Elisabeth Papazoglou, and Ulrich Rodeck. 2008. 'Enhanced EGFR Inhibition and Distinct Epitope Recognition by EGFR Antagonistic MABS C225 and 425'. *Cancer Biology & Therapy* 7 (5): 726–33. https://doi.org/10.4161/cbt.7.5.6097.

Kantarjian, Hagop, Anthony Stein, Nicola Gökbuget, Adele K. Fielding, Andre C. Schuh, Josep-Maria Ribera, Andrew Wei, et al. 2017. 'Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia'. *New England Journal of Medicine* 376 (9): 836–47. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609783.

Kaplon, Hélène, Alicia Chenoweth, Silvia Crescioli, and Janice M. Reichert. 2022. 'Antibodies to Watch in 2022'. *MAbs* 14 (1): 2014296. https://doi.org/10.1080/19420862.2021.2014296.

Keane, Joseph, Sharon Gershon, Robert P. Wise, Elizabeth Mirabile-Levens, John Kasznica, William D. Schwieterman, Jeffrey N. Siegel, and M. Miles Braun. 2001. 'Tuberculosis Associated with Infliximab, a Tumor Necrosis Factor α–Neutralizing Agent'. *New England Journal of Medicine* 345 (15): 1098–1104. https://doi.org/10.1056/NEJMoa011110.

Khoy, Kathy, Delphine Mariotte, Gilles Defer, Gautier Petit, Olivier Toutirais, and Brigitte Le Mauff. 2020. 'Natalizumab in Multiple Sclerosis Treatment: From Biological Effects to Immune Monitoring'. *Frontiers in Immunology* 11 (September): 549842. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.549842.

Kitson, Sean, Vincenzo Cuccurullo, Thomas Moody, and Luigi Mansi. 2013. 'Radionuclide Antibody-Conjugates, a Targeted Therapy Towards Cancer'. *Current Radiopharmaceuticals* 6 (2): 57–71. https://doi.org/10.2174/1874471011306020001.

Knödler, Maren, Justus Körfer, Volker Kunzmann, Jörg Trojan, Severin Daum, Michael Schenk, Frank

Kullmann, et al. 2018. 'Randomised Phase II Trial to Investigate Catumaxomab (Anti-EpCAM × Anti-CD3) for Treatment of Peritoneal Carcinomatosis in Patients with Gastric Cancer'. *British Journal of Cancer* 119 (3): 296–302. https://doi.org/10.1038/s41416-018-0150-6.

Koga, Yoshikatsu, Shino Manabe, Yoshiyuki Aihara, Ryuta Sato, Ryo Tsumura, Hikaru Iwafuji, Fumiaki Furuya, et al. 2015. 'Antitumor Effect of Antitissue Factor Antibody-MMAE Conjugate in Human Pancreatic Tumor Xenografts'. *International Journal of Cancer* 137 (6): 1457–66. https://doi.org/10.1002/ijc.29492.

Koster, Elizabeth J. de, Taban Sulaiman, Jaap F. Hamming, Abbey Schepers, Marieke Snel, Floris H. P. van Velden, Lioe-Fee de Geus-Oei, and Dennis Vriens. 2021. 'Radioiodine in Differentiated Thyroid Carcinoma: Do We Need Diagnostic Pre-Ablation Iodine-123 Scintigraphy to Optimize Treatment?' *Diagnostics* 11 (3): 553. https://doi.org/10.3390/diagnostics11030553.

Krishna, Murli, and Steven G. Nadler. 2016. 'Immunogenicity to Biotherapeutics – The Role of Anti-Drug Immune Complexes'. *Frontiers in Immunology* 7 (February). https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00021.

Kucher, Klaus, Donald Johns, Doris Maier, Rainer Abel, Andreas Badke, Hagen Baron, Roland Thietje, et al. 2018. 'First-in-Man Intrathecal Application of Neurite Growth-Promoting Anti-Nogo-A Antibodies in Acute Spinal Cord Injury'. *Neurorehabilitation and Neural Repair* 32 (6–7): 578–89. https://doi.org/10.1177/1545968318776371.

La, Minh Thanh, Van Hieu Tran, and Hee-Kwon Kim. 2019. 'Progress of Coordination and Utilization of Zirconium-89 for Positron Emission Tomography (PET) Studies'. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 53 (2): 115–24. https://doi.org/10.1007/s13139-019-00584-z.

Lacouture, Mario E., Milan Anadkat, Aminah Jatoi, Tamer Garawin, Chet Bohac, and Edith Mitchell. 2018. 'Dermatologic Toxicity Occurring During Anti-EGFR Monoclonal Inhibitor Therapy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review'. *Clinical Colorectal Cancer* 17 (2): 85–96. https://doi.org/10.1016/j.clcc.2017.12.004.

Lanini, Simone, Aoife C Molloy, Archibald G Prentice, Giuseppe Ippolito, and Christopher C Kibbler. 2013. 'Infections in Patients Taking Rituximab for Hematologic Malignancies: Two-Year Cohort Study'. *BMC Infectious Diseases* 13 (1): 317. https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-317.

Lazar, Greg A., Wei Dang, Sher Karki, Omid Vafa, Judy S. Peng, Linus Hyun, Cheryl Chan, et al. 2006. 'Engineered Antibody Fc Variants with Enhanced Effector Function'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (11): 4005–10. https://doi.org/10.1073/pnas.0508123103.

Lee, Hyun Tae, Ju Yeon Lee, Heejin Lim, Sang Hyung Lee, Yu Jeong Moon, Hyo Jeong Pyo, Seong Eon Ryu, Woori Shin, and Yong-Seok Heo. 2017. 'Molecular Mechanism of PD-1/PD-L1 Blockade via Anti-PD-L1 Antibodies Atezolizumab and Durvalumab'. *Scientific Reports* 7 (1): 5532. https://doi.org/10.1038/s41598-017-06002-8.

Lee, JAEHYUN, DONGGEON KIM, EUNJU SON, SU-JI YOO, JASON K. SA, YONG JAE SHIN, YEUP YOON, and DO-HYUN NAM. 2018. 'Pharmacokinetics, Biodistribution, and Toxicity Evaluation of Anti-SEMA3A (F11) in In Vivo Models'. *Anticancer Research* 38 (5). https://doi.org/10.21873/anticanres.12524.

Levin, Alon D., Manon E. Wildenberg, and Gijs R. van den Brink. 2016. 'Mechanism of Action of Anti-TNF Therapy in Inflammatory Bowel Disease'. *Journal of Crohn's and Colitis* 10 (8): 989–97. https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw053.

Lewis, Sarah S., Gary M. Cox, and Jason E. Stout. 2014. 'Clinical Utility of Indium 111–Labeled White Blood Cell Scintigraphy for Evaluation of Suspected Infection'. *Open Forum Infectious Diseases* 1 (2): ofu089. https://doi.org/10.1093/ofid/ofu089.

Li, Huizi Keiko, Yukie Morokoshi, Kotaro Nagatsu, Tadashi Kamada, and Sumitaka Hasegawa. 2017. 'Locoregional Therapy with A-emitting Trastuzumab against Peritoneal Metastasis of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-positive Gastric Cancer in Mice'. *Cancer Science* 108 (8): 1648–56. https://doi.org/10.1111/cas.13282.

Li, Huizi Keiko, Aya Sugyo, Atsushi B. Tsuji, Yukie Morokoshi, Katsuyuki Minegishi, Kotaro Nagatsu, Hiroaki Kanda, et al. 2018. 'α-Particle Therapy for Synovial Sarcoma in the Mouse Using an Astatine-211-Labeled Antibody against Frizzled Homolog 10'. *Cancer Science* 109 (7): 2302–9. https://doi.org/10.1111/cas.13636.

Li, Shiqing, Karl R. Schmitz, Philip D. Jeffrey, Jed J.W. Wiltzius, Paul Kussie, and Kathryn M. Ferguson. 2005. 'Structural Basis for Inhibition of the Epidermal Growth Factor Receptor by Cetuximab'. *Cancer Cell* 7 (4): 301–11. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.03.003.

Lindner, S. E., S. M. Johnson, C. E. Brown, and L. D. Wang. 2020. 'Chimeric Antigen Receptor Signaling: Functional Consequences and Design Implications'. *Science Advances* 6 (21): eaaz3223. https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz3223.

Liu, Rena, Robert Oldham, Emma Teal, Stephen Beers, and Mark Cragg. 2020. 'Fc-Engineering for Modulated Effector Functions—Improving Antibodies for Cancer Treatment'. *Antibodies* 9 (4): 64. https://doi.org/10.3390/antib9040064.

Liu, Xiaojun, Shuguang Jiang, Chongyun Fang, Shiyu Yang, Devvora Olalere, Edward C. Pequignot, Alexandria P. Cogdill, et al. 2015. 'Affinity-Tuned ErbB2 or EGFR Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit an Increased Therapeutic Index against Tumors in Mice'. *Cancer Research* 75 (17): 3596–3607. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0159.

Lo, Winifred, Maria Parkhurst, Paul F. Robbins, Eric Tran, Yong-Chen Lu, Li Jia, Jared J. Gartner, et al. 2019. 'Immunologic Recognition of a Shared P53 Mutated Neoantigen in a Patient with Metastatic Colorectal Cancer'. *Cancer Immunology Research* 7 (4): 534–43. https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0686.

Locke, Kenneth W., Daniel C. Maneval, and Michael J. LaBarre. 2019. 'ENHANZE ® Drug Delivery Technology: A Novel Approach to Subcutaneous Administration Using Recombinant Human Hyaluronidase PH20'. *Drug Delivery* 26 (1): 98–106. https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1551442.

López-Gómez, Miriam, María Merino, and Enrique Casado. 2012. 'Long-Term Treatment of Metastatic Colorectal Cancer with Panitumumab'. *Clinical Medicine Insights: Oncology* 6 (January): CMO.S5055. https://doi.org/10.4137/CMO.S5055.

Lutterbuese, Ralf, Tobias Raum, Roman Kischel, Patrick Hoffmann, Susanne Mangold, Benno Rattel, Matthias Friedrich, et al. 2010. 'T Cell-Engaging BiTE Antibodies Specific for EGFR Potently Eliminate KRAS- and BRAF-Mutated Colorectal Cancer Cells'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (28): 12605–10. https://doi.org/10.1073/pnas.1000976107.

Ly, Karen, Mary P. Smith, Quinn Thibodeaux, Vidhatha Reddy, Wilson Liao, and Tina Bhutani. 2019. 'Anti IL-17 in Psoriasis'. *Expert Review of Clinical Immunology* 15 (11): 1185–94. https://doi.org/10.1080/1744666X.2020.1679625.

Macierzanka, Adam, Alan R. Mackie, Balazs H. Bajka, Neil M. Rigby, Françoise Nau, and Didier Dupont. 2014. 'Transport of Particles in Intestinal Mucus under Simulated Infant and Adult Physiological Conditions: Impact of Mucus Structure and Extracellular DNA'. Edited by Adam J. Munn. *PLoS ONE* 9 (4): e95274. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095274.

Mackness, Brian C., Julie A. Jaworski, Ekaterina Boudanova, Anna Park, Delphine Valente, Christine Mauriac, Olivier Pasquier, et al. 2019. 'Antibody Fc Engineering for Enhanced Neonatal Fc Receptor Binding and Prolonged Circulation Half-Life'. *MAbs* 11 (7): 1276–88. https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1633883.

Makabe, Koki, Takeshi Yokoyama, Shiro Uehara, Tomomi Uchikubo-Kamo, Mikako Shirouzu, Kouki Kimura, Kouhei Tsumoto, Ryutaro Asano, Yoshikazu Tanaka, and Izumi Kumagai. 2021. 'Anti-EGFR Antibody 528 Binds to Domain III of EGFR at a Site Shifted from the Cetuximab Epitope'. *Scientific Reports* 11 (1): 5790. https://doi.org/10.1038/s41598-021-84171-3.

Mangeat, Tristan, Matthieu Gracia, Pierre Martineau, and Bruno Robert. 2020. 'Stratégies de ciblage spécifique de la tumeur fondées sur les caractéristiques des antigènes tumoraux et du microenvironnement tumoral'. *médecine/sciences* 36 (October): 56–60. https://doi.org/10.1051/medsci/2020194.

Mansourou, Annick, Charlotte Joos, Oumy Niass, Babacar Diouf, Adama Tall, Ronald Perraut, Makhtar Niang, and Aissatou Toure-Balde. 2022. 'Improvement of the Antibody-Dependent Respiratory Burst Assay for Assessing Protective Immune Responses to Malaria'. *Open Biology* 12 (3): 210288. https://doi.org/10.1098/rsob.210288.

Markham, Anthony. 2021. 'REGN-EB3: First Approval'. *Drugs* 81 (1): 175–78. https://doi.org/10.1007/s40265-020-01452-3.

Masters, Joanna C., Dana J. Nickens, Dawei Xuan, Ronald L. Shazer, and Michael Amantea. 2018. 'Clinical Toxicity of Antibody Drug Conjugates: A Meta-Analysis of Payloads'. *Investigational New Drugs* 36 (1): 121–35. https://doi.org/10.1007/s10637-017-0520-6.

Mayes, Patrick A., Kenneth W. Hance, and Axel Hoos. 2018. 'The Promise and Challenges of Immune Agonist Antibody Development in Cancer'. *Nature Reviews Drug Discovery* 17 (7): 509–27. https://doi.org/10.1038/nrd.2018.75.

Mazor, Yariv, Kris F. Sachsenmeier, Chunning Yang, Anna Hansen, Jessica Filderman, Kathy Mulgrew, Herren Wu, and William F. Dall'Acqua. 2017. 'Enhanced Tumor-Targeting Selectivity by Modulating Bispecific Antibody Binding Affinity and Format Valence'. *Scientific Reports* 7 (1): 40098. https://doi.org/10.1038/srep40098.

McDonagh, Marian, Kim Peterson, Brittany Holzhammer, and Sergio Fazio. 2016. 'A Systematic Review of PCSK9 Inhibitors Alirocumab and Evolocumab'. *Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy* 22 (6): 641–53. https://doi.org/10.18553/jmcp.2016.22.6.641.

Meredith, Ruby F., Julien J. Torgue, Tania A. Rozgaja, Eileen P. Banaga, Patty W. Bunch, Ronald D. Alvarez, J. Michael Straughn, Michael C. Dobelbower, and Andrew M. Lowy. 2018. 'Safety and Outcome Measures of First-in-Human Intraperitoneal α Radioimmunotherapy With 212Pb-TCMC-Trastuzumab'. *American Journal of Clinical Oncology* 41 (7): 716–21. https://doi.org/10.1097/COC.0000000000000353.

Middelburg, Jim, Kristel Kemper, Patrick Engelberts, Aran F. Labrijn, Janine Schuurman, and Thorbald van Hall. 2021. 'Overcoming Challenges for CD3-Bispecific Antibody Therapy in Solid Tumors'. *Cancers* 13 (2): 287. https://doi.org/10.3390/cancers13020287.

Mimoto, F., H. Katada, S. Kadono, T. Igawa, T. Kuramochi, M. Muraoka, Y. Wada, K. Haraya, T. Miyazaki, and K. Hattori. 2013. 'Engineered Antibody Fc Variant with Selectively Enhanced Fc RIIb Binding over Both Fc RIIaR131 and Fc RIIaH131'. *Protein Engineering Design and Selection* 26 (10): 589–98. https://doi.org/10.1093/protein/gzt022.

Minckwitz, Gunter von, Marion Procter, Evandro de Azambuja, Dimitrios Zardavas, Mark Benyunes, Giuseppe Viale, Thomas Suter, et al. 2017. 'Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer'. *New England Journal of Medicine* 377 (2): 122–31. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1703643.

Modak, Shakeel, Pat Zanzonico, Milan Grkovski, Emily K. Slotkin, Jorge A. Carrasquillo, Serge K. Lyashchenko, Jason S. Lewis, et al. 2020. 'B7H3-Directed Intraperitoneal Radioimmunotherapy With Radioiodinated Omburtamab for Desmoplastic Small Round Cell Tumor and Other Peritoneal Tumors: Results of a Phase I Study'. *Journal of Clinical Oncology* 38 (36): 4283–91. https://doi.org/10.1200/JCO.20.01974.

Modi, Shanu, Cristina Saura, Toshinari Yamashita, Yeon Hee Park, Sung-Bae Kim, Kenji Tamura, Fabrice Andre, et al. 2020. 'Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Breast Cancer'. *New England Journal of Medicine* 382 (7): 610–21. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1914510.

Moore, Gregory L., Hsing Chen, Sher Karki, and Greg A. Lazar. 2010. 'Engineered Fc Variant Antibodies with Enhanced Ability to Recruit Complement and Mediate Effector Functions'. *MAbs* 2 (2): 181–89. https://doi.org/10.4161/mabs.2.2.11158.

Moots, Robert J., Ricardo M. Xavier, Chi Chiu Mok, Mahboob U. Rahman, Wen-Chan Tsai, Mustafa H. Al-Maini, Karel Pavelka, et al. 2017. 'The Impact of Anti-Drug Antibodies on Drug Concentrations and Clinical Outcomes in Rheumatoid Arthritis Patients Treated with Adalimumab, Etanercept, or Infliximab: Results from a Multinational, Real-World Clinical Practice, Non-Interventional Study'. Edited by Michael Nurmohamed. *PLOS ONE* 12 (4): e0175207. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175207.

Morrison, S L, M J Johnson, L A Herzenberg, and V T Oi. 1984. 'Chimeric Human Antibody Molecules: Mouse Antigen-Binding Domains with Human Constant Region Domains.' *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81 (21): 6851–55. https://doi.org/10.1073/pnas.81.21.6851.

Nagasaka, Misako, Ani S. Balmanoukian, Russell Madison, Shannon S. Zhang, Samuel J. Klempner, and Sai-Hong Ignatius Ou. 2022. 'Amivantamab (JNJ-61186372) Induces Clinical, Biochemical, Molecular, and Radiographic Response in a Treatment-Refractory NSCLC Patient Harboring Amplified Triple EGFR Mutations (L858R/ T790M/G796S) in Cis'. *Lung Cancer* 164 (February): 52–55. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2021.12.022.

Natsume, Akito, Mika In, Hiroyuki Takamura, Tomoaki Nakagawa, Yukiko Shimizu, Kazuko Kitajima, Masako Wakitani, et al. 2008. 'Engineered Antibodies of IgG1/IgG3 Mixed Isotype with Enhanced Cytotoxic Activities'. *Cancer Research* 68 (10): 3863–72. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6297.

Nimmerjahn, Falk, and Jeffrey V. Ravetch. 2006. 'Fcγ Receptors: Old Friends and New Family Members'. *Immunity* 24 (1): 19–28. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.11.010.

Normanno, Nicola, Antonella De Luca, Caterina Bianco, Luigi Strizzi, Mario Mancino, Monica R.

Maiello, Adele Carotenuto, Gianfranco De Feo, Francesco Caponigro, and David S. Salomon. 2006. 'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Signaling in Cancer'. *Gene* 366 (1): 2–16. https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.10.018.

Oganesyan, Vaheh, Changshou Gao, Lena Shirinian, Herren Wu, and William F. Dall'Acqua. 2008. 'Structural Characterization of a Human Fc Fragment Engineered for Lack of Effector Functions'. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 64 (6): 700–704. https://doi.org/10.1107/S0907444908007877.

Okazaki, Taku, Shunsuke Chikuma, Yoshiko Iwai, Sidonia Fagarasan, and Tasuku Honjo. 2013. 'A Rheostat for Immune Responses: The Unique Properties of PD-1 and Their Advantages for Clinical Application'. *Nature Immunology* 14 (12): 1212–18. https://doi.org/10.1038/ni.2762.

Oldenburg, Johannes, Johnny N. Mahlangu, Willem Bujan, Peter Trask, Michael U. Callaghan, Guy Young, Elina Asikanius, et al. 2019. 'The Effect of Emicizumab Prophylaxis on Health-Related Outcomes in Persons with Haemophilia A with Inhibitors: HAVEN 1 Study'. *Haemophilia* 25 (1): 33–44. https://doi.org/10.1111/hae.13618.

Ollila, Thomas A, Ilyas Sahin, and Adam J Olszewski. 2019. 'Mogamulizumab: A New Tool for Management of Cutaneous T-Cell Lymphoma'. *OncoTargets and Therapy* Volume 12 (February): 1085–94. https://doi.org/10.2147/OTT.S165615.

Pai, Chien-Chun Steven, Donald M. Simons, Xiaoqing Lu, Michael Evans, Junnian Wei, Yung-hua Wang, Mingyi Chen, et al. 2018a. 'Tumor-Conditional Anti-CTLA4 Uncouples Antitumor Efficacy from Immunotherapy-Related Toxicity'. *Journal of Clinical Investigation* 129 (1): 349–63. https://doi.org/10.1172/JCI123391.

———. 2018b. 'Tumor-Conditional Anti-CTLA4 Uncouples Antitumor Efficacy from Immunotherapy-Related Toxicity'. *Journal of Clinical Investigation* 129 (1): 349–63. https://doi.org/10.1172/JCI123391.

Palumbo, Antonio, Asher Chanan-Khan, Katja Weisel, Ajay K. Nooka, Tamas Masszi, Meral Beksac, Ivan Spicka, et al. 2016. 'Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma'. *New England Journal of Medicine* 375 (8): 754–66. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606038.

Pang, Kok-Lun, Nie Yen Low, and Kok-Yong Chin. 2020. 'A Review on the Role of Denosumab in Fracture Prevention'. *Drug Design, Development and Therapy* Volume 14 (October): 4029–51. https://doi.org/10.2147/DDDT.S270829.

Pardo, Julián, Sandra Balkow, Alberto Anel, and Markus M. Simon. 2002. 'Granzymes Are Essential for Natural Killer Cell-Mediated and Perf-Facilitated Tumor Control'. *European Journal of Immunology* 32 (10): 2881–86. https://doi.org/10.1002/1521-4141(2002010)32:10<2881::AID-IMMU2881>3.0.CO;2-K.

Park, Spencer, Enda Shevlin, Yogindra Vedvyas, Marjan Zaman, Susan Park, Yen-Michael S. Hsu, Irene M. Min, and Moonsoo M. Jin. 2017. 'Micromolar Affinity CAR T Cells to ICAM-1 Achieves Rapid Tumor Elimination While Avoiding Systemic Toxicity'. *Scientific Reports* 7 (1): 14366. https://doi.org/10.1038/s41598-017-14749-3.

Petkova, S. B., S. Akilesh, T. J. Sproule, G. J. Christianson, H. Al Khabbaz, A. C. Brown, L. G. Presta, Y. G. Meng, and D. C. Roopenian. 2006. 'Enhanced Half-Life of Genetically Engineered Human IgG1 Antibodies in a Humanized FcRn Mouse Model: Potential Application in Humorally Mediated Autoimmune Disease'. *International Immunology* 18 (12): 1759–69. https://doi.org/10.1093/intimm/dxl110.

Peyrin-Biroulet, Laurent, Edward V. Loftus, Jean-Frédéric Colombel, Silvio Danese, Raquel Rogers, Jeffrey D. Bornstein, Jingjing Chen, Stefan Schreiber, Bruce E. Sands, and Richard A. Lirio. 2021. 'Histologic Outcomes With Vedolizumab Versus Adalimumab in Ulcerative Colitis: Results From An Efficacy and Safety Study of Vedolizumab Intravenous Compared to Adalimumab Subcutaneous in Participants With Ulcerative Colitis (VARSITY)'. *Gastroenterology* 161 (4): 1156-1167.e3. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.06.015.

Pines, Gur, Wolfgang J. Köstler, and Yosef Yarden. 2010. 'Oncogenic Mutant Forms of EGFR: Lessons in Signal Transduction and Targets for Cancer Therapy'. *FEBS Letters* 584 (12): 2699–2706. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.019.

Plyukhova, Anna A., Maria V. Budzinskaya, Kirill M. Starostin, Robert Rejdak, Claudio Bucolo, Michele Reibaldi, and Mario D. Toro. 2020. 'Comparative Safety of Bevacizumab, Ranibizumab, and Aflibercept for Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration (AMD): A Systematic Review and Network Meta-Analysis of Direct Comparative Studies'. *Journal of Clinical Medicine* 9 (5):

1522. https://doi.org/10.3390/jcm9051522.

Pollack, Charles V., Paul A. Reilly, Joanne van Ryn, John W. Eikelboom, Stephan Glund, Richard A. Bernstein, Robert Dubiel, et al. 2017. 'Idarucizumab for Dabigatran Reversal — Full Cohort Analysis'. *New England Journal of Medicine* 377 (5): 431–41. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707278.

Prior, Ian A., Paul D. Lewis, and Carla Mattos. 2012. 'A Comprehensive Survey of Ras Mutations in Cancer'. *Cancer Research* 72 (10): 2457–67. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2612.

Puccinelli, Tracy J., Paul J. Bertics, and Kristyn S. Masters. 2010. 'Regulation of Keratinocyte Signaling and Function via Changes in Epidermal Growth Factor Presentation'. *Acta Biomaterialia* 6 (9): 3415–25. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.04.006.

Qiu, Weiyi, Chang Zhang, Shuang Wang, Xiaoyan Yu, Qiong Wang, Dadi Zeng, Peng Du, et al. 2019. 'A Novel Anti-EGFR MAb Ame55 with Lower Toxicity and Better Efficacy than Cetuximab When Combined with Irinotecan'. *Journal of Immunology Research* 2019 (January): 1–12. https://doi.org/10.1155/2019/3017360.

Raschi, Emanuel, Valentina Vasina, Maria Grazia Ursino, Giuseppe Boriani, Andrea Martoni, and Fabrizio De Ponti. 2010. 'Anticancer Drugs and Cardiotoxicity: Insights and Perspectives in the Era of Targeted Therapy'. *Pharmacology & Therapeutics* 125 (2): 196–218. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.10.002.

Richards, Angelene, Danielle Baranova, and Nicholas J. Mantis. 2022. 'The Prospect of Orally Administered Monoclonal Secretory IgA (SIgA) Antibodies to Prevent Enteric Bacterial Infections'. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 18 (2): 1964317. https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1964317.

Richards, Angelene F., Jennifer E. Doering, Shannon A. Lozito, John J. Varrone, Graham G. Willsey, Michael Pauly, Kevin Whaley, Larry Zeitlin, and Nicholas J. Mantis. 2020. 'Inhibition of Invasive Salmonella by Orally Administered IgA and IgG Monoclonal Antibodies'. Edited by Travis J. Bourret. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 14 (3): e0007803. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007803.

Ridker, Paul M, Brendan M. Everett, Tom Thuren, Jean G. MacFadyen, William H. Chang, Christie Ballantyne, Francisco Fonseca, et al. 2017. 'Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for

Atherosclerotic Disease'. *New England Journal of Medicine* 377 (12): 1119–31. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707914.

Ritter, Christoph A, and Carlos L Arteaga. 2003. 'The Epidermal Growth Factor Receptor–Tyrosine Kinase: A Promising Therapeutic Target in Solid Tumors'. *Seminars in Oncology* 30 (1): 3–11. https://doi.org/10.1053/sonc.2003.50027.

Rius Ruiz, Irene, Rocio Vicario, Beatriz Morancho, Cristina Bernadó Morales, Enrique J. Arenas, Sylvia Herter, Anne Freimoser-Grundschober, et al. 2018. 'P95HER2–T Cell Bispecific Antibody for Breast Cancer Treatment'. *Science Translational Medicine* 10 (461): eaat1445. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat1445.

Robin, Gautier, Yoshiteru Sato, Dominique Desplancq, Natacha Rochel, Etienne Weiss, and Pierre Martineau. 2014. 'Restricted Diversity of Antigen Binding Residues of Antibodies Revealed by Computational Alanine Scanning of 227 Antibody–Antigen Complexes'. *Journal of Molecular Biology* 426 (22): 3729–43. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.08.013.

Rosenberg, Jonathan E., Peter H. O'Donnell, Arjun V. Balar, Bradley A. McGregor, Elisabeth I. Heath, Evan Y. Yu, Matthew D. Galsky, et al. 2019. 'Pivotal Trial of Enfortumab Vedotin in Urothelial Carcinoma After Platinum and Anti-Programmed Death 1/Programmed Death Ligand 1 Therapy'. *Journal of Clinical Oncology* 37 (29): 2592–2600. https://doi.org/10.1200/JCO.19.01140.

Rosenthal, Mark A, Carmen Balana, Myra E van Linde, Cyrus Sayehli, Walter M Fiedler, Martin Wermke, Christophe Massard, et al. 2019. 'ATIM-49 (LTBK-01). AMG 596, A NOVEL ANTI-EGFRVIII BISPECIFIC T CELL ENGAGER (BITE®) MOLECULE FOR THE TREATMENT OF GLIOBLASTOMA (GBM): PLANNED INTERIM ANALYSIS IN RECURRENT GBM (RGBM)', 1.

Rudnick, Stephen I., and Gregory P. Adams. 2009. 'Affinity and Avidity in Antibody-Based Tumor Targeting'. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 24 (2): 155–61. https://doi.org/10.1089/cbr.2009.0627.

Rudnick, Stephen I., Jianlong Lou, Calvin C. Shaller, Yong Tang, Andres J.P. Klein-Szanto, Louis M. Weiner, James D. Marks, and Gregory P. Adams. 2011. 'Influence of Affinity and Antigen Internalization on the Uptake and Penetration of Anti-HER2 Antibodies in Solid Tumors'. *Cancer Research* 71 (6): 2250–59. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2277.

Ruggiero, Angelo, Vincenzo Picone, Fabrizio Martora, Gabriella Fabbrocini, and Matteo Megna. 2022. 'Guselkumab, Risankizumab, and Tildrakizumab in the Management of Psoriasis: A Review of the Real-World Evidence'. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* Volume 15 (August): 1649–58. https://doi.org/10.2147/CCID.S364640.

Salles, Gilles, Monika Długosz-Danecka, Hervé Ghesquières, and Wojciech Jurczak. 2021. 'Tafasitamab for the Treatment of Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma'. *Expert Opinion on Biological Therapy* 21 (4): 455–63. https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1884677.

Sanders, Niek N., Stefaan C. De Smedt, Elsa Van Rompaey, Paul Simoens, Frans De Baets, and Joseph Demeester. 2000. 'Cystic Fibrosis Sputum: A Barrier to the Transport of Nanospheres'. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 162 (5): 1905–11. https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.5.9909009.

Sands, Bruce E., William J. Sandborn, Remo Panaccione, Christopher D. O'Brien, Hongyan Zhang, Jewel Johanns, Omoniyi J. Adedokun, et al. 2019. 'Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis'. *New England Journal of Medicine* 381 (13): 1201–14. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1900750.

Sazinsky, Stephen L., René G. Ott, Nathaniel W. Silver, Bruce Tidor, Jeffrey V. Ravetch, and K. Dane Wittrup. 2008. 'Aglycosylated Immunoglobulin G_1 Variants Productively Engage Activating Fc Receptors'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (51): 20167–72. https://doi.org/10.1073/pnas.0809257105.

Scafoglio, Claudio, Bruce A. Hirayama, Vladimir Kepe, Jie Liu, Chiara Ghezzi, Nagichettiar Satyamurthy, Neda A. Moatamed, et al. 2015. 'Functional Expression of Sodium-Glucose Transporters in Cancer'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (30). https://doi.org/10.1073/pnas.1511698112.

Scapin, Giovanna, Xiaoyu Yang, Winifred W Prosise, Mark McCoy, Paul Reichert, Jennifer M Johnston, Ramesh S Kashi, and Corey Strickland. 2015. 'Structure of Full-Length Human Anti-PD1 Therapeutic IgG4 Antibody Pembrolizumab'. *Nature Structural & Molecular Biology* 22 (12): 953–58. https://doi.org/10.1038/nsmb.3129.

Schlothauer, Tilman, Sylvia Herter, Claudia Ferrara Koller, Sandra Grau-Richards, Virginie Steinhart, Christian Spick, Manfred Kubbies, Christian Klein, Pablo Umaña, and Ekkehard Mössner. 2016. 'Novel Human IgG1 and IgG4 Fc-Engineered Antibodies with Completely Abolished Immune Effector Functions'. *Protein Engineering Design and Selection* 29 (10): 457–66. https://doi.org/10.1093/protein/gzw040.

Schokker, Sandor, Fabrizia Fusetti, Francesco Bonardi, Remco J. Molenaar, Ron A.A. Mathôt, and Hanneke W.M. van Laarhoven. 2020. 'Development and Validation of an LC-MS/MS Method for Simultaneous Quantification of Co-Administered Trastuzumab and Pertuzumab'. *MAbs* 12 (1): 1795492. https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1795492.

Scully, Marie, Spero R. Cataland, Flora Peyvandi, Paul Coppo, Paul Knöbl, Johanna A. Kremer Hovinga, Ara Metjian, et al. 2019. 'Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura'. *New England Journal of Medicine* 380 (4): 335–46. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1806311.

Sergina, Natalia V., and Mark M. Moasser. 2007. 'The HER Family and Cancer: Emerging Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets'. *Trends in Molecular Medicine* 13 (12): 527–34. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.10.002.

Sheridan, Douglas, Zhao-Xue Yu, Yuchun Zhang, Rekha Patel, Fang Sun, Melissa A. Lasaro, Keith Bouchard, et al. 2018. 'Design and Preclinical Characterization of ALXN1210: A Novel Anti-C5 Antibody with Extended Duration of Action'. Edited by Stanislaw Stepkowski. *PLOS ONE* 13 (4): e0195909. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195909.

Shimabukuro-Vornhagen, Alexander, Philipp Gödel, Marion Subklewe, Hans Joachim Stemmler, Hans Anton Schlößer, Max Schlaak, Matthias Kochanek, Boris Böll, and Michael S. von Bergwelt-Baildon. 2018. 'Cytokine Release Syndrome'. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 6 (1): 56. https://doi.org/10.1186/s40425-018-0343-9.

Shinkawa, Toyohide, Kazuyasu Nakamura, Naoko Yamane, Emi Shoji-Hosaka, Yutaka Kanda, Mikiko Sakurada, Kazuhisa Uchida, et al. 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'. *Journal of Biological Chemistry* 278 (5): 3466–73. https://doi.org/10.1074/jbc.M210665200.

Sickmier, E. Allen, Robert J. M. Kurzeja, Klaus Michelsen, Mukta Vazir, Evelyn Yang, and Andrew S. Tasker. 2016a. 'The Panitumumab EGFR Complex Reveals a Binding Mechanism That Overcomes Cetuximab Induced Resistance'. Edited by Nils Cordes. *PLOS ONE* 11 (9): e0163366. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163366.

———. 2016b. 'The Panitumumab EGFR Complex Reveals a Binding Mechanism That Overcomes Cetuximab Induced Resistance'. Edited by Nils Cordes. *PLOS ONE* 11 (9): e0163366. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163366.

Sigismund, Sara, Daniele Avanzato, and Letizia Lanzetti. 2018. 'Emerging Functions of the EGFR in Cancer'. *Molecular Oncology*, 18.

Slaga, Dionysos, Diego Ellerman, T. Noelle Lombana, Rajesh Vij, Ji Li, Maria Hristopoulos, Robyn Clark, et al. 2018a. 'Avidity-Based Binding to HER2 Results in Selective Killing of HER2-Overexpressing Cells by Anti-HER2/CD3'. *Science Translational Medicine* 10 (463): eaat5775. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat5775.

———. 2018b. 'Avidity-Based Binding to HER2 Results in Selective Killing of HER2-Overexpressing Cells by Anti-HER2/CD3'. *Science Translational Medicine* 10 (463): eaat5775. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat5775.

Snyder, Alexandra, Vladimir Makarov, Taha Merghoub, Jianda Yuan, Jesse M. Zaretsky, Alexis Desrichard, Logan A. Walsh, et al. 2014. 'Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma'. *New England Journal of Medicine* 371 (23): 2189–99. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1406498.

Springuel, Lorraine, Caroline Lonez, Bertrand Alexandre, Eric Van Cutsem, Jean-Pascal H. Machiels, Marc Van Den Eynde, Hans Prenen, et al. 2019. 'Chimeric Antigen Receptor-T Cells for Targeting Solid Tumors: Current Challenges and Existing Strategies'. *BioDrugs* 33 (5): 515–37. https://doi.org/10.1007/s40259-019-00368-z.

Staflin, Karin, Christina L. Zuch de Zafra, Leah K. Schutt, Vanessa Clark, Fiona Zhong, Maria Hristopoulos, Robyn Clark, et al. 2020. 'Target Arm Affinities Determine Preclinical Efficacy and Safety of Anti-HER2/CD3 Bispecific Antibody'. *JCI Insight* 5 (7): e133757. https://doi.org/10.1172/jci.insight.133757.

Sternjak, Alexander, Fei Lee, Oliver Thomas, Mercedesz Balazs, Joachim Wahl, Grit Lorenczewski, Ines Ullrich, et al. 2021. 'Preclinical Assessment of AMG 596, a Bispecific T-Cell Engager (BiTE) Immunotherapy Targeting the Tumor-Specific Antigen EGFRvIII'. *Molecular Cancer Therapeutics* 20 (5): 925–33. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0508.

Su, Zheng, Dian Xiao, Fei Xie, Lianqi Liu, Yanming Wang, Shiyong Fan, Xinbo Zhou, and Song Li. 2021. 'Antibody–Drug Conjugates: Recent Advances in Linker Chemistry'. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 11 (12): 3889–3907. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.03.042.

Subklewe, Marion, Anthony Stein, Roland B. Walter, Ravi Bhatia, Andrew H. Wei, David Ritchie, Veit Bücklein, et al. 2019. 'Preliminary Results from a Phase 1 First-in-Human Study of AMG 673, a Novel Half-Life Extended (HLE) Anti-CD33/CD3 BiTE® (Bispecific T-Cell Engager) in Patients with Relapsed/Refractory (R/R) Acute Myeloid Leukemia (AML)'. *Blood* 134 (Supplement_1): 833–833. https://doi.org/10.1182/blood-2019-127977.

Suk, Jung Soo, Samuel K Lai, Nicholas J Boylan, Michelle R Dawson, Michael P Boyle, and Justin Hanes. 2011. 'Rapid Transport of Muco-Inert Nanoparticles in Cystic Fibrosis Sputum Treated with *N* -Acetyl Cysteine'. *Nanomedicine* 6 (2): 365–75. https://doi.org/10.2217/nnm.10.123.

Sulea, Traian, Nazanin Rohani, Jason Baardsnes, Christopher R. Corbeil, Christophe Deprez, Yuneivy Cepero-Donates, Alma Robert, et al. 2020. 'Structure-Based Engineering of PH-Dependent Antibody Binding for Selective Targeting of Solid-Tumor Microenvironment'. *MAbs* 12 (1): 1682866. https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1682866.

Tanaka, Toshio, Masashi Narazaki, and Tadamitsu Kishimoto. 2018. 'Interleukin (IL-6) Immunotherapy'. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (8): a028456. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028456.

Tarantino, Paolo, Stefania Morganti, Jacopo Uliano, Federica Giugliano, Edoardo Crimini, and Giuseppe Curigliano. 2021. 'Margetuximab for the Treatment of HER2-Positive Metastatic Breast Cancer'. *Expert Opinion on Biological Therapy* 21 (2): 127–33. https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1856812.

'The Human Protein Atlas'. n.d. Organisation. Accessed 24 January 2022. https://www.proteinatlas.org.

The Human Protein Atlas - ERBB2. 2022. 'The Human Protein Atlas - ERBB2'. 27 September 2022. https://www.proteinatlas.org/ENSG00000141736-ERBB2/tissue.

The Human Protein Atlas - Nectin4. 2022. 'The Human Protein Atlas - Nectin4'. 27 September 2022. https://www.proteinatlas.org/ENSG00000143217-NECTIN4/tissue.

Thiele, Holger, Jochen Wöhrle, Rainer Hambrecht, Harald Rittger, Ralf Birkemeyer, Bernward Lauer, Petra Neuhaus, et al. 2012. 'Intracoronary versus Intravenous Bolus Abciximab during Primary Percutaneous Coronary Intervention in Patients with Acute ST-Elevation Myocardial Infarction: A Randomised Trial'. *The Lancet* 379 (9819): 923–31. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61872-2.

Thurber, G. M., S. C. Zajic, and K. D. Wittrup. 2007. 'Theoretic Criteria for Antibody Penetration into Solid Tumors and Micrometastases'. *Journal of Nuclear Medicine* 48 (6): 995–99. https://doi.org/10.2967/jnumed.106.037069.

Thurber, Greg M., Michael M. Schmidt, and K. Dane Wittrup. 2008. 'Antibody Tumor Penetration: Transport Opposed by Systemic and Antigen-Mediated Clearance'. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (12): 1421–34. https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.04.012.

Topp, Max S., Johannes Duell, Gerhard Zugmaier, Michel Attal, Philippe Moreau, Christian Langer, Jan Krönke, et al. 2020. 'Anti–B-Cell Maturation Antigen BiTE Molecule AMG 420 Induces Responses in Multiple Myeloma'. *Journal of Clinical Oncology* 38 (8): 775–83. https://doi.org/10.1200/JCO.19.02657.

Tran, Quynh T., Lawrence H. Kennedy, Sandra Leon Carrion, Sridevi Bodreddigari, Shirlean B. Goodwin, Carrie H. Sutter, and Thomas R. Sutter. 2012. 'EGFR Regulation of Epidermal Barrier Function'. *Physiological Genomics* 44 (8): 455–69. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00176.2011.

Trang, Vivian H., Xinqun Zhang, Roma C. Yumul, Weiping Zeng, Ivan J. Stone, Serena W. Wo, Melissa M. Dominguez, et al. 2019. 'A Coiled-Coil Masking Domain for Selective Activation of Therapeutic Antibodies'. *Nature Biotechnology* 37 (7): 761–65. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0135-x.

Truffot, Aurélie, Jean-François Jourdil, Barbara Seitz-Polski, Paolo Malvezzi, Vesna Brglez, Françoise Stanke-Labesque, and Elodie Gautier-Veyret. 2021. 'Simultaneous Quantification of Rituximab and

Eculizumab in Human Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Comparison with Rituximab ELISA Kits'. *Clinical Biochemistry* 87 (January): 60–66. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2020.10.007.

Umaña, Pablo, Joël Jean–Mairet, Radmila Moudry, Hanspeter Amstutz, and James E. Bailey. 1999. 'Engineered Glycoforms of an Antineuroblastoma IgG1 with Optimized Antibody-Dependent Cellular Cytotoxic Activity'. *Nature Biotechnology* 17 (2): 176–80. https://doi.org/10.1038/6179.

Verma, Sunil, David Miles, Luca Gianni, Ian E. Krop, Manfred Welslau, José Baselga, Mark Pegram, et al. 2012. 'Trastuzumab Emtansine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer'. *New England Journal of Medicine* 367 (19): 1783–91. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209124.

Vidarsson, Gestur, Gillian Dekkers, and Theo Rispens. 2014. 'IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions'. *Frontiers in Immunology* 5 (October). https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520.

Viola-Villegas, Nerissa Therese, Sean D. Carlin, Ellen Ackerstaff, Kuntal K. Sevak, Vadim Divilov, Inna Serganova, Natalia Kruchevsky, et al. 2014. 'Understanding the Pharmacological Properties of a Metabolic PET Tracer in Prostate Cancer'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (20): 7254–59. https://doi.org/10.1073/pnas.1405240111.

Vivier, Delphine, Sai Kiran Sharma, Pierre Adumeau, Cindy Rodriguez, Kimberly Fung, and Brian M. Zeglis. 2019. 'The Impact of FcγRI Binding on Immuno-PET'. *Journal of Nuclear Medicine* 60 (8): 1174–82. https://doi.org/10.2967/jnumed.118.223636.

Vukosavljevic, Branko, Xabier Murgia, Konrad Schwarzkopf, Ulrich F. Schaefer, Claus-Michael Lehr, and Maike Windbergs. 2017. 'Tracing Molecular and Structural Changes upon Mucolysis with N-Acetyl Cysteine in Human Airway Mucus'. *International Journal of Pharmaceutics* 533 (2): 373–76. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.022.

Walker, Matthew R, John Lund, Keith M THOMPSONt, and Royston Jefferis. 1989. 'Aglycosylation of Human IgGl and IgG3 Monoclonal Antibodies Can Eliminate Recognition by Human Cells Expressing FcγRI and/Or' 259: 7.

Wang, Guanbo, Rob N. de Jong, Ewald T.J. van den Bremer, Frank J. Beurskens, Aran F. Labrijn, Deniz

Ugurlar, Piet Gros, Janine Schuurman, Paul W.H.I. Parren, and Albert J.R. Heck. 2016. 'Molecular Basis of Assembly and Activation of Complement Component C1 in Complex with Immunoglobulin G1 and Antigen'. *Molecular Cell* 63 (1): 135–45. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.016.

Wei, Wanlei, Christopher R. Corbeil, Francis Gaudreault, Christophe Deprez, Enrico O. Purisima, and Traian Sulea. 2022. 'Antibody Mutations Favoring PH-Dependent Binding in Solid Tumor Microenvironments: Insights from Large-Scale Structure-Based Calculations'. *Proteins* 90 (8): 1538–46. https://doi.org/10.1002/prot.26340.

Weinreich, David M., Sumathi Sivapalasingam, Thomas Norton, Shazia Ali, Haitao Gao, Rafia Bhore, Jing Xiao, et al. 2021. 'REGEN-COV Antibody Combination and Outcomes in Outpatients with Covid-19'. *New England Journal of Medicine* 385 (23): e81. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2108163.

Westhovens, Rene, Piotr Wiland, Marek Zawadzki, Delina Ivanova, Alfredo Berrocal Kasay, Elias Chalouhi El-Khouri, Éva Balázs, et al. 2021. 'Efficacy, Pharmacokinetics and Safety of Subcutaneous versus Intravenous CT-P13 in Rheumatoid Arthritis: A Randomized Phase I/III Trial'. *Rheumatology* 60 (5): 2277–87. https://doi.org/10.1093/rheumatology/keaa580.

White, Ann L., H. T. Claude Chan, Ali Roghanian, Ruth R. French, C. Ian Mockridge, Alison L. Tutt, Sandra V. Dixon, et al. 2011. 'Interaction with FcγRIIB Is Critical for the Agonistic Activity of Anti-CD40 Monoclonal Antibody'. *The Journal of Immunology* 187 (4): 1754–63. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101135.

Wong, Oi Kwan, Thomas-Toan Tran, Wei-Hsien Ho, Meritxell Galindo Casas, Melinda Au, Marjorie Bateman, Kevin C. Lindquist, et al. 2018. 'RN765C, a Low Affinity EGFR Antibody Drug Conjugate with Potent Anti-Tumor Activity in Preclinical Solid Tumor Models'. *Oncotarget* 9 (71): 33446–58. https://doi.org/10.18632/oncotarget.26002.

Xu, Xiaoxia, Teli Liu, Fei Liu, Xiaoyi Guo, Lei Xia, Qing Xie, Nan Li, et al. 2019. 'Synthesis and Evaluation of 64Cu-Radiolabeled NOTA-Cetuximab (64Cu-NOTA-C225) for Immuno-PET Imaging of EGFR Expression'. *Chinese Journal of Cancer Research* 31 (2): 400–409. https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2019.02.14.

You, Benoit, and Eric X. Chen. 2012. 'Anti-EGFR Monoclonal Antibodies for Treatment of Colorectal Cancers: Development of Cetuximab and Panitumumab'. *The Journal of Clinical Pharmacology* 52 (2):

128–55. https://doi.org/10.1177/0091270010395940.

Yu, Shengnan, Anping Li, Qian Liu, Tengfei Li, Xun Yuan, Xinwei Han, and Kongming Wu. 2017. 'Chimeric Antigen Receptor T Cells: A Novel Therapy for Solid Tumors'. *Journal of Hematology & Oncology* 10 (1): 78. https://doi.org/10.1186/s13045-017-0444-9.

Zalevsky, Jonathan, Aaron K Chamberlain, Holly M Horton, Sher Karki, Irene W L Leung, Thomas J Sproule, Greg A Lazar, Derry C Roopenian, and John R Desjarlais. 2010. 'Enhanced Antibody Half-Life Improves in Vivo Activity'. *Nature Biotechnology* 28 (2): 157–59. https://doi.org/10.1038/nbt.1601.

Zambelli, Alberto, Matteo Giovanni Della Porta, Ermanno Eleuteri, Luciana De Giuli, Oronzo Catalano, Carlo Tondini, and Alberto Riccardi. 2011. 'Predicting and Preventing Cardiotoxicity in the Era of Breast Cancer Targeted Therapies. Novel Molecular Tools for Clinical Issues'. *The Breast* 20 (2): 176–83. https://doi.org/10.1016/j.breast.2010.11.002.

Zhang, Di, Monica V. Goldberg, and Mark L. Chiu. 2016. 'Fc Engineering Approaches to Enhance the Agonism and Effector Functions of an Anti-OX40 Antibody'. *Journal of Biological Chemistry* 291 (53): 27134–46. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.757773.

Zhang, Fenni, Shaopeng Wang, Linliang Yin, Yunze Yang, Yan Guan, Wei Wang, Han Xu, and Nongjian Tao. 2015. 'Quantification of Epidermal Growth Factor Receptor Expression Level and Binding Kinetics on Cell Surfaces by Surface Plasmon Resonance Imaging'. *Analytical Chemistry* 87 (19): 9960–65. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02572.

Zhao, Ben, Lu Wang, Hong Qiu, Mingsheng Zhang, Li Sun, Ping Peng, Qianqian Yu, and Xianglin Yuan. 2017. 'Mechanisms of Resistance to Anti-EGFR Therapy in Colorectal Cancer'. *Oncotarget* 8 (3): 3980–4000. https://doi.org/10.18632/oncotarget.14012.

Zhou, Fang, Ting Fu, Qin Huang, Hailan Kuai, Liuting Mo, Honglin Liu, Qianqian Wang, et al. 2019. 'Hypoxia-Activated PEGylated Conditional Aptamer/Antibody for Cancer Imaging with Improved Specificity'. *Journal of the American Chemical Society* 141 (46): 18421–27. https://doi.org/10.1021/jacs.9b05063.

Zhou, Shujie. 2021. 'The Landscape of Bispecific T Cell Engager in Cancer Treatment', 23.

Zhou, Yu, Anne-Laure Goenaga, Brian D. Harms, Hao Zou, Jianlong Lou, Fraser Conrad, Gregory P.

Adams, Birgit Schoeberl, Ulrik B. Nielsen, and James D. Marks. 2012. 'Impact of Intrinsic Affinity on Functional Binding and Biological Activity of EGFR Antibodies'. *Molecular Cancer Therapeutics* 11 (7): 1467–76. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-1038.

ANNEXE

Abstract

BACKGROUND: Monoclonal antibodies (mAbs) are an important part of targeted therapies in many fields and particularly in cancerology by reaching their targets overexpressed on tumour cells ("on target - on tumour"). However, most of these targets are also expressed at basal level by healthy tissues generating some toxicities ("on target - off tumour"). An affinity antibody property for their targets is a key component of this targeting efficiency. Moreover, the diffusion of antibodies in the tumor is a poorly studied subject and closely related to the targeting efficiency of the mAb and the affinity.

The aim of this project is to study the role of antibody affinity/avidity in tumour binding, diffusion and in the decrease of "on target - off tumour".

METHOD: We developed a range of human antibodies by phage display processing on human EGFR (hEGFR) target with different affinity levels. We studied these affinity levels by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and BIACORE assay by Surface Plasmon Resonance (SPR). We added this affinity feature by variable pH dependency properties. We confirmed this in vitro validation by cytometry assays (FACS) on different cell lines characterized by a gradient of EGFR level (from 103 to 106 receptors/cells) and particularly A 431 and MDAMB 231 cell lines respectively high and medium hEGFR level expression. Finally, in vivo studies were conducted with immunohistochemistry (IHC) analysis and Positron Emission Tomography Computed Tomography (PEC-CT) with antibodies Zirconium-89 radiolabelled to perform longitudinal non-invasive quantitative bio distribution study. In both in vivo studies, mice were xenografted with both tumor (A 431) and "healthy tissue" (MDAMB 231).

RESULTS: We generated six human antibodies specific against human EGFR. Using different in vitro assays, we ranked these antibodies as low, medium and high affinity against EGFR compared with the high affinity Cetuximab and Panitumumab positive controls. We also observed pH dependency properties. Cytometry experiments on different cell lines expressing EGFR showed that only medium affinity level antibodies could bind overexpressed EGFR cell lines but not cell lines with medium and low expression of EGFR (that could mimic healthy tissues) at physiological pH. However, at acidic pH, these medium affinity antibodies could recover their binding abilities on cell line expressing medium level of EGFR without any binding on cell line expressing low level of this target. These medium affinity antibodies should be as effective as high affinity antibodies on tumors while being much less toxic on healthy tissues expressing low levels of the target.

We confirmed these results in vivo with a preferential fixation on A 431 cell line (high hEGFR level expression) rather than on MDAMB 231 cell line (medium hEGFR level expression) for our antibodies while positive control antibodies Cetuximab and Panitumumab bind A 431 and MDAMB 231 cell lines similarly. Indeed, IHC antibody quantification showed that our antibodies bind MDAMB 231 cell line not significantly different than 13R4a negative control antibody but they better significantly bind A 431 cell line than 13R4a antibody. The same results were observed in PET-CT imaging quantification and conventional bio distribution quantification on the same cell lines.

CONCLUSION and PERSPECTIVES: Our initial hypothesis was therefore verified with a selection of antibodies able to bind selectively cell line with high hEGFR level expression in order to reduce "on target - off tumour" toxicity due to binding on healthy tissue with hEGFR medium expression level. Additional research like binding competition or larger scale in vivo studies should increase the robustness of our results.

KEYWORDS: toxicity, affinity, on target off tumor, EGFR, solid cancer, antibody.