



HAL
open science

Assemblage par chimie click de fragments d'anticorps produits en bactéries pour un criblage fonctionnel rapide **in vivo**

Cécile Galmiche

► **To cite this version:**

Cécile Galmiche. Assemblage par chimie click de fragments d'anticorps produits en bactéries pour un criblage fonctionnel rapide in vivo. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONT3507 . tel-02935964v1

HAL Id: tel-02935964

<https://theses.hal.science/tel-02935964v1>

Submitted on 10 Sep 2020 (v1), last revised 22 Sep 2020 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivrée par l'**Université de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale Sciences Chimiques
et Biologiques pour la Santé

Et de l'unité de recherche U1194 - Institut de Recherche en
Cancérologie de Montpellier

Spécialité : **Biochimie**

Présentée par **Cécile GALMICHE**

**Assemblage par chimie click de fragments
d'anticorps produits en bactéries pour un
criblage fonctionnel rapide *in vivo***

Soutenue le 29 septembre 2016 devant le jury composé de

M. Éric REITER, Dr, INRA Val de Loire, UMR 85

Rapporteur

M. Alain WAGNER, Dr, LFCS, UMR 7199

Rapporteur

M. Gilles SUBRA, Pr, IBMM, UMR 5247

Examineur

M. Frédéric TARAN, Dr, CEA Saclay

Examineur

M. Bruno ROBERT, Dr, IRCM, U1194

Directeur de thèse

M. Pierre MARTINEAU, Dr, IRCM, U1194

Co-directeur de thèse



REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury, les Dr Alain Wagner, Éric Reiter et Frédéric Taran et le Pr Gilles Subra d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Ce projet a pu être réalisé grâce aux financements du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et du Labex MAbImprove. Je remercie donc ces deux organismes.

Je remercie le Pr Gilles Thibault et les Dr Mireia Pelegrin et Nathalie Bonnefoy d'avoir pris part à l'évolution de ce projet lors de mes comités de thèse ainsi que nos collaborateurs, les Dr Nicolas Joubert et Sylvain Ursuegui de nous avoir fourni des composés de chimie click.

Merci à mon directeur de thèse, le Dr Bruno Robert (dit Bobby) de m'avoir consacré du temps dès que j'en ai eu besoin, de ne jamais être à court de nouvelles idées et de m'avoir challengée avec tes « pourquoi ? ». Je retiendrai tes phrases favorites : « Réfléchissons peu mais bien » et « Alors ça clique ? » (Eh oui ça aura fini par cliquer !) mais aussi ton goût pour les saucisses de Morteau (excellent choix !). Merci également à mon co-directeur de thèse, le Dr Pierre Martineau, qui s'est toujours montré disponible malgré son emploi du temps de co-directeur et s'est avéré plus efficace que Wikipédia pour répondre à mes questions en tout genre. Je pense que tu es la seule personne capable de se souvenir de la date et du contenu exacts de papiers publiés avant ma naissance !

Merci à vous deux de m'avoir donné l'opportunité de ne pas renier mes origines de chimiste et de m'avoir laissé gérer mes petites affaires sans m'étouffer. Je ne suis pas sûre de pouvoir retrouver un jour des chefs à qui faire de la pub pour des sites internet de ventes si particulières !

Il faut évidemment un paragraphe spécial pour mes grandes soeurs Rotineau. Merci Myriam pour ta gentillesse et pour m'avoir tout appris à mon arrivée, notamment l'art de manier les seringues sans prendre du NaP dans les yeux. La salle bactério et la salle de culture resteront des lieux propices aux confessions insolites. Merci Marianne pour ton aide sur le Fc. Je me souviens de notre première dérivation au PLP comme si c'était hier ! Tes miaulements matinaux et tes « c'est quiiiiii ? » auront rythmé notre vie de paillasse, sans compter tes lavages de mains post-oranges. Avec vous j'ai pu prononcer quotidiennement mon mot fétiche, qui malheureusement, pour des raisons de bienséance, n'a pas sa place dans une thèse.

Merci au reste de l'équipe Martineau de nous avoir bien accueillis quand Bruno, Marianne et moi sommes passés de l'autre côté... de la passerelle. En particulier, merci à Adeline et Nicole

pour votre aide pour la spectro de masse, à Mady d'être énergique en toutes circonstances et de m'avoir coachée à mes débuts sur les Tyro, à Christian pour tes lab-meetings incitant à la consommation de plantes, à Laurence et Vincent pour vos chansons rétro qui me sont restées dans la tête. Merci Déborah (houhou !) de m'avoir fait découvrir Bridget. Pardon de m'être moquée de tes divers accessoires roses dès que j'en ai eu l'occasion ! Merci à Julie et Emilie d'avoir pris la relève des miaulements de Marianne, et à Sheila d'avoir accéléré la montée en température des bains secs.

Merci aussi aux CG avec qui nous avons partagé le bureau (et aussi mes initiales !). Merci à Eve (la combi) de m'avoir fait jeter mon plateau suite à une sombre histoire d'escalopes, à Matthieu d'avoir partagé sa passion porcine avec moi et à Hanane d'avoir fait raisonner son rire dans le couloir !

Je compte sur vous tous pour perpétuer les valeurs du CDR...

Je remercie également le Dr André Pèlegri et son équipe, au sein de laquelle j'ai passé ma première année de thèse. Merci à Gene et Sabine d'avoir pris soin de mes cellules, à Christel pour m'avoir divulgué sa recette de test de viabilité, à Charline pour m'avoir fait découvrir Dikkenek et pour sa solidarité d'accent franc-comtois, à Romaing pour son interprétation de Claude François, à Rana pour sa présence à la G-Box, et à Pauline pour son fond d'écran félin en séminaire. Merci également à Alex et Riad, qui ont partagé nos délires, et à Marion, avec qui j'ai partagé les bongours et les okayyyy ! Une pensée pour Théo et ses anecdotes toujours cocasses. Vivement que nos yaourts soient mis sur le marché !

En hors catégorie, merci à Laurie (cuir moustache) pour ses roucoulements dans le couloir qui sont de plus en plus ressemblants. Merci aussi à Philippe pour les innombrables boîtes de Petri et les mètres cubes de LB qui ont été nécessaires à la croissance de mes enfants bactéries.

Dédicace aux ENSCMIennes : merci à Elodie (psssst) qui a toujours écouté mes plaintes matinales quand j'allais chercher ma glace, à Coralie d'avoir été mon bras droit de TP et de m'avoir fait courir comme un lapin. Je te pardonne pour ce diaporama rose bonbon ! Merci à Lucie et Laura pour nos virées diverses. Les derniers seront les premiers, comme l'a dit Céline Dion !

Enfin, merci à mes parents et beaux-parents pour leur soutien et pour m'avoir épargnée de faire la cuisine quand ils sont venus à Montpellier. Lucette, je te pardonne d'avoir laissé trainer tes cheveux partout ! Raymond, tu resteras le joueur de bowling le plus dangereux !

Pour terminer, merci à tous ceux dont les paroles seront à jamais gravées dans mon carnet vert. J'emporterai vos contributions avec moi ! Ces 3 années m'auront laissé des séquelles : impossible d'ajouter du citron dans une Despé sans penser à une culture d'*E. coli* prête à être induite !

Je dédie cette thèse à Sandrine, reine du bon appétit ainsi qu'à Stéphane, roi de la sauce au poivre sur les pâtes.

Terminé bonsoir !

TABLE DES MATIÈRES

ABRÉVIATIONS	11
INTRODUCTION	15
<hr/>	
A. GENERALITES SUR LES ANTICORPS	15
1. Structure	15
2. Fonctions biologiques	17
a. Reconnaissance d'un antigène	17
b. Fonctions effectrices	18
i. Récepteurs au fragment Fc (FcR)	18
ii. FcRn	21
iii. Activation du système du complément	22
B. LES ANTICORPS MONOCLONAUX THERAPEUTIQUES	22
1. Découverte	22
2. Des anticorps murins aux anticorps humains	23
3. Formats alternatifs	27
4. Production d'anticorps monoclonaux recombinants	29
a. Choix de la technique de production	29
b. Production en cellules eucaryotes	30
i. Cellules mammifères	30
ii. Levures	32
c. Production en cellules procaryotes	33
i. Production en périplasme	34
ii. Production en cytoplasme	35
iii. Production en cytoplasme oxydant	36
iv. Alternatives à l'absence de glycosylation	37
5. Applications thérapeutiques et cibles	39
6. Mécanismes d'action des anticorps anti-cancéreux	41
7. Optimisation des anticorps	44
a. Optimisation des effets directs du Fab	45
b. Diminution de l'immunogénicité	46
c. Modulation des fonctions effectrices	47
i. Isotype	47
ii. Glycosylation et FcγR	47
iii. Mutations ponctuelles et FcγR	48
iv. Activation du complément	49
d. Pharmacocinétique et biodistribution	50

C. CONJUGAISONS BIO-ORTHOAGONALES	53
1. Contexte des couplages protéiques	53
2. Rôles et enjeux des couplages sur les anticorps thérapeutiques	54
3. Couplages sur des fonctionnalités natives	55
a. Lysines	55
b. Cystéines	56
c. Histidines	58
d. Glutamines	60
4. Couplages sur des fonctionnalités extrinsèques	65
a. Aldéhydes et cétones	65
i. Incorporation <i>in vitro</i> en N-terminal	66
ii. Incorporation <i>in vivo</i>	68
iii. Couplages sur les aldéhydes et cétones	70
b. Azides	70
i. Ligation de Stauginger	71
ii. Chimie click catalysée au cuivre	71
iii. Chimie click sans cuivre	73
OBJECTIFS DE LA THÈSE	77
RÉSULTATS	79
<hr/>	
A. CONSTRUCTION DES FRAGMENTS CONTENANT LES TAGS DE CHIMIE CLICK	79
1. Choix des stratégies de fonctionnalisation pour la chimie click	79
2. Construction des vecteurs contenant les tags	79
B. PRODUCTION ET PURIFICATION DES FRAGMENTS D'ANTICORPS	81
1. Fragment Fc	81
a. Production en cellules eucaryotes et purification	81
b. Fonctionnalité	82
2. Fragments scFv	83
a. Production chez <i>E. coli</i> et purification	83
i. Production périplasmique	83
ii. Production cytoplasmique	84
b. Oxydation des scFv cytoplasmiques	86
i. Production en cytoplasme oxydant	87
ii. Oxydation au sulfate de cuivre des scFv purifiés	88
c. Fonctionnalité des scFv cytoplasmiques	89
3. Fragments Fab	90
a. Construction à un promoteur	90
i. Production cytoplasmique	90

ii	Production périplasmique	91
b.	Construction à deux promoteurs	92
C.	FONCTIONNALISATION DES FRAGMENTS POUR LA CHIMIE CLICK	94
1.	Principe	94
2.	PLP	94
3.	Bis-sulfones	96
4.	Cystéine libre	100
a.	Dérivation au maléimide	100
b.	Dérivation à l'APN	103
5.	Transglutaminase	104
a.	Dérivation du scFv	104
b.	Dérivation du Fc	108
c.	Optimisation des conditions de couplage	112
6.	Transglutaminase et dérivation des cystéines	118
D.	COUPLAGE DES FRAGMENTS SCFV AU FRAGMENT Fc PAR CHIMIE CLICK	120
1.	Choix de la stratégie de couplage	120
2.	Optimisation des conditions de couplage	126
3.	Fonctionnalité des fragments (scFv) ₂ -Fc couplés	132
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	135
	MATÉRIELS ET MÉTHODES	143
<hr/>		
A.	CONSTRUCTION DES VECTEURS CONTENANT LES TAGS DE CHIMIE CLICK	143
1.	Construction des vecteurs	143
2.	Mutagenèse dirigée	145
3.	Séquences protéiques des fragments construits	146
B.	EXPRESSION DES FRAGMENTS D'ANTICORPS	149
1.	Transfection transitoire de cellules HEK 293T	149
2.	Préparation de bactéries compétentes au RbCl	149
3.	Production de scFv en périplasme de BL21(DE3)	150
a.	Lyse par choc osmotique	150
b.	Lyse par le lysozyme	151
c.	Lyse par la polymyxine B	151
4.	Production de scFv en cytoplasme de BL21(DE3)	152
a.	Auto-induction	152
b.	Lyse des bactéries	152
c.	Cas particulier : production de scFv avec une surexpression de la FGE	153

5.	Production de scFv en cytoplasme pseudo-oxydant de BL21(DE3)/pFH255	154
C.	PURIFICATION DES FRAGMENTS D'ANTICORPS	154
1.	Purification sur protéine A	154
2.	Purification sur colonne de nickel	155
3.	Dessalage/changement de tampon	155
D.	FONCTIONNALISATION ET COUPLAGE DES FRAGMENTS SCFV ET Fc	155
1.	Fonctionnalisation par le PLP	155
2.	Fonctionnalisation par les bis-sulfones	156
3.	Fonctionnalisation sur la/les cystéine(s) libre(s)	156
a.	Couplage du maléimide	156
i	scFv	156
ii	Fc	157
b.	Couplage de l'APN	157
4.	Fonctionnalisation par la transglutaminase	157
5.	Détection des fonctions de chimie click par fluorescence	158
6.	Quantification des couplages entre scFv et Fc	159
E.	TESTS FONCTIONNELS	159
1.	Test de stabilité thermique	159
2.	Détection par western blot	160
3.	Analyse des fragments Fc par spectrométrie de masse	160
4.	Cytométrie en flux	160

BIBLIOGRAPHIE

163

ABRÉVIATIONS

ADC : Antibody Drug Conjugate

ADCC : Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity

ADIBO : azadibenzocyclooctyne

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AF488 : Alexa Fluor® 488

Ald. tag : aldéhyde tag

Amp : ampicilline

APN : 3-arylpropionitrile

BCN : bicyclo[6.1.0]nonyne

BiTE : bispecific T-cell engager

BSA : Bovine Serum Albumin

CDC : Complement Dependent Cytotoxicity

CDR : Complementarity Determining Region

CH : Constant Heavy chain

CHO : Chinese Hamster Ovary

CL : Constant Light chain

CR110 : carboxyrhodamine 110

Cys : cystéine

dAb : domain antibody

DART : dual affinity retargeting molecule

DBCO : azadibenzocyclooctyne

DIBAC : dibenzoazacyclooctyne

DM1 : maytansinoïde 1

DMSO : diméthylsulfoxyde

DTT : Dithiothreitol

E.coli : *Escherichia coli*

EDTA : Éthylène Diamine Tétracétique

ELISA : enzyme linked immunosorbent assay

EMA : European Medicines Agency

éq : équivalents molaires

Fab : Fragment antigen binding

FACS : Fluorescence-Assisted Cell Sorting

Fc : fragment cristallisable d'un anticorps

FcγR : récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines G

FDA : Food and Drug Administration

FGE : Formylglycine Generating Enzyme

FITC : fluorescein isothiocyanate

HC : Heavy Chain

HEK : Human Embryonic Kidney

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HER : Human Epidermal growth factor Receptor

Ig : immunoglobuline

IPTG : isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

kDa : kilodaltons

LB : milieu Luria-Bertani

LC : Light Chain

mRNA : Acide RiboNucléique messenger

MWCO : molecular weight cut-off

N₃ : azide

NP-40 : Nonidet P-40

PBS : Phosphate Buffer Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEG : polyéthylène glycol

PEI : polyéthylèneimine

PLP : pyridoxal 5'-phosphate

Qtag : glutamine tag (LLQGA)

scFab : single chain antigen binding fragment

scFv : single chain variable fragment

sdAb : single domain antibody

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SMCC : succinimidyl 4-(N-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate

SVF : sérum de veau foetal

TA : température ambiante

TBS : Tris Buffer Saline

TCEP : Tris(2-CarboxyEthyl)Phosphine

Tet : tétracycline

TG : transglutaminase microbienne (*S. mobaraense*)

Tm : melting temperature

VC : volume de la colonne

VH : Variable Heavy chain

VL : Variable Light chain

WB : western blot

WT : wild-type

Zeo : zéocine

INTRODUCTION

A. Généralités sur les anticorps

1. Structure

Les anticorps sont des glycoprotéines hétérodimériques de la superfamille des immunoglobulines d'environ 150 kDa. Ils sont constitués de 4 chaînes polypeptidiques reliées entre elles par un ou plusieurs ponts disulfures : 2 chaînes lourdes (HC pour *Heavy Chain*) de 50 kDa chacune et deux chaînes légères (LC pour *Light Chain*) de 25 kDa chacune. Au sein de chaque chaîne se trouvent des domaines immunoglobulines d'une centaine d'acides aminés composés de 2 feuillets beta antiparallèles superposés. Chacun contient un pont disulfure intrachaine formé par des cystéines très conservées (Williams and Barclay, 1988). Ces ponts disulfures ainsi que des interactions hydrophobes stabilisent la structure globale en forme de Y (Figure 1A).

Des domaines constants et variables composent les chaînes lourdes et légères. Les fragments variables sont situés en N-terminal de chaque chaîne : VH pour la chaîne lourde et VL pour la chaîne légère. Ils sont les déterminants de la reconnaissance de l'antigène par l'anticorps, par le biais de leur fragment variable Fv, constitué du VH et du VL. Ce sont plus particulièrement les résidus des régions hypervariables ou CDR (*Complementary Determining Region*), situés sur 3 boucles du VH et 3 boucles du VL et comprenant chacun une quinzaine d'acides aminés, qui sont impliqués. Ces résidus constituant le paratope de l'anticorps sont situés entre des régions charpentes (ou *frameworks*). La structure tridimensionnelle en feuillets et boucles rend ces CDR proches dans l'espace (Figure 1B). Ils vont donc interagir pour former un site de fixation sur l'antigène (Novotný et al., 1983). Par définition, ces parties hypervariables sont peu conservées d'un anticorps à l'autre alors que les régions framework le sont davantage. Leur séquence et leur organisation spatiale sont responsables de la spécificité de l'épitope ciblé sur l'antigène et de la diversité du répertoire d'anticorps existant naturellement.

A l'inverse, la partie constante est très peu variable d'un anticorps à l'autre. Elle est constituée des domaines CH1, CH2 et CH3 (voire CH4) sur les chaînes lourdes et du domaine CL sur les chaînes légères (Figure 1A). Cependant, les parties constantes seront différentes suivant les espèces et les différents isotypes. Il y aura alors des différences de séquence primaire et de structure, notamment au niveau du nombre de ponts disulfures inter-chaînes et de la positions des cystéines impliquées dans leur formation. Chez l'Homme, il y a 5 isotypes ou classes pour la chaîne lourde : α , δ , γ , ϵ et μ qui donnent respectivement des immunoglobulines IgA, IgD, IgG, IgE et IgM, et 2 isotypes pour les chaînes légères : κ et λ . Au sein d'un même isotype, on

trouve quelques différences ponctuelles générant plusieurs sous-classes, ou allotypes. Entre les domaines CH1 et CH2 se trouve la région charnière (*hinge*). Elle comprend entre 1 et 5 ponts disulfures suivant la classe et la sous-classe de l'Ig. L'absence d'hélice α ou de boucle β dans cette zone confère à l'anticorps une grande flexibilité. Bien qu'elle fasse partie du domaine constant, la séquence de la charnière est très variable en terme de résidus et de longueur d'une sous-classe à l'autre (Adlersberg, 1976).

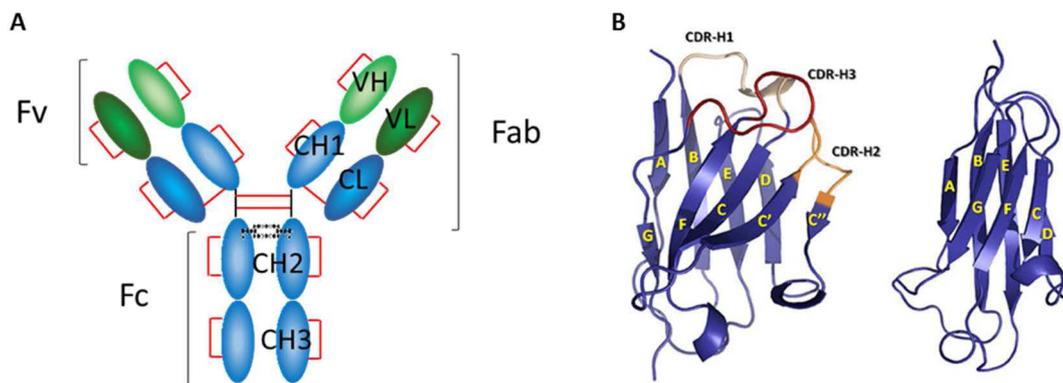


Figure 1 : A) Représentation schématique d'un anticorps. La chaîne légère est en foncé et la chaîne lourde en clair. Les parties constantes sont en bleu et les parties variables en vert. Les traits rouges correspondent aux ponts disulfures intra- et inter-chaînes et les motifs noirs à la glycosylation sur l'Asn 297 du domaine CH2. B) Représentation tridimensionnelle du domaine VH (à gauche) et du domaine CH1 (à droite). Les CDR sont colorés en jaune (CDR-1), orange (CDR-2), et rouge (CDR-3) (Almagro, 2012).

Les sous-unités des anticorps ont été caractérisées par protéolyse car la région charnière est sensible à une attaque protéolytique. La digestion à la papaïne clive la protéine avant le(s) pont(s) disulfure(s) de la région charnière. Deux fragments identiques appelés Fab (*Fragment antigen binding*) car ils contiennent le site de liaison antigénique sont alors libérés. Ces Fab sont donc monovalents contrairement à l'Ig entière qui est divalente. Il se forme également un fragment cristallisable Fc (Coulter and Harris, 1983). La pepsine clive quant à elle en C-terminal de la région charnière. Elle conduit donc à la formation d'un $F(ab')_2$ divalent qui consiste en 2 Fab reliés par les ponts disulfures de la charnière. Le fragment Fc est dans ce cas digéré en courts peptides.

Les anticorps sont glycosylés de façon post-traductionnelle avec des sucres différents et des positions différentes suivant les isotypes. Les IgG le sont au niveau de l'asparagine 297 présente dans les 2 domaines CH2. La N-glycosylation se trouve à l'intérieur de la molécule donc les 2 chaînes lourdes sont éloignées l'une de l'autre, ce qui stabilise la structure protéique (Liu et al., 2006). Un anticorps glycosylé devient également plus résistant à la dégradation par des protéases (Raju, 2010). Les sucres présents varient suivant les isotypes et les organismes dont les anticorps sont issus. Dans les IgG humaines, un complexe bi-antenné heptamérique

composé de N-acétylglucosamine et de mannose constitue le motif de base. Des fucoses, galactoses et acides sialiques peuvent le compléter (Figure 2). On peut également trouver des N-glycosylations au niveau du fragment Fab (sur 10-20%) mais elles sont généralement moins complexes car plus accessibles aux glycosyltransférases et aux glycosidases. Les autres isotypes peuvent présenter des O-glycosylations sur des sérines et des thréonines mais les motifs ne sont pas facilement identifiables.

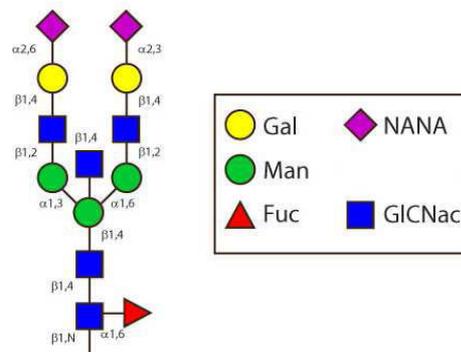


Figure 2 : Représentation des oligosaccharides trouvés dans les IgG humaines. Gal : galactose, Man : mannose, Fuc: fucose, GICNac : N-acétylglucosamine, NANA : acide N-acétylneuraminique. D'après <http://www.imgt.org>.

2. Fonctions biologiques

a. Reconnaissance d'un antigène

Les anticorps sont produits par le système immunitaire pour se lier aux éléments étrangers pénétrant dans un organisme (comme les bactéries ou les virus) et les neutraliser. Ils sont acteurs de la réponse immunitaire humorale. Leur découverte par von Behring et Shibasaburo date de 1890. Ils ont trouvé la présence d'une substance neutralisante dans le sang d'animaux immunisés contre la diphtérie qui pouvait soigner des animaux atteints par cette pathologie. La haute spécificité des anticorps vis à vis de leur antigène a été établie en 1894. L'injection d'un antigène induit la production d'Ig par les cellules B. Chacune de ces cellules B produit un seul clone d'Ig (Nossal and Lederberg, 1958). Suite à cette immunisation, on trouve dans le sérum plusieurs clones d'anticorps dirigés contre un même antigène. On parle alors d'anticorps polyclonaux. Cette diversité des anticorps est assurée par des mécanismes de recombinaison des gènes V et J et V, D et J codant respectivement pour les parties variable de la chaîne légère et de la chaîne lourde (Tonegawa, 1988). L'affinité d'un anticorps quantifie sa force d'interaction à son antigène. L'avidité représente quant à elle l'interaction multivalente avec l'antigène plurivalent. Par exemple, les IgM ont une faible affinité mais leur pentamérisation leur confère une grande avidité.

b. Fonctions effectrices

Le fragment Fc possède quant à lui des fonctions effectrices et est à l'origine de plusieurs processus : transport des anticorps à travers la barrière placentaire, transport transépithélial, inhibition du catabolisme, et activation des voies cytotoxiques dépendantes du complément ou de cellules immunitaires. Le lien entre le système immunitaire et les anticorps est assuré par leur interaction via les protéines du complément et les récepteurs au fragment Fc.

Les classes d'Ig sont impliquées de façon différente dans ces processus. Les IgG sont la classe la plus présente dans le corps humain, avec la plus longue demi-vie dans le sérum comparé aux autres isotypes. Les fonctions effectrices seront décrites ci-dessous uniquement pour cet isotype. Les différentes sous-classes (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) n'ont pas une région charnière de même taille (entre 12 et 62 résidus) ni le même nombre de ponts disulfures (entre 2 et 11), ce qui entraîne des différences de flexibilité de la molécule d'Ig. Ceci combiné avec des différences de séquences protéiques conduit à des fonctions effectrices différentes (Tableau 1). De plus, elles présentent des différences en terme de stabilité : les IgG3 sont connues pour former des agrégats, les IgG2 pour être composées de différentes isoformes de ponts disulfures, et les IgG4 pour participer à des échanges intermoléculaires conduisant à la formation d'un mélange d'anticorps bispécifiques (Rispen et al., 2011).

Au sein d'une même sous-classe, on trouve différents allotypes qui peuvent avoir une influence sur les propriétés effectrices. Par exemple, une IgG2 humaine possédant une phénylalanine en position 158 ne se liera pas au FcγRIIIa alors qu'une IgG2 possédant une valine s'y liera (Tableau 1).

i. Récepteurs au fragment Fc (FcR)

Il y a différents types de FcR, classés en fonction de l'isotype des immunoglobulines qu'ils sont capables de lier. Les FcγR sont ainsi spécifiques des IgG. Ils font partie de la superfamille des immunoglobulines et sont divisés en 3 classes : I, II et III. Les classes II et III sont divisées respectivement en 3 et 2 isoformes : A, B, (C). Ces récepteurs sont entre autres exprimés à la surface de beaucoup de cellules hématopoïétiques du système immunitaire. En reconnaissant le fragment Fc des IgG, ils font le lien entre l'immunité humorale et l'immunité à médiation cellulaire. Les FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIC, FcγRIIIA et FcγRIIIB sont activateurs alors que le récepteur FcγRIIB est inhibiteur. Ces propriétés sont corrélées avec la présence d'un motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) ou ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) situé dans la région cytoplasmique des récepteurs et qui est impliqué dans la transduction de signal.

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
General				
Molecular mass (kD)	146	146	170	146
Amino acids in hinge region	15	12	62 ^a	12
Inter-heavy chain disulfide bonds	2	4	11 ^a	2
Relative abundance (%)	60	32	4	4
Half-life (days)	21	21	7/~21 ^a	21
Complement activation				
C1q binding	++	+	+++	-
Fc receptors				
FcγRI	+++	-	++++	++
FcγRIIA _{H131}	+++	++	++++	++
FcγRIIA _{R131}	+++	+	++++	++
FcγRIIB/C	+	-	++	+
FcγRIIA _{F158}	++	-	++++	-
FcγRIIA _{V158}	+++	+	++++	++
FcγRIIb	+++	-	++++	-
FcRn (at pH < 6.5)	+++	+++	++/++++ ^a	+++

^aDepends on allotype.

Tableau 1 : Propriétés des sous classes d'IgG humaines (Vidarsson et al., 2014)

Le site de fixation des FcγR se situe au niveau de l'extrémité N-terminale des domaines CH2, notamment via les résidus 234–239, 265–269, 297–299, et 327–330 (Ramsland et al., 2011; Sondermann et al., 2000). Les différences de résidus en fonction des sous classes d'IgG influent donc sur la liaison aux FcγR : les IgG1 et 3 se lient à tous les types de FcγR, les IgG4 se lient seulement aux FcγRI et II, et les IgG2 uniquement au FcγRII. La glycosylation sur l'Asn 297 joue également un rôle crucial. L'absence de celle-ci se traduit par un désordre dans la boucle C'E du domaine CH2 et une diminution de la distance entre les domaines CH2. La

liaison aux FcγR est alors fortement diminuée (Borrok et al., 2012). Le FcγRI est le FcγR présentant la meilleure affinité, notamment pour les IgG1 et 3 et dans une moindre mesure pour les IgG4. Il est le seul capable de lier les IgG monomériques. Les FcγRII et III ont quant à eux une affinité plus faible. L'affinité des FcγRIII peut être augmentée en afucosylant le glycane du Fc. Cet aspect sera traité dans la partie « optimisation des anticorps » (A.5.a.ii).

Les FcγR sont présents en surface de différentes populations cellulaires (Nimmerjahn et al., 2015). Leur liaison au fragment Fc entraînent différents processus : l'ADCC et la phagocytose (Tableau 2).

	FcγRI	FcγRIIA	FcγRIIB	FcγRIIC	FcγRIIIA	FcγRIIIB
Synonyme	CD64	CD32a	CD32b	CD32c	CD16a	CD16b
Motif	Activateur	Activateur	Inhibiteur	Activateur	Activateur	Activateur
Distribution	Monocytes, MΦ, DC	Monocytes, MΦ, DC, neutrophiles	Monocytes, DC, LB, neutrophiles	NK (parfois)	NK, DC, MΦ	Neutrophiles
Fonctions	ADCC, (phag.)	ADCC, phag.	Tolérance immune		ADCC, phag.	

Tableau 2 : Distribution cellulaire et rôles des différents FcγR humains. MΦ : macrophages, DC : cellules dendritiques, NK : cellules Natural Killer, LB : lymphocytes B, phag : phagocytose.

L'ADCC est la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps. C'est une réponse immune innée. Elle est souvent médiée par les cellules NK, qui possèdent à leur surface le FcγRIIIA, mais elle peut aussi être médiée par les macrophages et les neutrophiles. L'interaction Fc-FcγR provoque l'activation de ces cellules immunitaires qui vont alors libérer des molécules cytotoxiques (perforine, granzyme B et granulysine) conduisant à la mort cellulaire par apoptose. Quand les Fc sont liés à des FcγR en surface des macrophages (majoritairement les FcγRIIA et IIIA), il peut y avoir induction de la phagocytose. On parle alors d'ADCP : phagocytose à médiation cellulaire dépendante des anticorps. La liaison des FcγR au Fc des complexes immuns permet aussi de réguler la maturation des cellules dendritiques et donc de déclencher une réponse immune via les lymphocytes T (Dhodapkar et al., 2005).

Comme les cellules effectrices expriment généralement plusieurs types de FcγR à leur surface, notamment des récepteurs activateurs et l'inhibiteur, c'est l'affinité du fragment Fc pour les différents FcγR qui déterminera de quel côté penchera la balance activation/inhibition. Ces affinités sont déterminées par la séquence primaire des différentes sous-classes d'IgG et par leurs motifs de glycosylation.

ii. FcRn

Il existe aussi un autre type de FcR, le récepteur néonatal au Fc (FcRn), qui tire son nom de sa capacité de transcytose placentaire des IgG maternelles au fœtus. Chez l'adulte, il assure le transport des IgG à travers des épithéliums (Spiekermann et al., 2002). Son rôle principal est de réguler le taux d'IgG dans le sérum. Les IgG sont endocytées par les cellules épithéliales dans des endosomes dont le pH acide permet leur liaison au FcRn. Les protéines non liées au FcRn présentes dans ces endosomes sont dégradées par les lysosomes alors que les IgG sont protégées de cette dégradation. Le complexe Fc-FcRn transite ensuite jusqu'à la surface cellulaire où l'IgG est libérée dans le sang à pH neutre (Figure 3). La protection contre la dégradation a également été confirmée dans des modèles murins (Ghetie et al., 1996). Ce phénomène de recyclage contribue à une plus longue demi-vie sérique des IgG (environ 21 jours) par rapport aux autres isotypes (maximum 6 jours). Le FcRn a une structure similaire aux molécules de CMH classe I. Etant exprimé en surface de neutrophiles et de cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques, il contribue également à l'amélioration de la phagocytose de microorganismes opsonisés par des IgG (Vidarsson et al., 2006).

Le FcRn se lie au Fc au niveau de l'interface entre les domaines CH2 et CH3. Cette liaison est donc indépendante de la glycosylation. Les histidines de ces domaines jouent un rôle important dans la capacité de liaison à pH acide (6-6.5) et de libération à pH neutre (7-7.4) (Shields et al., 2001; West and Bjorkman, 2000). En particulier, l'histidine 435 interagit directement avec le FcRn. Les allotypes d'IgG3 contenant une arginine à cette position ont donc une affinité plus faible qui a pour conséquences une demi-vie réduite et un transport placentaire plus faible.

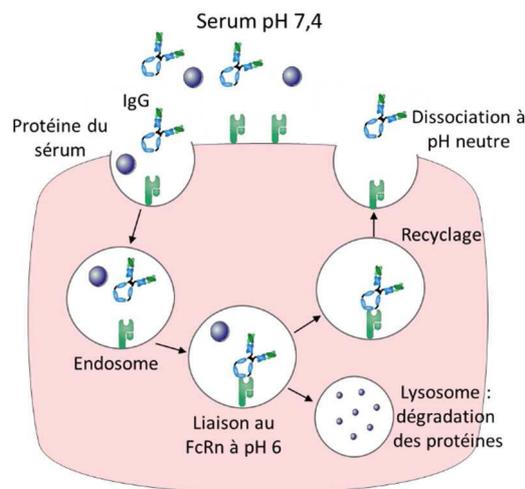


Figure 3 : Recyclage des IgG par le FcRn. Les IgG se lient au FcRn dans les endosomes à pH acide puis sont recyclées et libérées dans le sérum à pH neutre.

iii. Activation du système du complément

Quand 6 IgG ou une IgM pentamérique sont liées à un microorganisme, le fragment Fc est capable d'initier la voie classique de la cascade du complément, qui fait partie de l'immunité innée. La liaison de la protéine C1q au Fc entraîne la fixation de C3b en surface des cellules pour les opsoniser, ainsi que la formation d'un complexe d'attaque (association des protéines C5b à C9) qui va conduire à la lyse cellulaire. Ce phénomène est la CDC : cytotoxicité dépendante du complément. Ce sont les IgG1 et 3 qui activent le mieux la voie classique du complément car le C1q se lie mieux à ces sous-classes. La fixation du C1q peut également potentialiser l'ADCC via la protéine iC3b et son récepteur CDR3 se trouvant en surface des cellules NK et des phagocytes. Ce phénomène est la CDCC : cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante du complément (Diebolder et al., 2014).

Le C1q se lie au niveau des résidus L235, D270, K322, P329 et P331 (numérotation EU) du domaine CH2. L'affinité plus faible pour les IgG2 et IgG4 s'explique donc par la présence de mutations parmi ces résidus (Tao et al., 1993). Les résidus de la région charnière influent également sur la fixation du C1q, notamment les résidus 226 à 230 correspondant au voisinage des ponts disulfures inter-chaines lourdes. La rigidité et la longueur de cette région sont favorables à la fixation (Dall'Acqua et al., 2006). La N-glycosylation de l'asparagine 297 peut aussi influencer sur la liaison du C1q. En particulier, la présence de galactose à l'extrémité du polysaccharide favorise la CDC (Raju, 2008) et l'absence complète de glycosylation empêche cette CDC (Boyd et al., 1995).

B. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques

1. Découverte

L'entrée d'un antigène dans un organisme provoque la production par les lymphocytes B (LB) d'anticorps polyclonaux, c'est à dire dirigés contre plusieurs épitopes. La haute spécificité de ces anticorps et leurs propriétés biologiques en font des outils pertinents de diagnostic et de détection. Au début du 20^{ème} siècle Paul Erlich les a également définis comme des « *magic bullets* » pouvant potentiellement se fixer et avoir un effet sur n'importe quelle cible d'intérêt dans les pathologies humaines.

Les anticorps polyclonaux sont produits par immunisation d'animaux comme par exemple les souris, les rats ou les lapins. Le problème de cette polyclonalité est que la composition n'est pas connue exactement et fluctue d'une immunisation à l'autre. En 1975, Köhler et Millstein ont découvert un moyen d'obtenir des anticorps monoclonaux, c'est à dire issus d'une seule lignée de plasmocytes. Les animaux (généralement des souris) sont immunisés par

inoculation d'un antigène pour déclencher une réponse immunitaire. Celui-ci doit être de taille suffisamment importante (supérieur à environ 6 kDa) et suffisamment complexe en terme de structure (sans motifs répétés comme c'est le cas dans les polymères par exemple) (Gaughan, 2015). Les plasmocytes présents dans la rate sont isolés. Ils sont fusionnés avec des cellules de myélome, un cancer hématologique touchant les plasmocytes, de la même espèce. Les hybridomes ainsi obtenus sont donc immortalisés (comme les cellules cancéreuses) et produisent des anticorps murins. Ils sont alors isolés par dilution limite pour n'avoir qu'un seul hybridome exprimant un seul clone d'anticorps par puit. On parle alors d'anticorps monoclonaux (Köhler and Milstein, 1975). Ces hybridomes sont alors testés *in vitro* pour déterminer leur capacité à se lier à l'antigène. Les meilleurs clones sont ensuite amplifiés par culture cellulaire classique ou en injectant l'hybridome dans la cavité péritonéale de souris et en prélevant le liquide d'ascite de la tumeur développée. Après purification, leurs activités biologiques *in vitro* et *in vivo* sont testées (Figure 4).

Les premiers anticorps monoclonaux produits à partir d'une sélection par hybridomes étaient donc murins. Ils portent le suffixe « momab ». Le muromomab (Orthoclone OKT3™) est le premier à avoir été approuvé par la FDA en 1986. C'est un anti-CD3, une protéine membranaire située à la surface des LT, qui est utilisé pour éviter les rejets de greffes du rein. Malgré la facilité à obtenir des anticorps efficaces à partir d'hybridomes, une fois injectés à l'Homme ces anticorps murins provoquent des réactions immunitaires conduisant à la production d'anticorps humains anti-souris (Schroff et al., 1985).

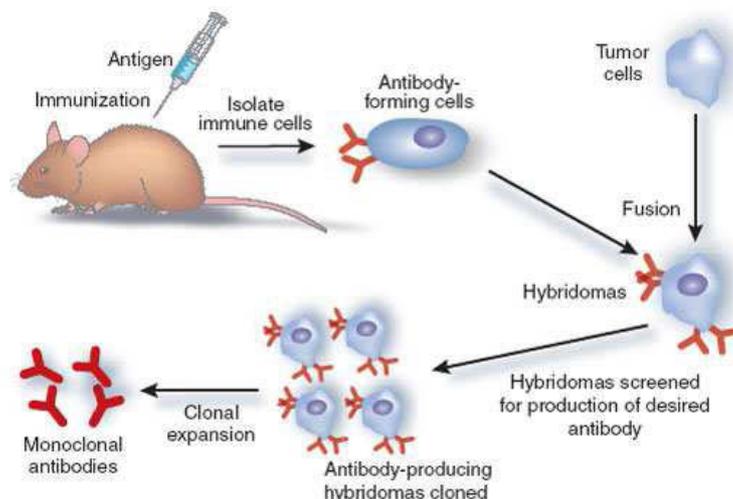


Figure 4 : Principe de la production d'hybridomes. (Michnick and Sidhu, 2008)

2. Des anticorps murins aux anticorps humains

Pour pallier à cette immunogénicité, les parties constantes murines des anticorps murins obtenus par hybridomes ont été remplacées par des parties constantes humaines, tout en

conservant des parties variables murines (Morrison et al., 1984) (Figure 5). Ces anticorps sont définis comme étant chimériques et portent le suffixe « ximab ». Ils sont moins immunogènes que leurs équivalents murins et permettent la contribution des fonctions effectrices du fragment Fc (ADCC, CDC, etc) qui favorisent la cytotoxicité.

Pour diminuer encore l'immunogénicité, des anticorps humanisés ont été développés et portent le suffixe « zumab ». Il n'y a plus que les CDR qui sont murins dans ce type de construction, ce qui représente environ 10% des résidus (Figure 5). Ces CDR sont introduits dans une charpente humaine par « CDR grafting » (Jones et al., 1986). Cependant, l'affinité et la spécificité peuvent être affectées par l'humanisation car certains résidus, bien que situés au sein des frameworks, participent à l'interaction avec l'antigène ou contribuent à la conformation des CDR. Il peut donc y avoir nécessité d'identification et de conservation de résidus murins critiques dans les régions frameworks (Wu et al., 1999). La deuxième possibilité est d'humaniser des anticorps chimériques par « resurfacing ». Peu de résidus accessibles en surface des frameworks des domaines variables ont besoin d'être mutés pour transformer une surface « murine » en surface « humaine » (Roguska et al., 1994).

Ces étapes d'humanisation succédant à la sélection d'anticorps pertinents sont longues et complexes à mettre en œuvre. Elles sont généralement réalisées sur un nombre très limité de candidats. Différentes alternatives ont donc été développées pour obtenir directement des anticorps humains.

A l'heure actuelle, il reste difficile techniquement de générer des hybridomes stables produisant des anticorps totalement humains de haute affinité et fonctionnels. Il est possible de fusionner des cellules B et des cellules de myélome ou de les immortaliser en les infectant par le virus Epstein-Barr. Les problèmes rencontrés avec ces techniques sont notamment la difficulté à immortaliser ces LB de façon stable et la faible productivité. Néanmoins, des progrès ont été faits dans ce domaine ces dernières années et d'autres améliorations pourraient rendre cette technologie plus accessible (Smith and Crowe, 2015).

Des anticorps humains peuvent aussi être produits par des animaux transgéniques ou trans-chromosomiques depuis 1994. Cette technique combine la technologie des hybridomes et les manipulations génétiques des souris chez qui on a introduit un répertoire d'anticorps humains au niveau du locus du gène murin correspondant (Green et al., 1994; Lonberg et al., 1994). Les anticorps produits subissent donc le même type de maturation que les anticorps naturels, ce qui génère une diversité et une affinité semblables à celles rencontrées chez l'Homme. Cette technologie est commercialisée par plusieurs entreprises pharmaceutiques et la sélection d'anticorps thérapeutiques est réalisée de la même façon qu'avec les hybridomes

classiques. Jusqu'à maintenant, les anticorps produits par ce moyen n'ont pas conduit à des réactions immunitaires au cours des essais cliniques.

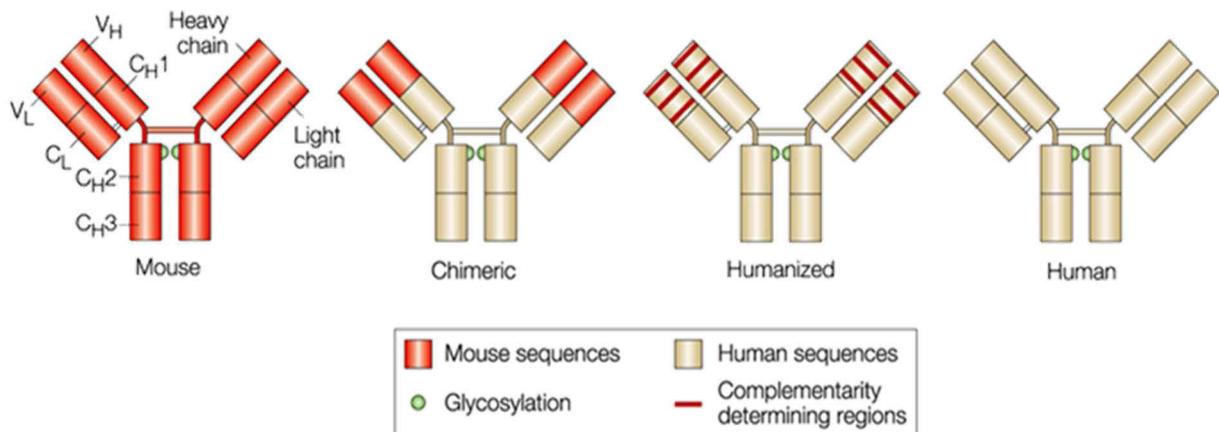


Figure 5 : Principe de l'humanisation des anticorps monoclonaux (adapté de Carter, 2001).

Grâce aux bases de données de séquences d'Ig humaines, des librairies d'anticorps complètement humains ont vu le jour. Il y a plusieurs types de librairies :

- les librairies immunes : elles sont obtenues par amplification des cellules B de donneurs infectés ou naturellement immunisés. Les anticorps issus de ce type de librairie ont une bonne affinité pour l'antigène utilisé pour l'immunisation (10^{10} M^{-1}) mais n'ont pas d'utilité pour les autres types d'antigènes. Leur diversité est d'environ 10^5 à 10^7 clones.
- les librairies naïves : elles sont construites à partir d'un répertoire naturel d'anticorps, sans que le sujet soit exposé à un antigène particulier. Elles ne sont donc pas biaisées en terme de diversité et comptent environ 10^{10} clones. Les affinités des clones obtenus restent cependant modérées ($10^7 - 10^9 \text{ M}^{-1}$)
- les librairies semi-synthétiques : elles combinent une diversité naturelle et synthétique. A partir d'un/plusieurs gène(s) d'Ig naturelle(s), une partie est mutée pour générer de la diversité. Par exemple le CDR3, qui est la partie hypervariable la plus critique dans la liaison à l'antigène, a été randomisé par PCR avec des oligonucléotides dégénérés pour contenir tous les acides aminés possibles à toutes les positions (de Kruif et al., 1995).
- les librairies synthétiques : elles sont développées *in silico* à partir de la connaissance des lignées germinales des Ig, des mécanismes de réarrangement, ainsi que des structures. Par exemple, le design de la librairie HuCAL est basé sur le fait que seulement 7 familles de VH et 7 familles de VL représentent 95% de la diversité des

anticorps humains. Une séquence consensus a été dérivée de chaque famille. La diversité y a alors été introduite au niveau des CDR3 de façon biaisée pour refléter la variation de longueur et la composition naturelle des CDR3 humains (Knappik et al., 2000). Cette banque contient environ 10^{10} clones et peut virtuellement être utilisée pour sélectionner des anticorps dirigés contre n'importe quelle cible.

Ces bibliothèques contiennent uniquement des fragments d'anticorps sans fragment Fc et non des immunoglobulines entières. Pour sélectionner des clones à partir de ces bibliothèques, plusieurs organismes peuvent être utilisés pour présenter ces fragments à leur surface : les phages filamenteux, les levures, ou les cellules mammifères. Les ribosomes sont une autre alternative. Plus précisément, le phage display est basé sur l'utilisation de bactériophages qui sont des virus infectant les bactéries. Dans le phage filamenteux M13, l'ADN codant pour le fragment d'anticorps est fusionné au gène pIII ou pVIII. Ceux-ci codent respectivement pour les protéines de capsid mineure et majeure. Ainsi, les phages présenteront à leur surface ce fragment d'anticorps fusionné à la protéine pIII ou pVIII. La capacité des phages à présenter des peptides à leur surface a été démontrée par George P. Smith en 1985 (Smith, 1985). L'utilisation du phage display pour sélectionner des anticorps spécifiques d'une cible a été initiée par Gregory Winter dans les années 1990 (Winter et al., 1994). Une banque de phages est mise en contact avec un antigène fixé à un support. Les phages ne se fixant pas à cet antigène sont éliminés par lavage. Ceux qui s'y sont liés sont élués puis amplifiés en infectant des bactéries. Ils sont ensuite remis en contact avec l'antigène et ainsi de suite pendant plusieurs tours de sélection/amplification. Les phages obtenus sont alors testés *in vitro* pour leur capacité à se lier à l'antigène (par ELISA ou FACS par exemple) (Figure 6). Cette technique de phage display mime ce qui se passe naturellement lors d'une infection. En effet, dans ce cas l'antigène se retrouve face à un grand nombre de lymphocytes B présentant chacun un seul type d'anticorps à leur surface. Une fois qu'un anticorps de surface se lie à cet antigène, le lymphocyte est activé et va se différencier en plasmocyte pour sécréter des anticorps, grâce à la sécrétion d'interleukines par les lymphocytes T CD4.

Le phage lie le phénotype (le fragment d'anticorps exposé en surface) et le génotype (l'ADN codé par celui-ci). Il est donc aisé de remonter aux séquences des clones capables de se lier à l'antigène. De plus, l'absence d'immunisation rend possible la sélection d'anticorps difficiles à obtenir chez l'animal, contre des antigènes toxiques ou des protéines du soi.

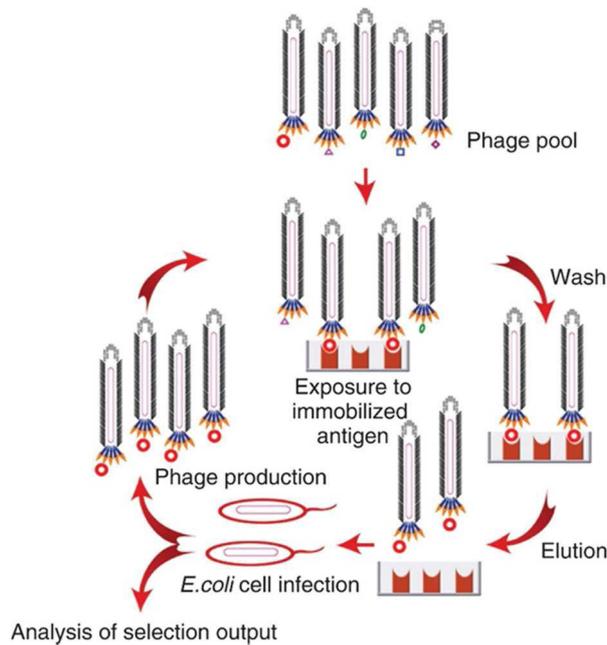


Figure 6 : Principe du phage display. Une librairie d'anticorps présentés par des phages est mise au contact d'un antigène immobilisé sur une surface. Les phages non liés sont éliminés par lavage et les phages liés sont élués. Ils sont utilisés pour infecter *E. coli* et produire des phages pour le cycle suivant. Au dernier cycle, les clones sélectionnés sont analysés (Chan et al., 2014).

3. Formats alternatifs

Les librairies d'anticorps sont généralement constituées de fragments d'anticorps sans fragment Fc : Fab, scFv et sdAb. Ils sont plus faciles à manipuler d'un point de vue génétique donc de plus en plus utilisés dans les phases de recherche de nouveaux candidats thérapeutiques, voire en clinique.

Les sdAb ou nanobodies sont des anticorps simple domaine (*single-domain antibody*). Ils contiennent un seul domaine variable monomérique de 12 à 15 kDa (Figure 7). L'absence de VL leur fait perdre une partie de leur affinité et de leur solubilité lorsqu'ils sont obtenus de façon synthétique. Cependant, ils constituent une partie des anticorps naturellement sécrétés lors de réponses immunes chez les camélidés, où ils sont appelés VHH. L'absence de chaîne légère y est compensée par une diversité plus importante au niveau des régions hypervariables de la chaîne lourde. Ils sont donc capables de reconnaître un grand panel d'antigènes. Les VHH issus de librairies synthétiques sont décrits comme solubles et robustes (Muyldermans, 2001).

La plus petite entité humaine contenant l'ensemble du paratope est le fragment Fv. Pour stabiliser l'association non covalente des domaines VH et VL, quelques acides aminés peuvent être introduits entre eux, généralement entre 15 et 20. On parle alors de fragment variable simple chaîne scFv (*single-chain Fv*). Il existe des scFv de type VH-linker-VL ou VL-

linker-VH (Figure 7). Ces scFv ont une masse molaire d'environ 25 kDa, ils conservent théoriquement l'affinité de l'anticorps entier dont ils sont issus mais perdent l'avidité conférée par la bivalence des immunoglobulines. Certains scFv ont été décrits comme instables et avec une tendance à agréger. Pour remédier à ce problème, des ponts disulfures ont pu être introduits dans les régions frameworks pour stabiliser l'interaction entre les deux domaines, tout en gardant leur affinité et leur spécificité (Reiter et al., 1994), ou des bibliothèques de scFv ont été construites par mutations de CDR sur un framework connu pour sa stabilité et sa solubilité (Philibert et al., 2007).

Les Fab contiennent la totalité de la chaîne légère et la partie de la chaîne lourde située en amont du site de clivage à la papaïne. Les 2 chaînes sont reliées par un pont disulfure comme dans les Ig entières (Figure 7). Ce sont des monomères d'environ 50 kDa. Ils sont généralement plus stables que les scFv grâce aux domaines CL et CH1. En effet, les scFv issus de bibliothèques synthétiques sont parfois incapables de se replier correctement ou perdent leur affinité une fois reformatés au format Fab ou en Ig entière (Chan et al., 2011). Le Fab' contient les ponts disulfures reliant les chaînes lourdes. Il peut donc se dimériser en F(ab')₂ (Figure 7).

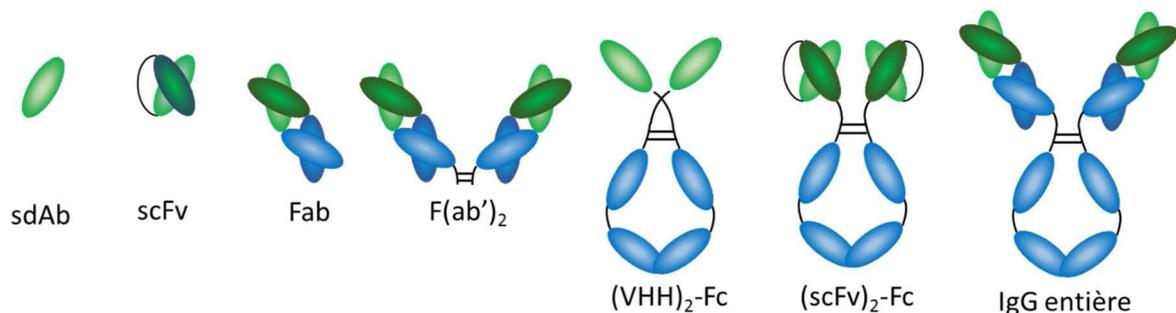


Figure 7 : Représentation schématique de différents formats d'anticorps (IgG). Pour plus de clarté, la glycosylation n'est pas représentée.

Ces 3 formats (VHH, scFv et Fab) lient leur antigène efficacement mais leur monovalence, leur taille et l'absence de fragment Fc influent sur différents paramètres. Ils perdent les fonctions effectrices du fragment Fc (ADCC et CDC). Leur demi-vie est plus courte que celle des IgG à cause de l'absence de recyclage par le FcRn. Ces fragments sont stables dans le plasma et peu sujets à la protéolyse. Leur principale voie d'élimination est donc le métabolisme rénal (Filpula, 2007). La filtration glomérulaire laisse passer les protéines inférieures à 70 kDa, c'est le cas des Fab, des scFv et des sdAb dont la clairance rénale s'avère rapide. Un scFv dimérique anti-HER2 (créé par l'introduction d'un pont disulfure entre 2 scFv) possède une clairance plus lente que son équivalent monomérique. Les 2 formes sont présentes de façon spécifique au niveau de la tumeur obtenue par xénogreffe et de façon équivalente après leur

administration par voie intraveineuse. Par contre, l'augmentation d'avidité du scFv dimérique explique une meilleure rétention tumorale (Adams et al., 1993).

Plus récemment, 9 scFv anti-EGFR se liant au même épitope mais d'affinités différentes d'un facteur 250 ont été reformatés en Fab et IgG entière. Le passage au format Fab modifie peu les affinités des scFv, elles sont parfois plus fortes et parfois moins fortes. Ces affinités sont corrélées avec la capacité à induire la signalisation en aval de l'EGFR et une inhibition de prolifération. L'IgG entière présente quant à elle une meilleure affinité que le Fab correspondant pour tous les clones, d'un facteur 100 à 4000. Sa divalence lui confère des propriétés anti-prolifératives plus importantes que les fragments monovalents d'affinité comparable (Zhou et al., 2012).

Etant donné l'importance du fragment Fc en terme de fonctions effectrices et de pharmacocinétique, les fragments d'anticorps sélectionnés par phage display sont la plupart du temps clonés pour être reformatés en (sdAb)₂-Fc, (scFv)₂-Fc ou IgG entière (Figure 7). Ils sont alors produits généralement en cellules eucaryotes puis testés *in vitro* et *in vivo*. L'utilisation de ce genre de technique est moins long à mettre en œuvre que la génération d'hybridomes.

4. Production d'anticorps monoclonaux recombinants

a. Choix de la technique de production

Le choix de la technique de production d'anticorps monoclonaux recombinants doit prendre en compte différents paramètres :

1) le rendement, en termes de quantité produite et de temps de production.

2) la qualité de l'anticorps obtenu, en terme d'homogénéité et de nature des modifications post-traductionnelles qui seront très différentes suivant l'organisme utilisé et qui doivent être les plus proches possibles de celles retrouvées naturellement dans les anticorps humains. Le motif de glycosylation joue notamment un rôle important car il peut être synonyme d'immunogénicité.

3) le coût de la production en elle-même et des opérations de purification en aval.

Ces paramètres auront des importances variables suivant que l'on se place dans un contexte de recherche de nouveaux candidats thérapeutiques ou dans un contexte de production à grande échelle. En effet, la qualité aura une importance cruciale lorsqu'il s'agira d'être conforme aux Bonnes Pratiques de Fabrication (ou GMP *good manufacturing practices*) en vue d'une approbation par la FDA ou l'EMA.

b. Production en cellules eucaryotes

Les système eucaryotes les plus utilisés sont les cellules mammifères ou les levures. Des fungi filamenteux, des protozoaires et des cellules d'insectes ont également été utilisés pour produire des IgG ou des fragments d'IgG mais ne seront pas détaillés ici.

i. Cellules mammifères

La manipulation génétique de cellules mammifères a rendu possible le développement de lignées recombinantes. La plupart des anticorps monoclonaux sur le marché sont produits en cellules mammifères en suspension dans un milieu sans sérum (chimiquement défini), grâce à leurs capacités de repliement, de sécrétion et d'introduction de modifications post-traductionnelles similaires à celles qui sont naturellement présentes sur les immunoglobulines humaines. Ceci permet de réduire au mieux le risque d'immunogénicité. Ces cellules sont transfectées par des vecteurs contenant l'ADN codant pour l'anticorps grâce à des agents chimiques ou par électroporation. Les anticorps seront sécrétés dans le milieu de culture en transitant par le réticulum endoplasmique des cellules. Comme les IgG entières contiennent une chaîne lourde et une chaîne légère, il est possible de co-transfecter deux vecteurs contenant chacun une des chaînes ou de transfecter un seul vecteur bicistronique. Les IRES (*internal ribosome entry site*) permettent la traduction de deux cistrons à partir d'un seul transcrit. Il existe des IRES mutés permettant de moduler les efficacités de traduction des deux chaînes. En effet, le ratio entre la chaîne lourde et la chaîne légère a une grande influence sur le rendement de sécrétion d'anticorps (Li et al., 2007).

Lorsqu'un ADN est transfecté dans des cellules, une très faible partie de celui-ci va s'intégrer au génome cellulaire. Pour n'isoler que les cellules l'ayant intégré, on utilise des vecteurs contenant un gène de résistance à un antibiotique ou on co-transfecte ce type de vecteur avec le vecteur contenant l'ADN d'intérêt. Par exemple, le gène de résistance à la néomycine permet de résister à une pression de sélection à la généticine. Une autre possibilité est d'utiliser des lignées cellulaires manipulées génétiquement pour être déficientes en certaines enzymes comme par exemple la dihydrofolate réductase (DHFR) ou la glutamine synthétase (GS). Dans ce cas, il manque un métabolite aux cellules, respectivement l'hypoxantine et thymidine ou la glutamine. L'ADN d'intérêt est donc co-transfecté avec le gène codant pour l'une de ces deux enzymes et seules les cellules transfectées vont croître. De plus, ce gène sera sous le contrôle d'un promoteur fort qui permettra sa propre amplification et l'amplification de l'ADN d'intérêt placé sur le même vecteur. La production d'anticorps sera donc favorisée (Gaughan, 2015). Il est également possible de favoriser l'intégration chromosomique en

utilisant des enzymes de recombinaison. La transfection stable permet donc aux cellules transfectées et à leurs cellules filles de sécréter l'anticorps dans leur milieu de culture de façon continue pendant plusieurs semaines en garantissant son homogénéité. Elle est utilisée pour les productions à grande échelle.

A l'inverse, lors d'une transfection transitoire l'ADN est perdu lors de la mitose des cellules (voire plus tôt) donc la culture ne dure que quelques jours. Ce type de transfection est utilisé dans les phases de recherche où l'on n'a pas besoin d'être aussi reproductible que lors de la production de quantités commerciales. Cependant, il est possible d'optimiser les conditions pour obtenir plusieurs grammes d'anticorps (Baldi et al., 2007).

Les facteurs influençant le rendement de production d'anticorps sont : le choix du vecteur d'expression, les conditions de transfection et la lignée cellulaire. Les lignées les plus utilisées pour l'expression d'anticorps sont les CHO, NS0, Sp2/0, HEK293 et PER.C6. Les seules utilisées pour la production d'anticorps sur le marché sont les CHO, NS0 et Sp2/0 (Dumont et al., 2015). Pour être exploitées en production à grande échelle, les lignées doivent :

- 1) supporter une sécrétion importante d'anticorps pendant un temps suffisamment long en bioréacteur, tout en maintenant une viabilité et une densité cellulaires hautes en suspension et en milieu sans sérum, ainsi qu'une stabilité génétique.
- 2) rendre possible un scale-up sans trop perdre en efficacité.
- 3) exprimer des protéines avec des modifications post-traductionnelles proches de celles rencontrées naturellement chez l'Homme.
- 4) être bien caractérisée pour garantir la sûreté des protéines obtenues (Rita Costa et al., 2010).

Les CHO (ovaire de hamster chinois) sont utilisées pour produire 70% des protéines thérapeutiques sur le marché (Kim et al., 2011). Elles sont également les plus utilisées pour produire les anticorps en quantités industrielles. Différentes lignées dérivées ont été créées pour améliorer la qualité et la quantité d'anticorps produits comme CHO-K1, DUXB11, DG44 (Frenzel et al., 2013). Il est donc possible d'obtenir jusqu'à 1g d'anticorps par litre de culture en réacteur à alimentation discontinue (*batch reactor*) et 10 g/L en réaction à alimentation continue (*fed-batch reactor*) (Kunert and Reinhart, 2016). Cependant sans bioréacteur, les rendements sont plus faibles car les densités cellulaires atteintes sont moins hautes. La NS0 et la Sp2/0 sont des lignées de myélomes murines qui produisent deux glycanes immunogènes : l' α -1,3-galactose et l'acide N-glycolylneuraminique (Neu5Gc) (Liu et al., 2014a). Elles sont donc moins fréquemment utilisées.

Les HEK293 (épithélium rénal embryonnaire) sont beaucoup utilisées pour les transfections transitoires. Deux lignées : HEK293T et HEK293E en sont dérivées. Elles ont respectivement été transformées par l'antigène large T du virus simien 40 (SV40) ou l'antigène nucléaire 1 du virus Epstein Barr (EBNA1). Ceci va permettre une propagation épisomale semi-stable des vecteurs contenant les origines de répllication de ces deux virus. Les HEK293-6E sont un autre variant contenant l'EBNA1 tronqué pouvant être cultivées en suspension et en milieu sans sérum. Elles ont permis la production d'anticorps au format (scFv)₂-Fc avec des rendements jusqu'à 0.6 g/L par culture classique en fioles sous agitation (Frenzel et al., 2013).

ii. Levures

Les levures ont l'avantage d'être robustes et nécessitent un milieu de culture très simple comme les bactéries. En revanche, leur capacité de sécrétion est supérieure à celles-ci, notamment pour les Ig entières, et elles ne produisent pas d'endotoxines. Il est plus facile d'obtenir des clones d'expression stables car la recombinaison non homologe est plus fréquente chez les levures que chez les eucaryotes supérieures comme les cellules mammifères. De plus, la production en cellules mammifères est plus longue à mettre en place car il faut trouver le bon clone avec une bonne productivité et le scale-up est plus compliqué car il y a formation de métabolites inhibiteurs comme le lactate et l'ammonium à partir des sources de carbone principales qui sont le glucose et la glutamine. Pour les fragments d'anticorps tels que les scFv, VHH, Fab et F(ab')₂, la différence de glycosylation entre les levures et les cellules mammifères n'a pas d'importance puisqu'ils sont rarement glycosylés. En revanche, pour la production d'anticorps contenant le fragment Fc, cette différence s'avère cruciale car la présence d'un grand nombre de mannoses est immunogènes pour l'Homme. *Pichia pastoris* et *Saccharomyces cerevisiae* sont les souches les plus utilisées (Frenzel et al., 2013; Spadiut et al., 2014).

P. pastoris est la souche ayant été la plus utilisée pour la production d'anticorps car elle est plus modulable. Elle a la particularité d'utiliser la métabolisation du méthanol comme seule source de carbone. La première étape de ce processus est son oxydation par l'alcool oxygénase (AOX). Le promoteur AOX1 est donc contrôlable par le méthanol et est utilisé pour diriger l'expression des fragments d'anticorps d'intérêt (Frenzel et al., 2013). La souche a été manipulée pour augmenter la sécrétion de protéines hétérologues (en particulier des protéines supérieures à 30 kDa) de différentes façons : la surexpression de protéines aidant au repliement (comme les chaperones et la disulfure isomérase), l'inactivation de protéases endogènes, l'amélioration des voies de trafic intracellulaire ou encore l'humanisation des motifs de glycosylation (Spadiut et al., 2014). Ainsi, la production de fragments scFv a donné des rendements allant de 70 mg/L (Gurkan et al., 2004) à 250 mg/L (Eldin et al., 1997) en culture classique et jusqu'à 8 g/L en bioréacteur (Damasceno et al., 2006). Il est possible

d'obtenir 10 à 30 mg/L de (scFv)₂-Fc (Liu et al., 2003). Les IgG entières ou les Fab sont obtenus par co-transfection de deux plasmides contenant la chaîne lourde ou la chaîne légère avec une séquence signal N-terminale permettant leur sécrétion dans le milieu de culture. Les Fab ont pu être produits à hauteur de 1 à 50 mg/L en culture classique et 0.5 g/L en bioréacteur (Gasser et al., 2006). Peu d'IgG entières ont été produites en levures, mais il a été possible d'atteindre 1 g/L en bioréacteur chez *P. pastoris* (Potgieter et al., 2010).

P. pastoris produit moins d'hyperglycosylations à des positions non naturelles que *S. cerevisiae* (en particulier moins d'hypermannosylations) et sa glycosylation est plus proche de celle de l'Homme puisque 85% des oligosaccharides présents sont de type Man₈₋₁₄GlcNAc₂ (Grinna and Tschopp, 1989). L'élimination des voies de glycosylation endogènes de *P. pastoris* a permis de créer une voie synthétique de glycosylation *in vivo* et d'obtenir un glycane bi-antennaire humain : GlcNAc₂-Man₃-GlcNAc₂ (Hamilton et al., 2003). Le glycane complet sialylé à ses extrémités a été obtenu par le même groupe quelques années plus tard (Hamilton et al., 2006). L'utilisation d'une souche glyco-modifiée a ensuite permis de produire une IgG de même séquence que le trastuzumab chez *P. pastoris* et d'obtenir un motif de glycosylation très similaire à celui du trastuzumab commercial. De plus, cet anti-HER2 a une activité antagoniste similaire, et déclenche davantage d'ADCC que le trastuzumab car il est afucosylé (voir la partie « optimisation des anticorps » A.5.a.ii). L'inhibition de croissance tumorale chez la souris et la pharmacocinétique chez la souris et le singe sont également comparables (Zhang et al., 2011).

Pour finir, deux nanobodies produits chez *P. pastoris* sont actuellement en essais cliniques. L'ALX-0171 est un anti-RSV (virus respiratoire syncytial), il est donc utilisé en cas d'infection par ce virus (Detalle et al., 2015). L'ALX-0061 est un anti-récepteur à l'interleukine 6 utilisé pour traiter l'arthrite rhumatoïde (Van Roy et al., 2015).

c. Production en cellules procaryotes

Les bactéries sont divisées en deux parties : les gram-positives et les gram-négatives. Les gram-positives ne possèdent pas de membrane externe, les protéines hétérologues exprimées sont donc sécrétées dans le milieu de culture (Figure 8). Elles ont déjà été utilisées pour produire des fragments d'anticorps. Cependant, ce type de bactéries reste très peu utilisé et est encore au stade de développement (Frenzel et al., 2013).

A l'inverse, les bactéries gram-négatives, et en particulier *Escherichia coli*, ont beaucoup été utilisées pour produire des fragments d'anticorps. Les avantages de cette souche sont : 1) sa croissance rapide et inégalée car il faut en moyenne seulement 20 minutes pour doubler la population. 2) des densités cellulaires importantes pouvant être atteintes facilement : environ 10¹⁰ cellules/mL au maximum avec un équipement simple de laboratoire. Des quantités de

protéines exogènes importantes peuvent donc être produites en peu de temps (Sezonov et al., 2007). 3) son milieu de culture très bon marché. 4) sa capacité à être transformée facilement et rapidement par un plasmide contenant un ADN exogène ainsi que sa robustesse par rapport à des cellules eucaryotes.

Lorsque l'on produit une protéine chez *E. coli*, elle peut être sécrétée vers le périplasma, voire dans le milieu de culture dans certaines conditions de culture (Kipriyanov et al., 1997), ou rester dans le cytoplasme.

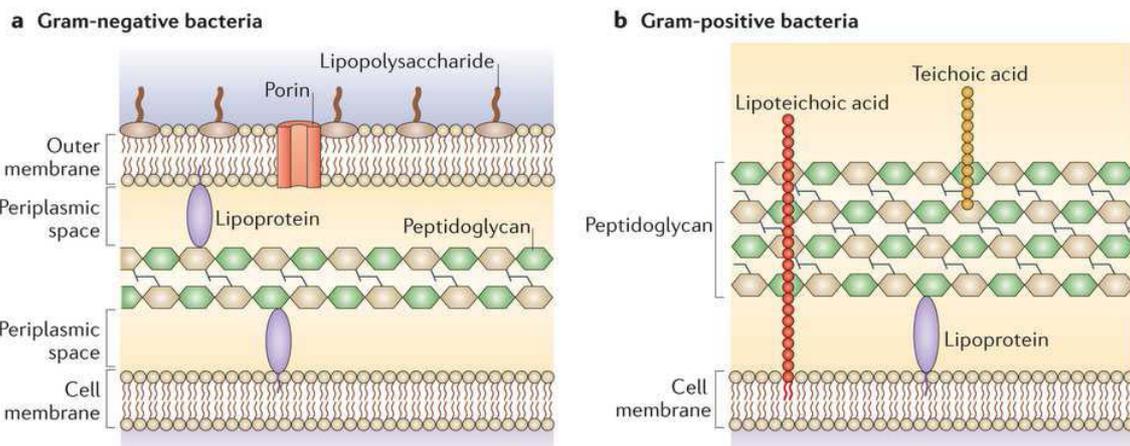


Figure 8 : Composition membranaire des bactéries gram-négatives (a) et gram-positives (b) (Brown et al., 2015)

i. Production en périplasma

Le périplasma correspond à l'espace inter-membranaire des bactéries gram-négatives. Pour provoquer le transport vers cet espace, il faut introduire un peptide signal à l'extrémité N-terminale de la protéine d'intérêt. Cette séquence signal va cibler la voie Sec ou la voie SRP qui sont toutes deux périplasmiques (Frenzel et al., 2013). Dans ce cas, les ponts disulfures de la protéines seront formés grâce à un processus d'échange de sulfures qui est principalement catalysé par des protéines de la famille Dsb présentes dans l'espaces périplasmique (Messens and Collet, 2006). Au début des années 1990, il était déjà possible d'obtenir des Fab' produits en périplasma de *E. coli* avec de très bons rendements. Par exemple, le Fab' 4D5, qui sera à l'origine du trastuzumab, a pu être obtenu à hauteur de 1 à 2 g/L en fermenteur grâce à des densité cellulaires 100 fois supérieures à la celles obtenues classiquement en fioles. A partir de celui-ci, le F(ab')₂ a été reformé chimiquement ou spontanément *in vitro*. Il montre les mêmes propriétés de liaison à HER2 que le F(ab')₂ produit en cellules mammifères ainsi que la même activité anti-proliférative (Carter et al., 1992). Cependant, ce très bon rendement fait figure d'exception en production périplasmique. Avec des cultures en fioles, les meilleurs rendements obtenus sont de l'ordre de la dizaine de milligrammes par litre de culture : 12mg/L pour un Fab (Nadkarni et al., 2007) et 16.2 mg/L

pour un scFv (Kipriyanov et al., 1997). La co-expression d'un scFv et d'une chaperone périplasmique (Skp ou FkpA) donne davantage de sécrétion dans le milieu de culture : jusqu'à 40 mg/L (Sonoda et al., 2011). Une banque d'un format alternatif, le scFab, qui consiste à relier les chaînes du Fab par un linker comme pour un scFv, a été construite. Le linker a été allongé pour diminuer au maximum l'agrégation. En périplasme on peut ainsi produire 1 à 3 mg/L (Koerber et al., 2015).

Deux Fab approuvés par la FDA sont actuellement produit dans le périplasme d'*E. coli* : le ranibizumab (Lucentis®) et le certolizumab pegol (Cimzia®) et utilisés respectivement pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge et de maladies inflammatoires. Le promiplostim (Nplate®) est également produit chez *E.coli* et approuvé par la FDA en cas de thrombopénie. Le fragment Fc d'une IgG1 humaine est fusionné à ces deux extrémités N-terminales à un peptide liant le récepteur à la thrombopoïétine. Son activité biologique est assurée par le peptide qui a un rôle agoniste. Le fragment Fc a pour but d'augmenter la demi-vie plasmatique donc l'absence de glycosylation n'est pas un problème pour cette application (Molineux and Newland, 2010).

ii. Production en cytoplasme

La seconde possibilité pour produire des protéines chez *E. coli* est leur accumulation dans le cytoplasme en l'absence de peptide signal. Ce type de production donne globalement de meilleurs rendements car on s'affranchit de l'étape de translocation membranaire vers le périplasme. Cependant, les protéines y sont souvent présentes sous forme de corps d'inclusion, qui correspondent à des agrégats de protéines mal repliées et sont donc biologiquement inactifs. En effet, les protéines se retrouvent dans un environnement pouvant être très différent de l'environnement où elle sont normalement synthétisées, notamment au niveau du pH, de l'osmolarité, des mécanismes de repliement des protéines et du potentiel rédox. Cette tendance à l'agrégation semble être due en partie au fait que le cytoplasme d'*E. coli* est un environnement réducteur à cause de la présence de glutathion réductase et de thiorédoxine réductase (Prinz et al., 1997). Les ponts disulfures des protéines produites s'y forment donc très peu. Or, l'absence des ponts disulfures intrachaines affecte la stabilité des anticorps. Différentes stratégies ont donc été développées pour augmenter la production de fragments d'anticorps solubles (donc plus actifs) dans le cytoplasme : la dénaturation suivie du refolding des corps d'inclusion, la sélection de fragments très stables malgré l'absence de ponts disulfures, et la création de souches bactériennes permettant la formation des ponts disulfures dans le cytoplasme.

Les protéines insolubles peuvent être dénaturées après purification puis renaturées en laissant se replier *in vitro*. Cette technique n'est pas la plus efficace car la dénaturation peut s'avérer en partie irréversible (Martineau and Betton, 1999).

Certains anticorps peuvent être stables sans ponts disulfures. Lorsque les cystéines du scFv 4D5 (correspondant aux parties variables du trastuzumab) sont substituées par une valine du côté N-terminal et par une alanine du côté C-terminal, celui-ci conserve sa capacité à se replier correctement lors de sa production en périplasme d'*E. coli* ainsi que les mêmes propriétés de liaison. En théorie, n'importe quel scFv pourrait ne pas avoir besoin de ses cystéines, donc de ses ponts disulfures, pour être stable (Wörn and Plückthun, 1998). Pour cela, il est nécessaire que la stabilité thermodynamique initiale soit suffisamment importante, ce qui n'est pas toujours le cas pour les domaines des fragments d'anticorps. Des fragments stables ont été obtenus par un système de mutagenèse permettant la sélection génétique de scFv ayant une bonne expression cytoplasmique et une bonne fonctionnalité. Le meilleur scFv (13R4) a été produit avec un très bon rendement de 500 mg/L en fiole. Malgré l'absence de ponts disulfures due à son expression cytoplasmique, il est bien replié, contrairement au scFv 13 à partir duquel il a été optimisé, qui lui est totalement insoluble (Martineau et al., 1998). Ce clone 13R4 a permis de construire une banque d'environ un milliard de scFv humains ayant des hauts taux d'expression en cytoplasme. La diversité a été introduite au niveau du CDR3 des domaines VH et VL qui va varier en termes de composition et de longueur. Les scFv obtenus sont purifiés à hauteur d'environ 50 mg/L de culture et sont fonctionnels (Philibert et al., 2007).

iii. Production en cytoplasme oxydant

Pour obtenir un cytoplasme oxydant et augmenter la solubilité des fragments produits, il est possible de jouer sur les voies de signalisation réductrices du cytoplasme et sur les chaperones ou les foldases qui favorisent le repliement protéique. La délétion de la thiorédoxine réductase (*trxB*-) et de la glutathion réductase (*gor*-) combinées à la mutation du gène *ahpC* (codant pour une peroxirédoxine) dans les souches utilisées pour produire des protéines leur confèrent un potentiel rédox similaire à celui retrouvé dans le réticulum endoplasmique des cellules eucaryotes (Ritz et al., 2001). Plusieurs souches contenant ces mutations sont commercialisées. Par exemple, deux Fab fonctionnels ont ainsi pu être produits à hauteur de 10 à 30 mg/L en cytoplasme oxydant (Venturi et al., 2002). Ces délétions ont également été combinées à la co-expression de chaperones qui facilitent le repliement des protéines ou de l'isomérase DsbC qui corrige les erreurs d'oxydation. La co-expression d'un Fab avec des chaperones cytoplasmiques (GroEL/ES, trigger factor ou DnaK/J) ou avec des chaperones périplasmiques sans séquence signal (*Skp* ou DsbC) a été réalisée dans une souche *trxB*- *gor*-. *Skp* donne le meilleur résultat avec 5 à 6 fois plus de Fab correctement replié en cytoplasme. Cependant le rendement de 0.8 mg/L reste assez faible. Un cytoplasme

oxydant peut aussi être obtenu en ciblant la sulfhydryle oxydase Erv1p, qui catalyse la formation de ponts disulfures. La co-expression cytoplasmique d'un VHH et d'Erv1p conduit à une meilleure stabilité et à des rendements d'environ 10 mg/L, soit 20 à 40 fois supérieurs à la production classique (Veggiani and de Marco, 2011).

iv. Alternatives à l'absence de glycosylation

E. coli a été peu utilisée pour produire des anticorps entiers car il est difficile d'y produire des protéines supérieures à 60 kDa à cause de l'énergie nécessaire à leur transport transmembranaire. Il est également impossible d'obtenir des glycosylations avec une souche naturelle. Comme la glycosylation est critique pour la liaison du fragment Fc aux FcγR et au C1q, des mutations sur le Fc ont été décrites comme permettant leur fixation en absence de glycosylation et des souches bactériennes ayant la capacité de glycosyler les protéines ont été développées.

Des IgG entières aglycosylées peuvent être exprimées et assemblées dans le périplasme d'*E. coli* en utilisant un système bicistronique permettant des niveaux de traduction différents entre la chaîne lourde et la chaîne légère. En fermenteur, les rendements atteignent les 150 mg/L. A cause de l'absence de glycosylation, l'IgG1 obtenue ne se lie plus aux FcR ni au C1q mais elle conserve sa fixation à son antigène et au FcRn. Sa demi-vie est la même que celle de l'équivalent produit en cellules eucaryotes d'après une étude pharmacocinétique menée sur des singes. Ce type de production ne convient donc que pour des anticorps qui n'ont pas besoin de fonctions effectrices pour avoir une activité biologique, comme par exemple les ADC ou les antagonistes. Cependant, pour obtenir la sécrétion de chaînes complètes, il a fallu diminuer les niveaux de traduction en utilisant différentes régions d'initiation de traduction (Simmons et al., 2002). Un autre moyen d'obtenir des IgG chez *E. coli* a été d'utiliser des plasmides *low-copy*, de diminuer la quantité d'inducteur utilisée pour déclencher l'expression périplasmique et de déclencher cette induction lorsque les bactéries ont atteint une phase de croissance plus avancée. Ceci permet de moduler les taux de traduction. Les IgG ainsi obtenues ont des avidités comparables aux IgG équivalentes produites en cellules mammifères (Chan et al., 2010). En revanche, il est possible de muter des anticorps aglycosylés pour qu'ils puissent tout de même posséder des fonctions effectrices. Les IgG possédant les mutations S239D/N297D/I332E et N297D/A330Y/I332E sont capables de se lier au FcγRIIIA avec une affinité correspondant respectivement à 28% et 43% de celle obtenue avec l'IgG glycosylée sauvage (Lazar et al., 2010). Un autre groupe a développé le mutant S298G/T299A qui est aglycosylé car la glycosylation a lieu sur la séquence NX(S/T). Il possède des affinités au FcγRIIA et FcγRIIB comparables à celles de l'IgG sauvage glycosylé. L'engagement du FcγRIIA a pour conséquence un effet de réduction plaquettaire lorsque les mutations sont introduites sur un anticorps ciblant les plaquettes (Sazinsky et al.,

2008). Tous ces mutants ont été produits en cellules eucaryotes mais on peut supposer que des résultats similaires auraient pu être obtenus en bactéries. Le mutant E382V/M428I a quant à lui été appliqué chez *E. coli*. Il a été isolé à partir d'une banque de Fc aglycosylés produits chez *E. coli* pour sa liaison au FcγRI comparable à celle de son équivalent glycosylé et son absence de liaison aux autres FcγR. Ces substitutions ont été introduites sur le trastuzumab qui a alors été produit dans le périplasme d'*E. coli*. Il possède la même demi-vie sérique dans un modèle de souris et est capable de déclencher l'ADCC via les cellules dendritiques alors que le trastuzumab glycosylé n'est pas capable d'activer cette population cellulaire car il ne se lie pas au FcγRI (Jung et al., 2010). Cette mutation a été utilisée pour produire une IgG entière dans le cytoplasme d'*E. coli* capable de se lier au FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb et FcγRIIIa. Cette IgG comprend des domaines variables et CH1 humains et des domaines CH2, CH3 et CL murins. Elle a été exprimée dans un vecteur bicistronique dans une souche *trxB-* *gor-* permettant d'avoir un cytoplasme oxydant. Lorsque la DsbC est co-exprimée dans le cytoplasme, la liaison de l'IgG à sa cible est meilleure. Des rendements jusqu'à 25 mg/L ont été obtenus alors que dans une souche sauvage rien n'est produit. Ceci confirme le fait que les immunoglobulines se replient mal en cytoplasme (Robinson et al., 2015).

Campylobacter jejuni, qui fait partie des protéobactéries ϵ , possède un système de N-glycosylation pouvant être transféré chez *E. coli*. Le motif de glycosylation consiste en un heptasaccharide : GalNAc₂-GalNAc(Glc)-GalNAc₂-di-N-acétyl-bacillosamine (GalNAc = N-acétylgalactosamine. Glc = glucose). Cette N-glycosylation est spécifique de la séquence (D/E)XNZ(S/T) avec X et Z pouvant être n'importe quel acide aminé exceptée la proline. Ce système a permis d'obtenir un scFv mono- ou di-glycosylé grâce à l'introduction d'une ou deux séquence(s) DQNAT au sein du linker. La di-glycosylation du scFv a permis d'améliorer sa solubilité et d'augmenter sa résistance à la protéolyse (Lizak et al., 2011). Néanmoins, ce motif de glycosylation est très différent de celui rencontré chez l'Homme (Figure 9A). Pour pallier à cette différence, l'introduction du système de glycosylation modifié de *C. jejuni* a été combiné à seconde étape de glycosylation *in vitro*. La modification de ce système a pour but de produire un glycane (GalNAc)₅-GlcNAc-Und PP. Ce glycane va être clivé pour ne conserver que le premier GlcNAc puis une transglycosylation enzymatique va permettre d'obtenir un GlcNAc supplémentaire lié à la bi-antenne tri-mannose caractéristique des eucaryotes (Figure 9B). Cette technique a entre autres été appliquée à un domaine CH2 d'une IgG humaine. Pour cela, la séquence originale QYNST où se trouve la glycosylation du Fc a été mutée par DFNST pour que l'Asn puisse être reconnue par le système glycosylatoire de *C. jejuni*. Cependant, seulement moins de 5% de domaine CH2 a été glycosylé, contrairement à d'autres protéines, donc ce système n'est pas applicable en l'état pour la glycosylation d'un fragment Fc (Schwarz et al., 2010).

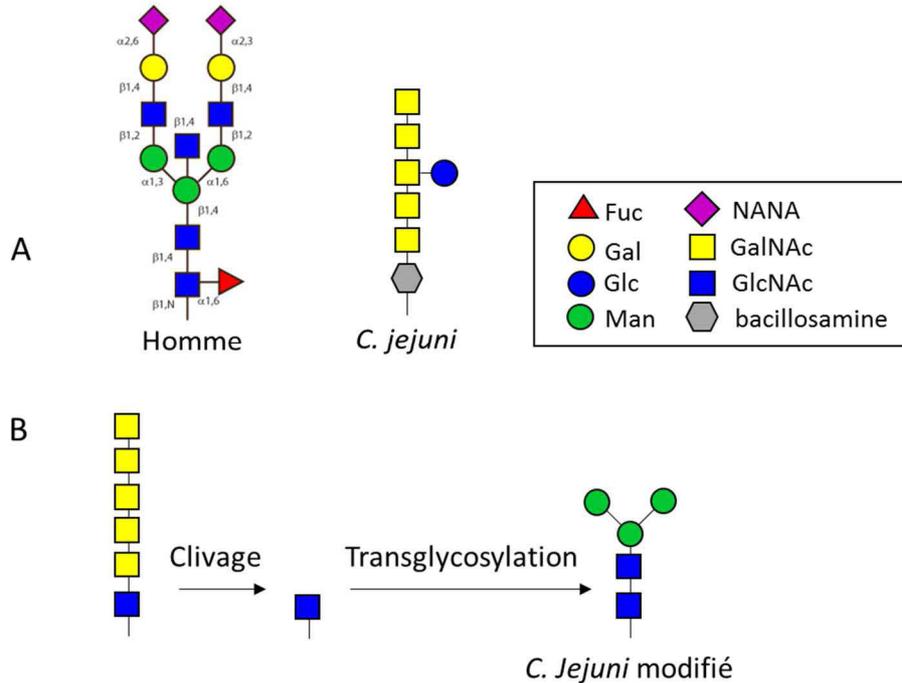


Figure 9 : Introduction de systèmes de glycosylation chez *E. coli*. A) Comparaison du motif de N-glycosylation chez l'Homme et chez *C. jejuni*. B) Motif de N-glycosylation de *C. jejuni* modifié suivie d'une étape de transglycosylation *in vitro*. Fuc : fucose, NANA : acide N-acétylneuraminique, Gal : galactose, GalNAc : N-acétylgalactosamine, Glc : glucose, GlcNAc : N-acétylglucosamine, Man : mannose.

5. Applications thérapeutiques et cibles

Les anticorps monoclonaux et leurs dérivés sont devenus la classe majoritaire au sein du marché des bio-médicaments. En 2013, leurs ventes ont rapporté environ 75 milliards de dollars, soit la moitié des ventes des produits biopharmaceutiques. En avril 2016, 59 anticorps monoclonaux sont approuvés aux Etats-Unis et en Europe pour le traitement de pathologies variées, sans compter la quinzaine qui ont été retirés du marché pour des raisons diverses. En novembre 2015 environ 300 candidats étaient au stade de développement clinique, donc le marché est encore en pleine expansion (Ecker et al., 2015). Le premier domaine d'utilisation d'anticorps monoclonaux thérapeutiques est l'oncologie. Ils sont aussi indiqués dans le traitement de maladies auto-immunes, inflammatoires, du système nerveux central, cardiovasculaires, respiratoires, infectieuses et musculaires/squelettiques.

Les anticorps monoclonaux font partie de l'immunothérapie. Leur haute spécificité antigénique limite leur toxicité par rapport à d'autres traitements. Leurs cibles peuvent être des récepteurs membranaires ou solubles, surexprimés, mutés ou tissu-spécifiques. Ils peuvent également être dirigés contre des ligands. Lorsqu'ils sont dirigés contre des checkpoints immunologiques, on parle d'immunothérapie active car l'objectif est de stimuler le système immunitaire auquel les tumeurs avaient échappé. Lorsqu'ils sont dirigés contre la tumeur ou son stroma, on parle

d'immunothérapie passive. Les anticorps pourront alors éventuellement stimuler le système immunitaire par leur fragment Fc.

L'immunothérapie anti-cancéreuse a été initiée par William Coley dans les années 1890. Il a découvert que l'injection de bactéries mortes provoquait une réaction immunitaire pouvant conduire à une régression tumorale. Le premier anticorps anti-cancéreux approuvé par la FDA a été le rituximab (Rituxan® et MabThera®). Il a été mis sur le marché en 1997 dans le traitement des lymphomes non-Hodgkiniens. A l'heure actuelle les anticorps monoclonaux sont utilisés pour traiter aussi bien des tumeurs solides que liquides.

L'immunothérapie cancéreuse est basée sur l'existence d'antigènes associés aux tumeurs ou TAA (*tumor-associated antigens*) qui sont des antigènes membranaires ou solubles produits par les cellules tumorales et qui induisent une réponse immune adaptative chez le patient. Il existe 3 types de TAA : 1) les antigènes spécifiques des tumeurs, non exprimés par les cellules saines, 2) les antigènes de différenciation qui sont exprimés par la tumeur et par les cellules différenciées saines dont cette tumeur est issue, 3) les antigènes du soi, qui sont surexprimés dans les tumeurs par rapport aux tissus sains (Wurz et al., 2016). Idéalement, un antigène doit être abondant, accessible, exprimé le plus exclusivement possible au niveau des cellules tumorales, et ceci de façon homogène. La sécrétion de l'antigène peut réduire l'efficacité thérapeutique de l'anticorps qui se liera à cet antigène dans la circulation et atteindra moins bien la tumeur. Il existe différents type d'antigènes : les antigènes de différenciation hématopoïétiques, les glycoprotéines, glycolipides et carbohydrates exprimés par les tumeurs solides, les antigènes impliqués dans l'angiogénèse, les facteurs de croissance, les protéines du stroma et de la matrice extracellulaire (Scott et al., 2012).

Les anticorps monoclonaux peuvent être utilisés seuls ou en association avec d'autres traitements comme la chimiothérapie ou la radiothérapie. Il est également envisageable de combiner plusieurs anticorps (Henricks et al., 2015) ou un anticorps avec une thérapie ciblée comme par exemple les inhibiteurs de tyrosine kinase (Noto et al., 2013). La plupart des anticorps approuvés par la FDA présentent des toxicités plus faibles que les traitements classiques, car ils ont moins d'effet sur les cellules saines. Néanmoins, même en étant humain, un anticorps reste immunogène par son idiotype, voire son allotype, et peut entraîner différents effets secondaires notamment au niveau immunologique et cutané (Baldo, 2013). Comme pour les autres types de traitement du cancer, il peut y avoir apparition de résistances (Reslan et al., 2009) ou une absence d'effets thérapeutiques chez certains patients (Scott et al., 2012). Ces raisons montrent donc la nécessité de découvrir de nouveaux anticorps thérapeutiques.

6. Mécanismes d'action des anticorps anti-cancéreux

Les anticorps conduisent à la mort cellulaire des cellules tumorales par différents mécanismes. Ils peuvent agir directement sur la tumeur (en bloquant un récepteur ou un ligand, en induisant l'apoptose, ou grâce aux molécules auxquelles ils sont conjugués), moduler l'action du système immunitaire (via leur fragment Fc ou en ciblant des molécules immuno-régulatrices), ou avoir une action sur le microenvironnement tumoral.

Les anticorps peuvent perturber la signalisation en aval de l'antigène tumoral ciblé (Figure 10A). C'est notamment le cas de ceux ciblant les récepteurs de facteurs de croissance comme la famille HER (récepteurs au facteur de croissance épidermique). Le cetuximab (Erbix®) est un anti-EGFR (anti-HER1) utilisé dans le traitement du cancer colorectal métastatique et du cancer de la tête et du cou en association avec la chimio- ou la radiothérapie. L'EGFR est un récepteur à activité tyrosine kinase qui peut devenir constitutivement actif lorsqu'il contient certaines mutations, c'est donc un proto-oncogène. Lorsqu'il est activé, l'EGFR stimule plusieurs voies de signalisation, notamment les voies MAP kinases, PI3 kinases, et STAT, ce qui conduit à une prolifération et à une survie cellulaires accrues. Le cetuximab est un antagoniste qui bloque la liaison de l'EGF et la dimérisation du récepteur, ce qui conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose (Li et al., 2005; Patel et al., 2009). Le récepteur HER2, contrairement aux autres membres de la famille HER, n'a pas de ligand connu. Il adopte en permanence une conformation permettant son hétéro-dimérisation et une activité proliférative. Le trastuzumab (Herceptine®) est utilisé pour traiter les cancers du sein surexprimant HER2, qui sont associés à un mauvais pronostic, ainsi que les cancers gastriques métastatiques. Il inhibe la dimérisation du récepteur nécessaire à son activité tyrosine kinase et induit sa destruction par endocytose (Hudis, 2007).

A l'inverse, il existe des anticorps agonistes comme le mabpamumab qui est capable d'induire l'activation du récepteur TRAIL 1 (TRAIL-R1) conduisant à l'apoptose. Cet anticorps est actuellement en essais cliniques de phase II dans les cancers du poumon, du foie et dans les myélomes multiples.

Les immunoconjugués sont une variante aux anticorps « nus ». Ils sont conjugués avec des radionucléides, des drogues ou des toxines sur différents résidus et en différents nombres par molécule d'anticorps. L'objectif est de combiner le ciblage tumoral avec les effets cytotoxiques de la molécule associée (Figure 10A). L'anticorps est alors un outil de vectorisation. Les radioimmunoconjugués vont ainsi pouvoir irradier les tumeurs de façon plus spécifique qu'une radiothérapie classique. Deux anticorps de ce type sont approuvés par la FDA : le tositumab-¹³¹I (Bexxar®) et l'ibritumomab tiuxetan-⁹⁰Y (Zevalin®). Ce sont deux anti-CD20 utilisés contre les lymphomes non Hodgkiniens. Le tositumab-¹³¹I n'est plus commercialisé depuis 2014 car

il n'était plus assez prescrit. L'objectif des anticorps conjugués aux drogues (ADC) est de cibler la tumeur pour ne pas endommager les cellules saines avec la molécule cytotoxique qu'ils transportent et d'améliorer la fenêtre thérapeutique comparé aux chimiothérapies classiques. Ces drogues sont conjuguées à l'immunoglobuline par un linker qui doit être suffisamment stable pour ne pas libérer la drogue avant d'atteindre sa cible. L'anticorps est alors internalisé dans la cellule tumorale. Suivant le type de linker utilisé, il pourra être clivé par des enzymes. S'il n'est pas clivé, la drogue restera au sein de la cellule et l'anticorps sera dégradé en acide aminés. S'il est clivé, la drogue libérée pourra s'échapper de la cellule et affecter les cellules voisines. Deux ADC sont actuellement sur le marché : le brentuximab vedotin (Adcetris®) et l'ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla®). Le brentuximab vedotin est un anti-CD30 utilisé contre les lymphomes Hodgkiniens et les lymphomes anaplasiques à grandes cellules systémiques. Il a été le premier ADC approuvé par la FDA en 2011. La monométhyl auristatine E (MMAE) se fixe sur la tubuline et perturbe l'activité des microtubules ce qui conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose. Elle est conjuguée à l'anticorps avec un linker clivable par la protéase cathepsine B dans les lysosomes. L'ado-trastuzumab emtansine est un anti-HER2 couplé à l'inhibiteur d'assemblage de microtubules DM1 (maytansine) via un linker non-clivable. Il est utilisé contre les cancers du sein métastatiques HER2-positifs après traitement au trastuzumab nu ou après une chimiothérapie aux taxanes. Il est aussi possible de coupler des toxines bactériennes aux anticorps. Aucun conjugué de ce type n'est encore approuvé par la FDA mais plusieurs sont actuellement en développement clinique dans le cadre de plusieurs cancers, comme le moxetumomab pasudotox en phase III dans le cadre de la leucémie à tricholeucocytes qui cible les cellules B CD22-positives. De même que pour les ADC, l'anticorps doit être internalisé pour que la toxine conduise la cellule en apoptose (Alewine et al., 2015).

Les tumeurs sont connues pour échapper à l'action du système immunitaire en favorisant un microenvironnement tolérant et en activant un grand nombre de mécanismes immunosuppresseurs (Rabinovich et al., 2007). Il existe donc des anticorps capables de resensibiliser le système immunitaire aux cellules tumorales grâce au fragment Fc, soit en ciblant ces tumeurs pour y attirer les cellules effectrices, soit en ciblant directement les cellules immunes. Lorsqu'un anticorps est fixé à son antigène, il peut provoquer l'ADCC, l'ADCP, ou la CDC via sa liaison aux FcγR et au C1q (Figure 10B). Dans ce cas, il est donc préférable de maximiser la disponibilité du Fc et que l'anticorps ne soit pas internalisant. Ces effets peuvent avoir lieu seuls ou en combinaison avec les effets directs sur la tumeur. C'est le cas du cetuximab et du trastuzumab qui provoquent l'ADCC en plus de leurs effets d'inhibition de signalisation. Ces effets sont influencées par la sous-classe de l'IgG car ce sont les IgG1 et IgG3 qui interagissent le mieux avec les FcγR. Mais il existe également des variants alléliques

au sein de ses sous classes qui ont beaucoup d'influence sur l'affinité des Fc pour les FcγR. Par exemple, l'allèle FcγRIIIA 158V a une affinité plus importante pour les IgG1 que l'allèle FcγRIIIA 158F, et l'allèle FcγRIIA 131H a une meilleure affinité pour les IgG1 que l'allèle FcγRIIA 131R (Dijstelbloem et al., 2001). Ce polymorphisme du FcγRIIIA est à l'origine du meilleur taux de réponse des patients avec l'allèle FcγRIIIA 158V lorsque leur lymphome est traité par du rituximab (Cartron et al., 2002; Weng and Levy, 2003), et également lors du traitement de cancers du sein par le trastuzumab (Musolino et al., 2008). L'efficacité du cetuximab associé à l'irinotecan dans les cancers colorectaux métastatiques est également corrélée avec la présence des allèles FcγRIIA 131H et FcγRIIIA 158V et de la mutation KRAS (Bibeau et al., 2009).

L'action immuno-modulatrice des anticorps peut aussi se faire en ciblant directement des cellules immunes. Les lymphocytes T cytotoxiques ont normalement la capacité de reconnaître et détruire les cellules tumorales. Cependant, dans les cancers un mécanisme immunosuppresseur empêche cette activité. L'ipilimumab (Yervoy®), en se fixant sur le récepteur CTLA-4 présent spécifiquement sur ces lymphocytes T, permet de lever cette inhibition par son action antagoniste. Il est utilisé pour traiter les mélanomes avancés (Di Giacomo et al., 2009). De la même façon que CTLA-4, le blocage de PD-1 permet de lever l'inhibition immune. Ce récepteur est quant à lui exprimé sur les cellules T, B et NK (Figure 10B). Le nivolumab (Opdivo®) et le pembrolizumab (Keytruda®) sont deux anti-PD-1 sur le marché dans le traitement de mélanomes avancés. A l'inverse de ces deux antagonistes, il existe des agonistes ciblant le CD40 présent en surface de plusieurs cellules présentatrices d'antigène et sur certaines cellules tumorales. Ces anti-CD40 (dacetuzumab et lucatumumab) permettent d'activer les cellules présentatrices d'antigène et de conduire à une réponse immune anti-tumorale via les lymphocytes T. Ils ont montré des résultats prometteurs en phase clinique dans les leucémies lymphatiques chroniques, les myélomes multiples et les lymphomes non-Hodkiniens (Hassan et al., 2014).

Enfin, les anticorps peuvent cibler le microenvironnement tumoral. Le bevacizumab (Avastin®) inhibe l'angiogénèse en ciblant le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire A (VEGFA) impliqué dans ce processus (Figure 10C). Cette angiogénèse permet la création de nouveaux vaisseaux sanguins pour satisfaire les besoins de la tumeur en oxygène et en nutriments. Ainsi, la plupart des cellules tumorales sécrètent du VEGF. Le bevacizumab permet également d'augmenter l'infiltration tumorale par les lymphocytes T et B et d'inhiber les lymphocytes T régulateurs (Terme et al., 2013). Il a été approuvé dans le traitement des cancers métastatiques colorectaux, du sein, du poumon, du col de l'utérus, du poumon, du rein, de l'ovaire et du glioblastome.

Des protéines de fusion au fragment Fc ont été créées pour augmenter leur demi-vie grâce au mécanisme de recyclage via le FcRn. Elles sont actuellement 10 sur le marché. La seule utilisée en oncologie est le ziv-aflibercept (Zaltrap®) dans les cancers colorectaux. Elle se lie au VEGF-A et VEGF-B et contient un fragment Fc d'IgG1 humaine. Il agit comme un récepteur leurre à la place des récepteurs au VEGF et inhibe ainsi l'angiogenèse.

Il existe aussi des anticorps bispécifiques, c'est à dire capables de se lier à deux antigènes différents simultanément. Le seul sur le marché est le catumaxomab (Removab®), un hybride rat/souris qui se lie au CD3 exprimé sur les lymphocytes T et à la molécule d'adhésion cellulaire épithéliale (EpCAM) (Figure 10A). Il est indiqué dans le traitement d'ascites malignes chez les patients atteints d'un carcinome EpCAM-positif. Il est tri-fonctionnel car il permet de rapprocher les cellules tumorales (via EpCAM), les lymphocytes T (via CD3) et les cellules exprimant les FcγR comme les macrophages, les NK ou les cellules dendritiques (via son Fc), ceci dans le but de déclencher une réaction immunitaire.

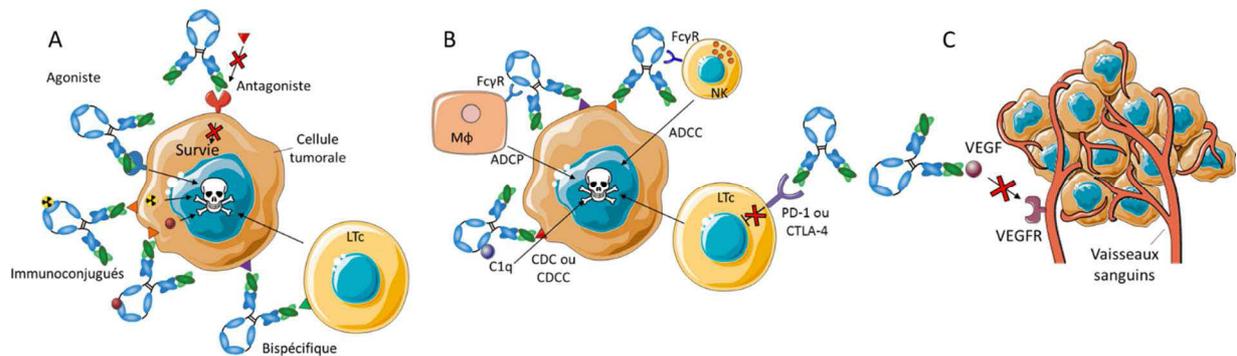


Figure 10 : Mécanismes d'action des anticorps anti-cancéreux. A) Action directe sur la tumeur. B) Action via les fonctions effectrices du fragment Fc. C) Action sur la vascularisation tumorale. LTC : lymphocyte T cytotoxiques, NK : cellule Natural Killer, MΦ : macrophage, ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps, ADCP : phagocytose cellulaire dépendante des anticorps, CDC : cytotoxicité dépendante du complément, CDCC : cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante du complément, VEGF(R) : (récepteur au) facteur de croissance de l'endothélium vasculaire.

7. Optimisation des anticorps

Il est devenu possible de sélectionner des anticorps monoclonaux se liant à une grande variété de cibles notamment grâce aux banques d'anticorps humains. Cependant, obtenir des clones capables de reconnaître un antigène ne suffit pas. Ils doivent également se lier de façon efficace, avoir un effet biologique par leurs parties variables et/ou leur fragment constant, avoir de bonnes propriétés pharmacocinétiques et de biodistribution, et être le moins immunogène possible. Il existe donc différentes générations d'anticorps qui sont de plus en plus optimisés pour répondre à ces exigences.

La première génération d'anticorps comprenait des Ig murines ou chimériques. Les « Bio-better » ont été définis comme ciblant le même épitope mais améliorant l'homogénéité et la nature des glycosylations pour augmenter les fonctions effectrices et comprenant des mutations pour augmenter la demi-vie dans le sérum. Les anticorps de seconde génération sont dirigés contre les mêmes antigènes mais comportent plusieurs modifications : les domaines variables sont améliorés pour diminuer l'immunogénicité, des épitopes différents sont ciblés avec une affinité modulée, différents formats d'anticorps peuvent être utilisés : Fab-PEG (voir la partie pharmacocinétique et biodistribution), protéines de fusions au Fc, etc. Les anticorps de 3^{ème} génération ciblent à nouveau des épitopes différents, agissent par d'autres mécanismes d'action, et sont souvent construits pour améliorer les fonctions effectrices du Fc et augmenter la demi vie (Beck, 2011). Un exemple d'antigène ayant été ciblé par différentes générations d'anticorps est le CD20 (Tableau 3).

Génération	Nom	Type d'IgG1	Caractéristiques	Production
1 ^{ère}	Rituximab (Mabthera®)	chimérique		CHO
« bio-better »	« Rituximab » GS4:0	chimérique	afucosylé, même épitope	<i>Pichia pastoris</i>
2 ^{ème}	Ofatumumab (Arzerra®)	humaine	épitope et mécanisme d'action différents	CHO
	Ocrelizumab (phase III)	humanisée	même épitope	
3 ^{ème}	Obinutuzumab (phase III)	humanisée	afucosylé, épitope et mécanisme d'action différents	CHO
	Ublituximab (phase II)	chimérique		YB2/0

Tableau 3 : Différentes générations d'anti-CD-20. Adapté de Beck, 2011

a. Optimisation des effets directs du Fab

Pour améliorer les effets liés à la liaison de l'anticorps sur sa cible, on peut moduler son affinité. Le phage display et la mutagénèse rendent possible la maturation d'affinité *in vitro* en mutant de façon aléatoire ou non les CDR ou les frameworks (Hoogenboom, 2005). Il existe désormais des techniques permettant de réaliser des screenings à haut débit, en combinant des sélections de scFv par phage display et leur clonage au format IgG (Renaut et al., 2012). Cette maturation d'affinité peut aussi se faire par ribosome-display (Lipovsek and Plückthun,

2004), yeast-display (Graff et al., 2004), ou PCR sujette aux erreurs (Schlapschy et al., 2004). L'affinité serait également influencée par la présence de glycosylations sur le Fab des IgG. Ces modifications sont souvent issues de mutations somatiques. On peut donc envisager de jouer sur celles-ci (Filpula, 2007). Cependant, lorsque l'affinité devient supérieure à $10^{10}M^{-1}$, les anticorps risquent d'être internalisés trop vite ce qui va limiter les propriétés effectrices du fragment Fc (Rudnick et al., 2011). Pour contrer cette internalisation, il est possible d'injecter des doses plus fortes pour saturer ce mécanisme mais le risque de déclencher des effets secondaires devient alors plus important. Avec une haute affinité, on risque aussi de ne pas obtenir la meilleure pénétration tumorale possible. Au-delà de 10^9M^{-1} , les scFv sont retenus dans la région périvasculaire de la tumeur, contrairement aux scFv d'affinité modérée qui sont répartis de façon homogène au sein de la tumeur (Adams et al., 2001).

Les anticorps peuvent aussi être modulés en terme de spécificité. Lorsque l'antigène ciblé possède différentes isoformes, il faut veiller à ce qu'il ne se lie qu'à/aux isoforme(s) souhaitée(s). Il peut être intéressant de sélectionner des anticorps se liant à l'orthologue murin ou simien de l'antigène humain dans le but de réaliser des tests d'efficacité et de toxicité pertinents avec les modèles précliniques.

La conjugaison de radionucléides, de drogues ou de toxines sur un anticorps est une autre façon d'améliorer ses effets cytotoxiques. Pour cela, différentes techniques de couplage ont été développées pour permettre de moduler le nombre de molécules greffées et d'optimiser la clivabilité ou la non clivabilité des linkers dans le cas des ADC.

b. Diminution de l'immunogénicité

L'immunogénicité des anticorps thérapeutiques provoque des effets indésirables lors de leur injection aux patients. La présence de séquences murines dans les anticorps murins, chimériques et humanisés conduit à la sécrétion d'anticorps humains anti-souris (HAMA). Ces HAMA sont dirigés majoritairement contre les régions constantes (Hosono et al., 1992). L'humanisation a donc permis de diminuer cette immunogénicité. Néanmoins, même des anticorps humains peuvent avoir un caractère immunogène, car il existe une immunogénicité résiduelle au niveau des CDR. Il est possible de muter un ou deux résidus des CDR pour diminuer l'immunogénicité tout en conservant la liaison antigénique. (Harding et al., 2010).

Un même anticorps peut présenter une grande variabilité en terme de modifications post-traductionnelles suivant les conditions de production utilisées. Les anticorps sont souvent produits en cellules CHO ou dans des lignées murines comme NS0 et SP2/0. Dans ces lignées murines les glycosylations obtenues sont différentes car on trouve la présence d'acide N-glycolylneuraminique et d' α -1,3-galactose. Même en optimisant les conditions de culture, il n'est pas toujours possible d'empêcher leur formation (Liu et al., 2014a). Or, ces deux

composés ne sont jamais présents naturellement dans les anticorps humains car l' α -1,3-galactosyltransferase est absente chez l'Homme et l'acide CMP-N-acétylneuraminique n'a pas d'activité hydrolase. Ceci conduit donc à une immunogénicité. Par exemple, on retrouve des IgE dirigées contre l' α -1,3-galactose qui constitue la glycosylation présente dans le Fab du cetuximab. L'hypersensibilité qui en découle a lieu lorsque l'anticorps est produit en SP2/0 mais pas lorsqu'il est produit en CHO (Beck, 2011). Même avec des conditions de production données, on obtient un mélange hétérogène car il existe plusieurs autres types de modifications *in vitro* ou *in vivo* des anticorps thérapeutiques. Néanmoins, celles-ci sont présentes dans les IgG naturelles et présentent donc moins de risque d'immunogénicité (Liu et al., 2014a).

c. Modulation des fonctions effectrices

i. Isotype

La méthode la plus simple pour moduler les fonctions effectrices du fragment Fc est de choisir l'isotype approprié. Les IgG1 et 3 sont ceux ayant le plus de potentiel d'ADCC, d'ADCP et de CDC. La plupart des anticorps thérapeutiques sont des IgG1. Il n'y a pas d'IgG3 à cause de leur faible demi-vie. Quelques IgG2 et 4 sont sur le marché et sont utilisées lorsque l'activité biologique de l'anticorps se fait via sa partie Fab et non via le recrutement du système immunitaire. Par exemple, le panitumumab est une IgG2 car c'est sa liaison à l'EGFR qui va empêcher la fixation de l'EGF et bloquer la signalisation en aval. L'éculizumab est quant à lui un hybride contenant le domaine CH1 et la charnière d'une IgG2 et les domaines CH2 et CH3 d'une IgG4.

ii. Glycosylation et Fc γ R

La glycosylation présente sur les domaines CH2 joue un rôle crucial dans la liaison du Fc sur les Fc γ R. Son absence diminue fortement cette interaction (Borrok et al., 2012). La composition de cette glycosylation a également une influence. Beaucoup d'acide sialique ou de N-acétylglucosamine (GlcNAc) conduisent respectivement à moins d'ADCC ou de CDC (Hodoniczky et al., 2005; Scallon et al., 2007). L'afucosylation permet d'augmenter l'affinité pour le Fc γ RIIIA, ce qui a pour effet d'augmenter le potentiel d'ADCC et d'ADCP (Liu et al., 2015). C'est la modification des glycanes la plus efficace. Cette ADCC sera plus importante quel que soit le polymorphisme de la position 158 (Niwa et al., 2004). Différentes techniques permettent d'obtenir des anticorps afucosylés : l'humanisation des glycosylations par manipulation génétique d'organismes mammifères (comme les levures), la modification de l'activité des enzymes impliquées dans les voies de fucosylation des cellules mammifères, ou l'afucosylation *in vitro* (Yamane-Ohnuki and Satoh, 2009). Par exemple, l'obinutuzumab afucosylé (Gazyvaro®) améliore la survie sans progression d'environ 1 an en essai clinique

de phase III comparé au rituximab dans le cadre d'une leucémie lymphoïde chronique, lorsqu'ils sont chacun combinés à une chimiothérapie (Goede et al., 2014). L'anticorps est produit dans une lignée CHO K1 exprimant la β -1,4-N-acétyl-glucosaminyltransferase III sauvage et la Golgi α -mannosidase II sauvage permettant l'afucosylation (Mössner et al., 2010). De la même façon, le GA201, un anti-EGFR afucosylé, montre une meilleure efficacité que le cetuximab *in vitro* par augmentation de l'ADCC (Gerdes et al., 2013). Cependant, il s'est avéré toxique chez l'Homme lors des essais cliniques. Le mogalizumab afucosylé a quant à lui été approuvé au Japon en 2012. Il a été produit en cellules CHO où le gène de l' α -1,6-fucosyltransferase est inactivé (CHO FUT8 KO, technologie Potelligent®) (Beck and Reichert, 2012). Il existe aussi du trastuzumab afucosylé (Junttila et al., 2010). En 2015, 14 anticorps anti-cancéreux afucosylés étaient en phase clinique dans le traitement de cancers à tumeurs solides ou hématologiques (DiLillo and Ravetch, 2015).

iii. Mutations ponctuelles et Fc γ R

Les fonctions effectrices peuvent également être modulées par l'introduction de mutations ponctuelles dans le fragment Fc. Cependant, trop de mutations peuvent rendre le Fc immunogène. Cette technique est principalement axée sur l'amélioration de l'affinité des IgG1 au Fc γ RIIIA. Comme il est le seul Fc γ R exprimé en surface des NK, il n'y a pas de compétition avec le Fc γ RIIB inhibiteur. Cette population cellulaire est donc efficace pour conduire à la lyse tumorale. Il existe aussi des mutations permettant d'améliorer la liaison au Fc γ RIIA pour potentialiser l'ADCP (Richards et al., 2008). L'introduction de mutations ponctuelles peut également moduler la liaison du Fc à plusieurs Fc γ R à la fois. Plusieurs anticorps anti-cancéreux contenant des Fc mutés pour augmenter les fonctions effectrices sont actuellement en essais cliniques. Ils ciblent B7-H3, HER2, CD30, CD19, CD123, CD37, l'intégrine α 5 β 1 et CD20 (Tableau 4) (DiLillo and Ravetch, 2015; Sondermann and Szymkowski, 2016).

Les structures cristallographiques ont montré que le Fc se lie de façon asymétrique au Fc γ RIII car différents résidus sur les 2 chaînes sont en contact avec le récepteur. 9000 clones de Fc hétérodimériques ont été screenés et plusieurs clones asymétriques ont montré une affinité augmentée pour le Fc γ RIIIA (indépendamment du polymorphisme de la position 158), une ADCC plus importante *in vitro*, et une inhibition de la croissance de xénotgreffe murine plus importante. Ces hétérodimères se lient de façon plus sélective au Fc γ RIIA comparé au Fc γ RIIB inhibiteur. Leur afucosylation augmente encore l'affinité pour le Fc γ RIIIA et le potentiel d'ADCC (Liu et al., 2014b). Mais le fait de combiner l'afucosylation avec des mutations n'apporte parfois rien de plus (Masuda et al., 2007). L'effet additif de ces deux techniques doit être déterminé au cas par cas.

Mutations	Anticorps	Cible	Effet	Indications	Référence
F243L/R292P/ Y300L/L235V/ P396L	Enoblituzumab (MGA271)	B7-H3	ADCC++	Carcinomes B7-H3 +	Nordstrom et al., 2011
	Margetuximab (MGAH22)	HER2	ADCC++	Sein Gastrique	
S239D/ I332E	XmAb-2513	CD30	ADCC++	HL	Kumar et al., 2015
	XmAb-5574	CD19	ADCC++ ADCP++	ALL NHL	Woyach et al., 2014
	CSL362	CD123	ADCC++	AML	Lee et al., 2015
	BI 836826	CD37	ADCC++	NHL, CLL	Heider et al., 2011
S239D/A330L /I332E	PF-04605412	$\alpha 5\beta 1$	ADCC++	Tumeurs solides	Mateo et al., 2014
P247I/A339Q	Ocaratuzumab	CD20	ADCC++ CDC --	ALL NHL	Forero-Torres et al., 2012

Tableau 4 : Anticorps en phases cliniques contenant un Fc muté pour améliorer les fonctions effectrices. AML : leucémie myéloïde aigüe. (N)HL : Lymphome (non) Hodgkinien. ALL : leucémie lymphoblastique aigüe.

iv. Activation du complément

Les fonctions effectrices du fragment Fc passent aussi par la voie du complément, via la fixation du facteur C1q. L'expression de protéine inhibitrices de cette cascade du complément (CD46, CD55, CD59) peut être un obstacle à la lyse tumorale. Il est possible de co-administrer des anticorps qui bloquent ces inhibiteurs en plus des anticorps anti-tumoraux (Filpula, 2007). Comme pour les Fc γ R, des mutations ponctuelles ont été introduites pour améliorer la liaison au C1q et induire davantage de CDC. Les mutations S267E, H268F et S324T et leurs combinaisons, ainsi que les mutations K326W et E333S ont montré un gain de liaison au C1q et une meilleure CDC (Idusogie et al., 2001; Moore et al., 2010). Des résidus situés dans la partie haute de la région charnière peuvent aussi être substitués pour augmenter la liaison au C1q et la CDC (Dall'Acqua et al., 2006). Après s'être liées à l'antigène, les IgG se regroupent et forment des hexamères en surface de la cellule. Ce processus permet de recruter le facteur C1q et favorise ainsi l'activation du complément. Une autre alternative est donc de trouver des mutations qui favorisent la formation de ces hexamères. C'est le cas de la substitution E345R, qui peut être combinée à E430G et S440Y (Diebolder et al., 2014) et des substitutions E345K ou E430G seules (Jong et al., 2016).

Enfin, il est possible d'associer le recrutement du C1q et des FcγR activateurs. A partir de l'anti-CD20 ocrelizumab, les substitutions H268F/S324T décrites pour améliorer la liaison au C1q et la CDC ont été combinées : soit avec les mutations G236A/I332E connues pour augmenter sélectivement l'affinité pour les FcγRIIA et IIIA par rapport à l'inhibiteur IIB, soit avec les mutations S239D/I332E connues pour améliorer la liaison à tous les types de FcγR. Ces combinaisons conduisent à une CDC, une ADCC et une ADCP jusqu'à respectivement 3.3, 22 et 4.7 fois supérieures à celles obtenues avec l'ocrelizumab sauvage (Moore et al., 2010).

d. Pharmacocinétique et biodistribution

Améliorer la demi-vie d'un anticorps dans l'organisme permet de diminuer les doses injectées aux patients et d'espacer ces doses dans le temps. De plus, une demi-vie trop faible est synonyme d'une élimination trop rapide donc d'une faible efficacité thérapeutique. Les IgG humaines possèdent une très bonne demi-vie (3 semaines), à l'exception des IgG3 (environ une semaine) qui se lient moins bien au FcRn et sont donc moins recyclées. En revanche, les anticorps murins ont une demi-vie plus courte car ils se fixent moins bien sur le FcRn humain. Ceci n'est pas décelé lorsqu'on les teste chez la souris car dans ce cas c'est le FcRn murin qui intervient, et il lie bien toutes les IgG (Ober et al., 2001).

La N-glycosylation des anticorps, et notamment les mannoses, semble avoir une influence sur la pharmacocinétique mais son rôle reste contesté suivant les études (Higel et al., 2016). L'allotype des anticorps influe également sur ce paramètre. C'est le cas par exemple des IgG1, qui présentent des affinités au FcRn variables (Ternant et al., 2016). Différentes substitutions dans le fragment Fc des IgG ont été décrites pour augmenter la liaison au FcRn et étendre la demi-vie sérique. Elles sont résumées dans le Tableau 5. Les résidus enfouis entre les domaines CH2 et CH3 sont ciblés car ils influent sur la flexibilité de l'interface CH2-CH3 où se lie le FcRn (Liu et al., 2008). Lorsque le cetuximab et le bevacizumab mutés sont injectés à des souris xénotransgéniques possédant le FcRn humain, la clairance plus lente entraîne une meilleure activité anti-tumorale qu'avec les anticorps non mutés (Zalevsky et al., 2010). Cependant, ces mutations augmentant l'affinité au FcRn ne sont pas toujours corrélées avec une meilleure demi-vie. Il faut aussi prendre en compte la liaison à l'antigène et la résistance à la protéolyse lorsque l'on souhaite améliorer cette demi-vie. De plus, l'amélioration de la fixation au FcRn peut faire diminuer les interactions avec les FcγR, même si les sites de fixation sont distants, à cause d'une modification structurale (Grevys et al., 2015).

Mutations	Anticorps	Cible	Affinité au FcRn (pH 6)	Demi-vie sérique (T1/2 β)	Référence
M428L	OST577 (IgG2M3)	HBV	x7 (humain) x8 (singe)	x1.8 (singe)	Hinton et al., 2004
T250Q/M428L	OST577 (IgG2M3)	HBV	x28 (humain) x27 (singe)	x1.9 (singe)	Hinton et al., 2004
	OST577 (IgG1)	HBV	x29 (humain) x37 (singe)	x2.5 (singe)	Hinton et al., 2006
M252Y/S254T/ T256E	MEDI-524 (IgG1)	RSV	x10 (humain)	x4 (singe)	Robbie et al., 2013
N434A	Hu4D5 (IgG1)	HER2	x3 (humain)	x2.2 (souris*)	Petkova et al., 2006
	IgG1	hBSR	x4 (singe)	x2 (singe)	Yeung et al., 2009
T307A/E380A/ N434A	Hu4D5 (IgG1)	HER2	x12 (humain)	x2.5 (souris*)	Petkova et al., 2006
M428L/N434S	Bevacizumab (IgG1)	VEGF	x11 (humain)	x3.2 (singe)	Zalevsky et al., 2010
	Cetuximab (IgG1)	EGFR	x11 (humain)	x3.1 (singe) x5 (souris*)	

Tableau 5 : Résumé des mutations augmentant la liaison au FcRn et la demi-vie sérique. * : souris transgéniques possédant le FcRn humain. HBV : virus de l'hépatite B. RSV : virus respiratoire syncytial. hBSR : récepteur de surface des cellules B humaines. Adapté de Wang et al., 2014.

La biodistribution des Ig entières est défavorable à cause de leur taille, notamment lorsqu'elles ciblent des tumeurs solides. Les fragments d'anticorps ont l'avantage d'avoir une petite taille donc une pénétration tissulaire plus facile. Leur production est également facilitée pour cette raison et parce que l'absence de Fc permet de travailler avec des organismes procaryotes sans avoir de problèmes de glycosylation. Les problèmes rencontrés avec ces fragments sont : la faible demi-vie due à l'absence de recyclage par le FcRn et leur petite taille, et l'absence de fonctions effectrices via le fragment Fc. Pour cela, des fragments optimisés ont été développés.

Pour remédier au problème de faible demi-vie, il est possible de coupler des fragments d'anticorps à du polyéthylène glycol (PEG), un polymère inerte aussi bien en terme de réactivité chimique que d'immunogénicité. Il peut être linéaire ou ramifié et permet d'alourdir les fragments de plusieurs dizaines de kDa suivant la taille choisie. Le certolizumab pegol

(Cimzia®) est un Fab' PEGylé inhibiteur du TNF α (facteur de nécrose tumorale) approuvé par la FDA pour des maladies inflammatoires : polyarthrite rhumatoïde, spondyloarthrite axiale et rhumatisme psoriasique. Sa demi-vie est de 14 jours contre moins de 12h pour un Fab classique (Melmed et al., 2008).

Comme il a été mentionné précédemment (partie formats d'anticorps alternatifs B.3), la valence a une influence positive sur la demi-vie. On peut donc combiner la divalence et la PEGylation. Pour cela, un scFv anti-HER2 a été produit sous forme monomérique ou dimérique, avec ou sans PEGylation. La comparaison de ces 4 composés montre une meilleure affinité après multimérisation. La PEGylation fait diminuer l'affinité d'un facteur 5. En revanche, le monomère-PEG et le dimère-PEG présentent respectivement une accumulation tumorale 8.5 et 14.5 fois supérieure à celle du scFv monomérique ou dimérique 48h après injection (Kubetzko et al., 2006). Cette diminution de l'affinité suite au couplage d'une molécule de PEG a également été rapportée lors de la PEGylation du Fab' issu du trastuzumab. Elle dépend de la position et du nombre de polymères greffés. Cependant l'effet anti-tumoral n'a pas été mesuré dans cette étude (Selis et al., 2016).

Une alternative au PEG est le couplage à la HSA (albumine sérique humaine), qui est l'une des protéines les plus abondantes dans le sérum et qui possède une des plus longues demi-vies. Cette protéine se dégrade mieux que le PEG. Un conjugué composé d'un scFv anti-HER2 et d'un scFv anti-HER3 fusionnés aux extrémités N- et C-terminales de la HSA a ainsi été jusqu'en essai clinique de phase 2 (Nielsen et al., 2009).

Pour augmenter l'avidité des scFv, des scFv multivalents ont été créés. Lorsqu'ils sont bivalents, on parle de *diabodies* (Figure 11). Des scFv bispécifiques, eux aussi divalents, ont également été développés. C'est le cas des BiTEs™ (*bispecific T-cell engagers*) (Figure 11). Le blinatumomab (Blinicyto®) cible à la fois CD19, un marqueur des cellules B retrouvé dans les lymphomes, et CD3 présent en surface des lymphocytes T. Cet anticorps permet donc de compenser l'absence de Fc par l'activation et la prolifération des lymphocytes T, la sécrétion de cytokine et de granzyme B qui conduisent à la cytotoxicité tumorale (Wong et al., 2013). Il est approuvé pour traiter les leucémies lymphoblastiques aiguës réfractaires. Le solitomomab est un autre BiTE™ qui cible le CD3 et EpCAM, la molécule d'adhérence cellulaire épithéliale. Il permet de rendre sensibles à la cytotoxicité T-cellulaire des tumeurs ovariennes résistantes à la chimiothérapie et surexprimant EpCAM (English et al., 2015). Il est en phase clinique dans le cadre de traitement de tumeurs solides exprimant ce récepteur.

Si l'on insère un pont disulfure pour stabiliser l'interaction entre les 2 parties d'un scFv bispécifique, on parle alors de DART (*dual affinity retargeting molecules*) (Figure 11). Deux d'entre eux sont actuellement en phase I : le MGD006, un anti-CD123 combiné à un anti-CD3

dans le cadre de leucémies myéloïdes aigües, ainsi que le MGD007, un anti-gpA33 combiné à un anti-CD3 dans le cancer colorectal (Spiess et al., 2015).

Pour conférer des propriétés effectrices à un scFv, on peut coupler à son extrémité C-terminale un domaine Z de liaison aux immunoglobulines. Le conjugué obtenu est appelé un « Grababody ». Il a la capacité de capturer les IgG circulantes ce qui lui permet d'activer l'ADCC et la CDC (Zhang, 2013).

La démarche inverse consiste à conférer des propriétés de liaison antigénique à un fragment Fc. Ce type de composé est appelé un Fcab. Des mutations doivent être introduites sur des boucles n'interagissant pas avec les FcγR, le C1q et le FcRn, c'est à dire en C-terminal du CH3. Pour cela, des bibliothèques de Fc dimériques ou monomériques et de domaines CH2 ou CH3 monomériques ont été construites pour permettre des sélections par phage display ou yeast display (Ying et al., 2014). Le FS102 est un Fcab anti-HER2 actuellement en clinique. Il se lie à un épitope différent des autres anti-HER2 sur le marché. Ses propriétés pharmacocinétiques ne sont pas altérées par rapport au format classique. Il permet l'internalisation et la dégradation du récepteur HER2, et permet ainsi une régression tumorale dans des modèles de xénogreffes tumorales dérivées de patients réfractaires à la combinaison du trastuzumab et du pertuzumab (Leung et al., 2015).

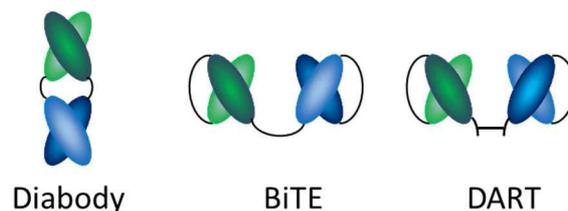


Figure 11 : Différents formats de scFv bispécifiques. BiTE : bispecific T-cell engagers. DART : dual affinity retargeting molecules.

C. Conjugaisons bio-orthogonales

1. Contexte des couplages protéiques

Les couplages protéiques consistent à coupler de petites molécules sur des protéines ou à coupler des protéines entre elles. Les chaînes latérales des acides aminés sont composées de fonctions chimiques variées qui diffèrent au niveau de leur encombrement stérique, structure, point isoélectrique et polarité (donc hydrophobicité). Ceci est à l'origine de leurs réactivités différentes. Les protéines sont donc un mélange complexe, tant au niveau de la nature des résidus (séquence primaire) qu'au niveau de sa conformation spatiale (structures secondaire, tertiaire et quaternaire) qui va rendre certains résidus enfouis donc difficilement

réactifs. L'utilisation de réactions bio-orthogonales va alors permettre de cibler certains résidus en particulier.

Deux groupements chimiques sont bio-orthogonaux s'ils réagissent entre eux sans interagir d'une quelconque façon avec les autres fonctionnalités présentes au sein des protéines, voire des cellules. Cette réaction doit être biocompatible, c'est à dire être réalisable dans des conditions de pH, de température et de pression applicables à des protéines. Généralement, il s'agit de pH neutres, de températures ambiantes ou légèrement supérieures, et de pression atmosphérique. Les produits formés doivent être stables et non toxiques. Enfin, la réaction doit être spécifique pour éviter la formation de produits secondaires. La rapidité est un avantage, notamment dans le cas de conjugaisons dans des cultures cellulaires ou des organismes vivants où le produit de réaction doit se former à partir de faibles concentrations de réactifs (Sletten and Bertozzi, 2009). En revanche, la stéréochimie du produit obtenu a généralement moins d'importance.

Les réactions bio-orthogonales sont essentiellement exothermiques car les réactifs initiaux sont hautement réactifs et/ou les produits finaux sont stabilisés. La plupart du temps elles consistent en une formation d'une liaison entre un carbone et un hétéroatome (azote, oxygène ou soufre). Idéalement, ce sont des additions sans formation de co-produits ou de co-produits inertes comme du diazote ou de l'eau. Parfois ces conjugaisons s'effectuent en 2 étapes : une étape d'introduction d'une fonctionnalité extrinsèque (de façon chimique, génétique ou enzymatique) et une seconde étape permettant la modification et/ou le couplage souhaité (McKay and Finn, 2014).

2. Rôles et enjeux des couplages sur les anticorps thérapeutiques

Le marquage par un fluorophore ou un radionucléide permet de suivre un anticorps *in vitro*. Pour cette application, le couplage n'a pas besoin d'être régiosélectif ni de conduire à un produit homogène. En particulier, le fait d'obtenir des anticorps contenant différents nombres de molécules à leur surface n'a pas d'importance cruciale, à partir du moment où le marquage n'affecte pas ses propriétés biologiques. En effet, pour ce type d'application l'anticorps est utilisé en large excès, donc même si une faible proportion de celui-ci est conjuguée au niveau de sites importants pour ses propriétés biologiques, cela n'affectera pas la tendance générale.

Les immunoconjugués sont un outil de vectorisation pour conduire une drogue, un radionucléide ou une toxine vers une cellule exprimant l'antigène associé (voir la partie Mécanismes d'action des anticorps anti-cancéreux B.6). L'activité biologique et les propriétés pharmacocinétiques de l'anticorps vont dépendre du nombre et de la position des molécules couplées sur l'anticorps (DAR : *drug antibody ratio*) et de l'homogénéité des conjugués. Ces

paramètres sont donc cruciaux pour ces applications. Ainsi, les premiers ADC étaient construits par couplage aléatoire sur des résidus accessibles alors qu'ils sont de plus en plus construits grâce à des conjugaisons site-spécifiques pour obtenir des DAR homogènes et augmenter la fenêtre thérapeutique *in vivo* (Schumacher et al., 2016).

Le couplage de PEG sur des fragments d'anticorps a quant à lui été utilisé pour augmenter leur demi-vie (voir la partie Pharmacocinétique et biodistribution A.1.d). Dans ce cas aussi le nombre de molécules de PEG doit être défini. Etant donné la masse de ces polymères (généralement quelques dizaine de kilodaltons), ils doivent être conjugués à des positions précises pour ne pas risquer de perturber la liaison de l'anticorps à son antigène.

3. Couplages sur des fonctionnalités natives

Les couplages sur des fonctionnalités natives consistent à tirer profit des différentes réactivités des chaînes latérales des acides aminés des protéines. Seuls les résidus les plus fréquemment dérivés sur des anticorps seront mentionnés ici. Différentes revues répertorient les vastes possibilités de couplages protéiques bio-orthogonaux (Koniev and Wagner, 2015; McKay and Finn, 2014).

a. Lysines

Les lysines des anticorps monoclonaux ont beaucoup été dérivées car elles sont souvent situées en surface et sont donc accessibles aux réactifs de couplage. Lorsque leur ϵ -amine est déprotonée, elles deviennent très nucléophiles et peuvent être conjuguées à des esters activés, des isothiocyanates, des isocyanates, etc. Cependant, ces électrophiles réactifs ne sont pas toujours spécifiques des amines et peuvent être attaqués par d'autres nucléophiles comme les cystéines, tyrosines, sérines ou thréonines si elles sont situées en surface. En milieu aqueux, il est possible d'observer l'hydrolyse des composés obtenus par couplage sur les lysines (Koniev and Wagner, 2015). Ce type de couplage n'est donc pas site-spécifique et pas totalement chimiosélectif.

L'ado-trastuzumab emtansine approuvé par la FDA a été obtenu par couplage de la drogue DM1 sur les lysines via un ester N-hydrosuccinimide. Il y a entre 0 et 8 molécules de DM1 sur l'anticorps avec un DAR moyen de 3.5. Parmi les 88 lysines présentes, 70 sont des sites de conjugaisons potentiels (Kim et al., 2014). Le lorvotuzumab mertansine est un anti-CD56 qui a été obtenu par le même type de couplage, là encore avec un DAR entre 3 et 4, et entre 0 et 6 molécules de DM1 couplées. Une quarantaine de lysines modifiées ont été identifiées par spectrométrie de masse sur les 86 lysines présentes dans l'anticorps (Wang et al., 2005). Il est actuellement en essai clinique de phase II. Ces deux exemples montrent la possibilité d'avoir statistiquement plus d'un million d'ADC différents. En effet, en plus de présenter une

hétérogénéité due aux différents DAR, un ADC avec un DAR donné présente une hétérogénéité au niveau des positions occupées. Cette diversité peut poser problème car chaque espèce peut avoir des propriétés différentes, notamment en terme d'efficacité et toxicité *in vivo*, de propriétés pharmacocinétiques (Boylan et al., 2013) et de tendance à l'agrégation (Wakankar et al., 2010). De plus, la reproductibilité de cette diversité d'un lot à l'autre pose problème car la composition des ADC doit être caractérisée autant que possible pour être conforme aux GMP.

b. Cystéines

Le groupement thiol de la chaîne latérale des cystéines est l'un des groupements les plus utilisés en bioconjugaison car il est peu abondant dans les protéines naturelles et c'est le plus nucléophile de tous les acides aminés (Brotzel and Mayr, 2007). Les cystéines sont beaucoup moins nombreuses que les lysines au sein des anticorps. Sur une IgG1 humaine, elles sont au nombre de 32 et sont toutes engagées dans des ponts disulfures à des positions bien définies : 12 ponts intrachaines, 2 ponts reliant les chaînes lourdes et légères et 2 ponts reliant les chaînes lourdes dans la région charnière. Ce type de couplage sera donc site-spécifique.

Un grand nombre d'électrophiles peuvent être attaqués par les thiols : iodoacétamides, maléimides, vinyl sulfones, vinylpyridines, époxydes, etc. La plus utilisée des stratégies a été le maléimide car il permet une réaction rapide avec une bonne sélectivité, à condition de travailler à pH inférieur à 7.5 pour éviter les réactions secondaires avec les amines primaires. Le maléimide a permis de coupler des drogues, des protéines (biotine), des polymères (PEG), des chélateurs de radionucléides, ou des fluorophores sur des cystéines existantes ou des cystéines introduites dans des protéines (Figure 12A).

Comme les cystéines des anticorps sont couplées entre elles via des ponts disulfures, une étape de réduction, grâce au DTT ou au β -mercaptoéthanol par exemple, précède le couplage. Ces deux réactifs possèdent un thiol, ce qui cause une compétition avec le thiol formé suite à la réduction. Il est donc nécessaire d'éliminer ces agents réducteurs du milieu réactionnel mais ceci peut reconduire à une réoxydation partielle des cystéines. Le TCEP est donc de plus en plus utilisé car il ne contient pas de groupement thiol et n'a ainsi pas besoin d'être éliminé. En particulier, il permet une réduction ménagée des anticorps, en ne réduisant que les ponts disulfures interchaines sans réduire les ponts intrachaines. Cette stratégie a été utilisée pour construire l'Adcetris®, un ADC actuellement sur le marché dans le traitement du lymphome hodgkinien. Les 4 ponts interchaines du brentuximab (anti-CD30) ont été réduits pour donner 8 sites de conjugaison potentiels à la védotine, constituée d'un maléimide espacé de la MMAE par un linker (Figure 12B) (Sun et al., 2005). Pour reformer des pseudo ponts disulfures, les maléimides dibromés ont été développés (Figure 12B) (Schumacher et al., 2014) ainsi que les

bis-sulfones (Khalili et al., 2012). Cette stratégie a été appliquée très récemment pour reformer le pont interchaîne d'un Fab grâce au greffage photochimique d'un cyclooctyne (Griebenow et al., 2016). Ces composés permettent aussi de diviser le nombre de drogues couplables par deux, dans la mesure où une molécule réagit avec deux cystéines.

Pour ne pas avoir à modifier les ponts disulfures des anticorps et contrôler précisément le nombre de couplages, des cystéines additionnelles ont été introduites à différentes positions dès les années 1990, par exemple dans le CH1 d'une IgG (Lyons et al., 1990), ou à proximité du C-terminal du CH3 de plusieurs isoformes d'IgG (Stimmel et al., 2000). Avec seulement un acide aminé à introduire, il y a peu de risque de perturber la structure de l'anticorps et sa liaison à l'antigène. Néanmoins, des difficultés ont été rencontrées à cause de l'oxydation de cette cystéine non native. Ce n'est qu'en 2008 que ce problème a été résolu par une réduction au TCEP suivie d'une réoxydation au sulfate de cuivre ou à l'acide déshydroascorbique qui permet de ne laisser que la cystéine introduite au sein des domaines CH1 sous forme libre (Figure 12C) (Junutula et al., 2008a). Différentes positions sur la chaîne lourde et la chaîne légère ont été identifiées comme permettant une mutation en une cystéine réactive sans interférer avec les propriétés de liaison sur le fragment Fab du trastuzumab (Junutula et al., 2008b). Des ADC homogènes avec un DAR de 2 ont été obtenus par couplage de maléimide-linker-MMAE sur un anti-MUC16 (Junutula et al., 2008a) et de maléimide-linker-DM1 sur le trastuzumab (Junutula et al., 2010). Ce trastuzumab DM1 a un meilleur index thérapeutique que le trastuzumab-MCC-DM1 obtenu par couplage du thioéther SMCC sur des lysines et actuellement sur le marché sous le nom de Kadcyla® (trastuzumab emtansine) dans le cadre du traitement du cancer du sein métastatique Her2 positif (Phillips et al., 2008). La comparaison cystéine libre/lysine a également été réalisée lors d'une PEGylation. Lorsqu'elle est effectuée sur l'unique cystéine du hinge d'un Fab', la demi-vie *in vivo* est améliorée d'un facteur 40 sans altérer les propriétés de liaison à l'antigène alors que le couplage aléatoire sur des lysines diminue nettement l'activité biologique (Chapman et al., 1999).

Malgré son utilisation en thérapeutique, le maléimide est connu comme étant relativement instable en conditions physiologiques (Baldwin and Kiick, 2011). En effet, après couplage à un thiol, le cycle succinimide peut subir un échange avec d'autres thiols réactifs présents dans le milieu comme par exemple de l'albumine, de la cystéine libre ou du glutathion, ou encore être hydrolysé (Figure 12A). Le site de conjugaison du maléimide influence la stabilité *in vivo* et l'activité thérapeutique des ADC. Si la cystéine attaquée est située dans une zone très accessible, l'échange de maléimide va prédominer. En revanche, dans une région partiellement accessible c'est l'hydrolyse du cycle qui va prédominer et empêcher la réaction d'échange. L'ADC sera alors plus stable (Shen et al., 2012).

Le maléimide peut être stabilisé en favorisant son hydrolyse. Les composés hydrolysés sont quasiment totalement protégés du processus d'échange. Il a été montré que l'introduction d'un groupement attracteur d'électrons sur l'azote du cycle du maléimide permet d'accélérer cette hydrolyse (Fontaine et al., 2015). Les composés 3-arylpropionitriles (APN) sont une alternative au maléimide (Figure 12D). Ils permettent un couplage chimiosélectif sur les cystéines et ne subissent pas de dégradation en milieu aqueux, dans du plasma humain ou dans des cellules vivantes (Koniev et al., 2014).

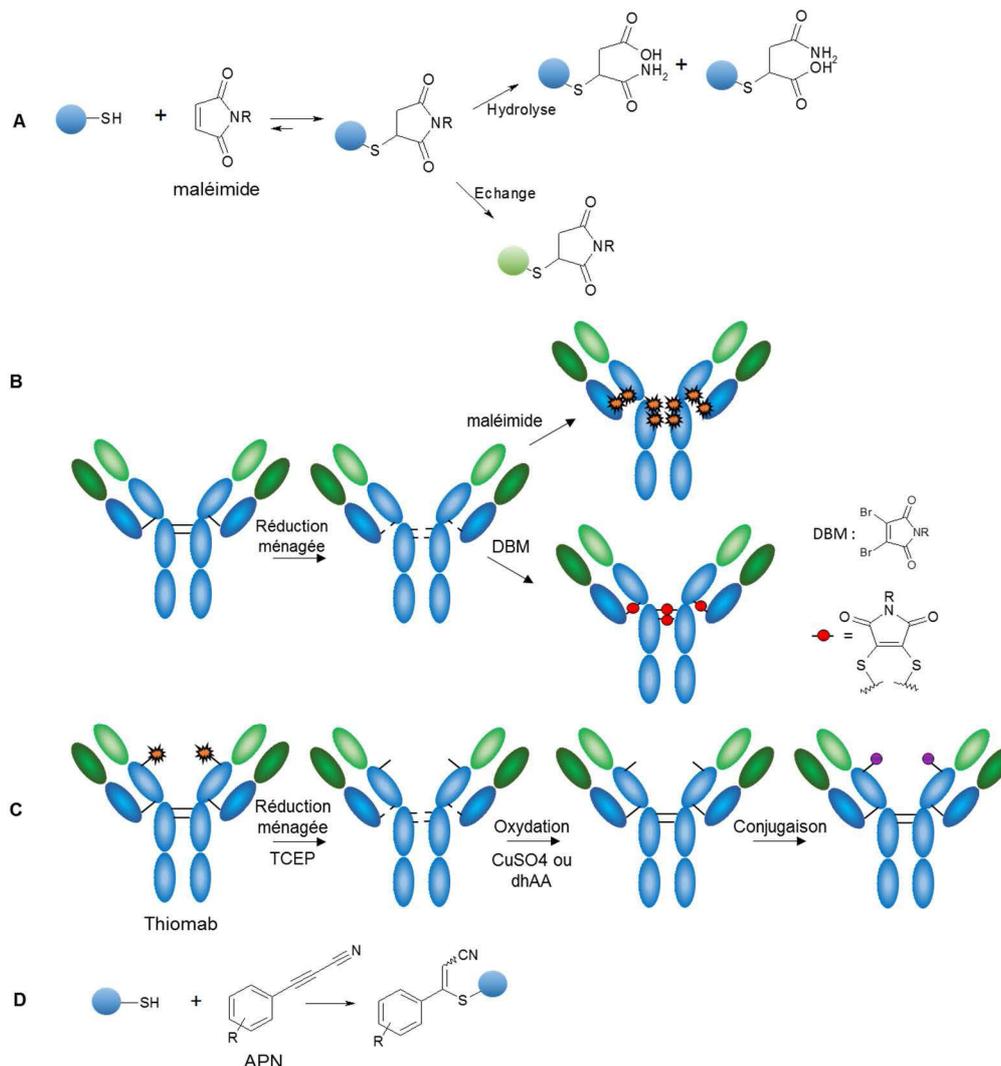


Figure 12 : Couplages sur les cystéines. A) Dérivation d'une cystéine par le maléimide. Le maléimide formé peut subir une hydrolyse ou une réaction d'échange. B) Réduction ménagée d'une IgG puis dérivation des cystéines au maléimide ou reformation des ponts disulfures par du dibromomaléimide (DBM). C) Réduction puis oxydation du thiomab. La cystéine libre introduite sur chaque chaîne lourde sera le seul site de couplage. D) Dérivation d'une cystéine par un 3-arylpropionitrile (APN).

c. Histidines

Les histidines sont moins nucléophiles que les autres groupements présents sur d'autres acides aminés (thiols, amines, alcool, guanidine). La réactivité des histidines dépend de son

pKa, de son exposition au solvant, et des liaisons hydrogènes formées par l'intermédiaire du cycle imidazole. Pour éviter les réactions avec des groupements plus nucléophiles et garantir la spécificité, des conditions précises sont donc nécessaires. Les histidines sont davantage utilisées pour leur capacité à former des complexes avec les métaux de transition, notamment pour purifier des fragments d'anticorps possédant un tag His₆ sur des colonnes de chromatographie d'affinité métallique. Elles ont été impliquées à différentes reprises dans des additions de Michael sur des doubles liaisons d'aldéhydes conjugués (Uchida and Stadtman, 1992; Zamora et al., 1999), des vinylsulfones (del Castillo et al., 2014) et des bis-sulfones (Cong et al., 2012).

A l'origine, les bis-sulfones ont servi à ponter des cystéines pour PEGyler des protéines en reconstituant leurs ponts disulfures (Balan et al., 2007; Shaunak et al., 2006). La PEGylation a ensuite été effectuée de façon spécifique par pontage de deux histidines au sein d'un tag His₆ (Cong et al., 2012). La première étape est une auto-activation de la bis-sulfone en mono-sulfone par perte d'acide sulfonique. L'addition de l'histidine sur l'alcène ainsi formé est suivie de l'élimination du second acide sulfonique. La seconde histidine peut alors se greffer ce qui conduit à une bis-alkylation (Figure 13). Ces réactions sont équilibrées, elles ont été menées dans des conditions décrites comme menant à la formation du composé favorisé thermodynamiquement. Généralement aucune dé-PEGylation n'a été observée et le produit de bis-alkylation est apparu comme stable. Cette réaction a été appliquée à la PEGylation d'un VHH et aucune conjugaison n'a eu lieu en l'absence de tag His₆. Deux sulfones peuvent se greffer sur un tag His₆ ou un tag His₄. Pour n'avoir qu'un seul couplage par protéine, il est possible d'utiliser un tag His₂ ou un tag (His-Gly)₃. Ce dernier tag n'a pas été testé sur un anticorps mais sur la chemerine (Cong et al., 2012).

Les bis-sulfones peuvent donc être appliquées au couplage sur des fragments d'anticorps sur un tag His₆ en utilisant une quantité quasi stœchiométrique de sulfone par rapport à l'anticorps pour ne coupler qu'une molécule, ou sur un tag (His-Gly)₃.

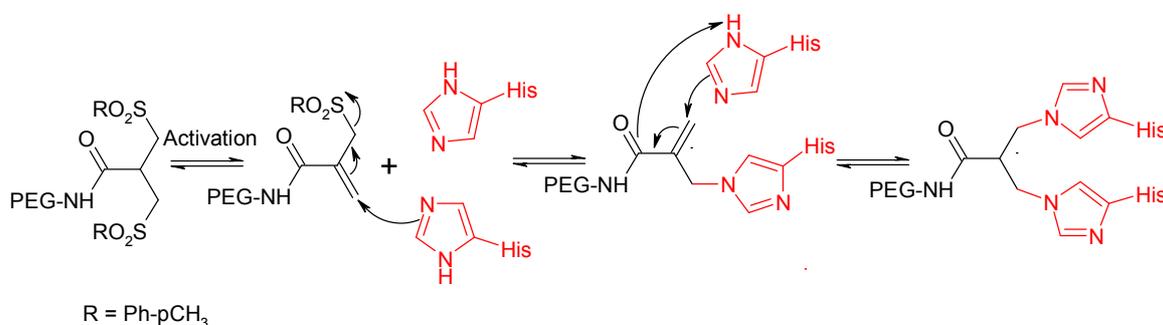


Figure 13 : Mécanisme de bis-alkylation des histidines par les bis-sulfones. 1^{ère} étape : activation de la bis-sulfone en mono-sulfone. 2^{ème} étape : alkylation d'une première histidine avec perte d'acide sulfonique. 3^{ème} étape : alkylation d'une seconde histidine située au voisinage de la première.

d. Glutamines

L'amide présent sur les glutamines est très peu réactif dans des conditions compatibles avec les couplages protéiques. A notre connaissance, la seule possibilité d'utiliser ce résidu est de l'employer dans le cadre d'une réaction enzymatique catalysée par une transglutaminase.

Les transglutaminases sont une famille d'aminocyltransférases (E.C. 2.3.2.13) qui catalysent le couplage entre le groupe ϵ -amine primaire d'une lysine (donneur) et le groupe γ -carboxamide d'une glutamine (accepteur) pour former une liaison isopeptidique stable entre deux protéines ou peptides. Elles sont également capables de catalyser une réaction de déamidation de la glutamine en acide glutamique (Parameswaran et al., 1997). Dans ce cas, c'est une molécule d'eau qui joue le rôle de donneur à la place de la lysine (Figure 14). Le rôle biologique des transglutaminases est de synthétiser des polymères insolubles de protéines qui vont permettre entre autres la coagulation du sang (via le facteur XIII) et le développement de la barrière épidermale. Elles sont également utilisées dans l'industrie pour améliorer la texture et les propriétés physiques d'aliments riches en protéines.

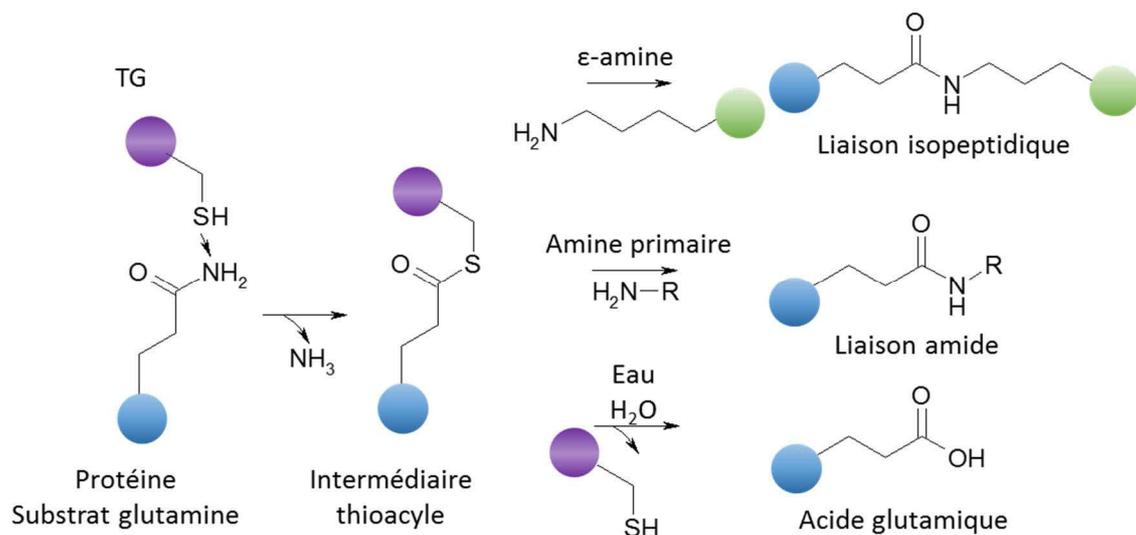


Figure 14 : Types de réaction catalysées par les transglutaminases. 1 : couplage entre une glutamine et l' ϵ -amine d'une lysine. 2 : couplage entre une glutamine et une amine primaire. 3 : déamidation de la glutamine par couplage d'une molécule d'eau.

Ce sont les transglutaminases microbiennes qui sont utilisées pour des applications industrielles car elles possèdent les caractéristiques suivantes : leur activité est calcium-indépendante contrairement aux transglutaminases mammifères ; elles sont moins susceptibles de catalyser une réaction de déamidation que les transglutaminases « facteur XIII-like » (Kashiwagi et al., 2002; Ohtsuka et al., 2001) ; la constante de vitesse de la réaction de couplage est plus élevée ; et la spécificité de substrat au niveau du donneur est moins stringente. En effet, il a été démontré que l'enzyme était capable de catalyser le couplage

entre une glutamine et un groupement 5-amino-pentyle, qui correspond à la chaîne latérale d'une lysine, et plus généralement une amine primaire (Gundersen et al., 2014; Pasternack et al., 1997). La première transglutaminase microbienne a été isolée de la souche *Streptomyces mobaraensis* (anciennement connue sous le nom de *Streptoverticillium mobaraense*) (Ando et al., 1989) et sa structure a été caractérisée (Kanaji et al., 1993). Par la suite l'abréviation TG sera utilisée uniquement pour désigner la transglutaminase microbienne provenant de cette espèce, sauf mention contraire. Celle-ci est la mieux caractérisée des TG microbiennes. Son rôle biologique n'est pas complètement connu, mais elle est supposée protéger *S. mobaraensis* contre des protéases en liant entre elles des protéines inhibitrices. Actuellement, cette TG recombinante est produite chez *E. coli* et commercialisée. Les résidus Cys64, Asp255 et His274 ont été prédits comme constituant sa triade catalytique (Kashiwagi et al., 2002). C'est cette cystéine qui est impliquée dans la formation du complexe acyle-enzyme lors de la première étape de son mécanisme (Figure 14).

Au niveau de la glutamine, la TG est beaucoup plus stringente qu'au niveau de la lysine car toutes les glutamines d'une protéine ne peuvent pas être dérivées. La TG microbienne est donc devenue un outil de couplage site-spécifique sur les protéines. Des études de la spécificité du substrat ont été réalisées sur des peptides (synthétiques ou présentés par des phages ou des ARN messagers) et des protéines. Il est apparu que les TG microbiennes et mammifères n'ont pas les mêmes spécificités. De nombreuses séquences, parfois très différentes, ont ainsi été décrites comme des substrats potentiels et sont résumées de façon non exhaustive dans le Tableau 6.

Malgré un grand nombre de glutamines exposées à la surface des protéines, seules celles qui se trouvent également dans un environnement flexible ou au niveau d'un dépliement local seront accessibles et attaquées par la TG (Fontana et al., 2008; Mero et al., 2009). Il apparaît donc que pour être dérivée par la TG, une glutamine doit :

- 1) se trouver dans une région flexible ou désordonnée, de la même façon que les sites de clivages par les protéases (Spolaore et al., 2012).
- 2) être entourée de résidus appropriés pouvant interagir avec la Cys64 du site actif de l'enzyme pour former l'intermédiaire thioacycle.

La TG a ainsi été utilisée pour conjuguer de façon site-spécifique des protéines avec des molécules d'ADN, des drogues, des radionucléides, d'autres protéines, ou encore des polymères comme le PEG. Par exemple, des VHH ont pu être dimérisés donc rendus plus actifs grâce à l'insertion d'un S-tag à leur extrémité C-terminale (Tableau 6). Ce S-tag contient une glutamine acceptrice et deux lysines donneuses qui sont couplées par la TG (Plagmann et al., 2009). Grâce à cette même technique, un scFv a été couplé à la phosphatase alcaline (Takazawa et al., 2004).

Type de substrat	Protéine	Séquence	Référence
Peptides	Phage display	Ac-WALQRPH-NH2 WALQRPYLTES WALQRPHYSYPD WSPIPQMRVPP NPKIYPMQGWV YELQRPYHSELP	Sugimura et al., 2008
	mRNA display	RLQQP RTQPA	Lee et al., 2013
	Peptides synthétiques	LQSP	Caporale et al., 2015
Protéines	α-lactalbumine hGH hIL2 Apomyoglobine	TEYGLFQINNDS IPKEQKYSF VLNLAQSKNFH ELKPLAQSHATH	Fontana et al., 2008
	Filgrastime	APALQPTQGAM	Mero et al., 2009
Anticorps	VHH (S-tag)	KETAAAKFERQHMS	Plagmann et al., 2009
	IgG1 humaine aglycosylée	PWEEQYNST	Jeger et al., 2010
	IgG humaine (Qtag)	LLQG	Strop et al., 2013
	IgG1 humaine (MTG-tag)	GECTYFQAYGCTE	Siegmund et al., 2015
	Fab (c-myc tag)	EQKLISEEDL	Dennler et al., 2015

Tableau 6 : Résumé des différents substrats reconnus par la TG microbienne. En rouge : glutamine dérivée par l'enzyme. hGH : hormone de croissance humaine. hIL2 : interleukine 2 humaine.

Un grand nombre de glutamines sont présentes dans les IgG (environ 60 dans les IgG1 humaines). Beaucoup d'entre elles sont exposées à la surface de la protéine mais une étude a montré que seulement une ou deux biotines-cadavérine pouvaient être couplées sur une

IgG murine (Josten et al., 2000). Cependant, ils n'ont pas déterminé si cette conjugaison était site-spécifique ou s'il s'agissait de conjugaisons sur plusieurs sites en faible quantité.

A l'inverse, plusieurs études ont plus récemment montré que dans ces conditions, aucune glutamine naturellement présente sur un anticorps glycosylé n'était réactive vis à vis de substrats aminés lors d'une catalyse par la TG. L'anti-L1-CAM chCE7 et le rituximab (anti-CD20 commercial) (Jeger et al., 2010), ainsi qu'un anti-EGFR, un anti-HER2 et un anti-protéine M1S1 (Strop et al., 2013) n'ont pas été modifiés par la TG. Dans une autre publication, la TG n'a pas permis la dérivation du cetuximab par une cadavérine, même en rajoutant un surfactant anionique permettant de rendre accessible toutes les glutamines enfouies (Siegmund et al., 2015).

En revanche, si le sucre de l'asparagine 297 est absent suite à une mutation de ce résidu ou suite à une déglycosylation *in vitro*, la conjugaison sur la glutamine 295 devient possible. Ceci s'explique par le fait que l'absence de glycosylation entraîne une plus grande mobilité de la boucle C'E (Q295-T299) qui va rendre accessible cette glutamine auparavant masquée par le glycane (Feige et al., 2009). Deux chélateurs de métaux par anticorps ont pu être couplés de façon quasi quantitative niveau des Q295 du chCE7 et du rituximab déglycosylés. Les radioconjugués obtenus par la suite permettent un meilleur ciblage tumoral chez des souris xénogreffées par rapport aux radioconjugués obtenus par couplage chimique (Jeger et al., 2010). La déglycosylation a également été utilisée pour coupler de façon quantitative et spécifique la MMAE au trastuzumab. L'ADC permet d'obtenir une IC₅₀ 10 fois plus faible que l'anticorps seul lors d'un test de prolifération cellulaire (Dennler et al., 2014). Au lieu de déglycosyler, il est possible de produire un anticorps aglycosylé portant une mutation N297X pour dériver les Q295 (Bregeon et al., 2013). Avec la mutation N297Q, 2 sites de conjugaison supplémentaires sont introduits ce qui conduit à 4 sites de conjugaisons potentiels. Différents composés chélateurs ont ainsi été greffés sur le chCE7 avec un DAR de 4 (Jeger et al., 2010), tout comme la MMAE sur un anti-CD30 (Lhospice et al., 2015). Cet anti-CD30 MMAE donne des résultats prometteurs au niveau de son efficacité *in vitro* et *in vivo* et sa stabilité plasmatique quand il est comparé à l'Adcetris® qui a un DAR d'environ 4 mais contient 8 sites de conjugaison potentiels.

Ainsi, il n'est pas possible d'utiliser la transglutaminase pour procéder à des couplages sur un anticorps lorsqu'il est glycosylé. Cette glycosylation a un rôle important dans le recrutement des FcγR, mais dans le cas des ADC, cette absence d'interaction avec le système immunitaire peut être un avantage. Pour dériver un anticorps sans affecter cette glycosylation et cibler d'autres positions, on peut insérer un tag appelé glutamine tag (Gln tag, Qtag). Suite à un screening peptidique, la séquence LLQG a été décrite comme étant un substrat de la TG

microbienne. Elle a été insérée sur l'analogue de la chaîne B de la monelline et a permis son couplage avec la chaîne A contenant une lysine pour reconstituer un analogue simple brin (Ota et al., 1999). Un grand nombre de peptides dérivés de cette séquence LLQG ainsi que d'autres précédemment décrits comme étant des substrats de la TG ont été greffés dans plusieurs régions de deux IgG1 : aux extrémités des chaînes, et dans des régions dont la surface est accessible (Strop et al., 2012). C'est le tag LLQG qui a donné les meilleurs résultats. Il a été testé sur 90 sites d'un anti-EGFR. Parmi eux, 12 sites ont donné un bon degré de conjugaison. En particulier l'extrémité C-terminale de la chaîne lourde (tag LLQGA) et l'extrémité C-terminale de la chaîne légère (tag GLLQGA) ont été conjuguées par la drogue monométhylauristatine D (MMAD) de façon homogène avec des DAR d'environ 2 (Strop et al., 2013). Cette technologie est aussi applicable sur les IgG2 et 4. Le même groupe a aussi couplé l' amino-PEG₆-C2-MMAD avec des DAR de 2, 4, 6 et 8 sur un anti-M1S1 en combinant les couplages sur Q295, N297Q et aux extrémités C-terminales des chaînes (Strop et al., 2015). La spécificité des conjugaisons a à chaque fois été confirmée par digestion des ADC et LC/MS. Lorsque l'anticorps est glycosylé, seul le Qtag est dérivé mais il y a environ 1% de conjugaison sur la Gln295, car la glycosylation n'est pas présente sur 100% des molécules d'anticorps. Ce produit secondaire peut-être évité en utilisant un mutant Q295N (Farias et al., 2014).

Très récemment, la chaîne lourde du cetuximab a également été dérivée de façon spécifique en introduisant une séquence identifiée comme étant un substrat de la TG présente naturellement sur la protéine DAIP qui déclenche l'autolyse de métalloprotéases neutres (Siegmund et al., 2015). Cette séquence GECTYFQAYGCTE est assez différente de celles obtenues par screening de peptides. De plus, elle possède deux cystéines car leur appariement est supposé mimer la boucle présente au sein de la DAIP en rigidifiant la structure.

Enfin, le peptide c-myc a aussi été décrit comme une alternative au Qtag sur le Fab anti-protéine d'activation des fibroblastes, un nanobody et un affibody. Il a été introduit en C-terminal et dérivé par une grande variété d'amines primaires contenant les fonctionnalités suivantes : biotine, fluorophore, chélateur de radioisotopes, amine couplée sur une surface, et fonction chimique de chimie click (Dennler et al., 2015).

Les différents couplages effectués sur les anticorps sont résumés dans la Figure 15.

La transglutaminase a donc été utilisée pour coupler des drogues, des chélateurs et des peptides sur des anticorps au niveau de glutamines particulières en utilisant des conjugués possédant la fonction 5-aminopentyle ou plus généralement amine primaire, et ceci de façon quasi quantitative. Il aurait pu être envisageable de coupler un conjugué de type glutamine au niveau d'une lysine de l'anticorps. Ceci n'est pas appliqué pour 3 raisons. Premièrement, la

TG peut catalyser le couplage entre une glutamine et un grand nombre d'amines, ce qui élargit le champ des conjugués utilisables. Ensuite, les lysines étant souvent situées en surface des anticorps, rien ne prouve que la transamidation aurait pu être spécifique d'une lysine située au sein d'une séquence particulière et/ou dans une région localement dépliée. A ce jour, il a seulement été montré qu'un substrat contenant une glutamine pouvait être couplé sur une/plusieurs lysine(s) du chCE7 sauvage ou aglycosylé à hauteur de 0.3 à 0.5 molécule par anticorps, mais la position et l'homogénéité de ce couplage n'ont pas été étudiées (Mindt et al., 2008). Enfin, lorsque le substrat ZGlnGlyOH, connu pour être reconnu par la TG, est mis en présence du chCE7 aglycosylé, une déamidation de la glutamine a lieu au lieu de la transamidation attendue. Le substrat ZGluGlyOH devient alors irréversiblement non réactif (Jeger, 2009).

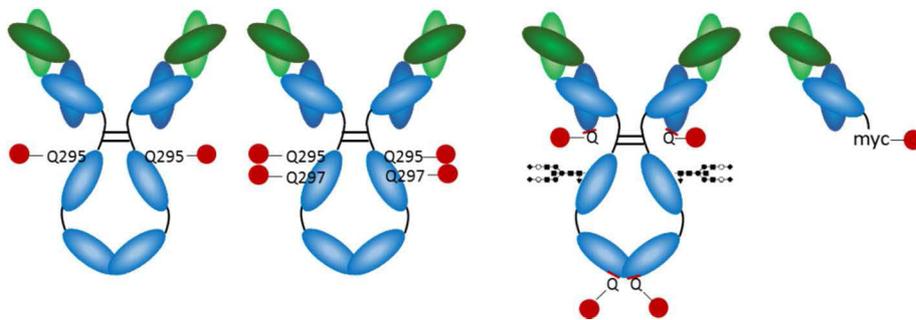


Figure 15 : Les différents sites de conjugaisons par la TG sur les anticorps. Les traits rouges représentent les Qtag introduits aux extrémités C-terminales.

4. Couplages sur des fonctionnalités extrinsèques

Ce type de couplage permet l'introduction d'une fonctionnalité absente des chaînes des acides aminés sur un ou plusieurs site(s) spécifique(s). La plupart du temps, la spécificité sera propre au résidu N-terminal ou propre à une séquence protéique particulière qui sera reconnue par une enzyme par exemple. Généralement cette nouvelle fonctionnalité sera suivie d'une seconde étape de couplage de la protéine avec de petites molécules ou avec une autre protéine.

a. Aldéhydes et cétones

Les aldéhydes et les cétones font partie des premières fonctionnalités extrinsèques à avoir été explorées. Même s'ils ne sont pas complètement abiotiques et sont présents dans certains métabolites intracellulaires, ils sont facilement synthétisables et leur petite taille réduit le risque de perturber la structure protéique dans laquelle ils seront introduits.

i. Incorporation *in vitro* en N-terminal

Deux grandes familles de modifications ont été appliquées pour introduire un aldéhyde ou une cétone en N-terminal de protéines : l'oxydation au périodate d'une sérine ou d'une thérone et la transamination biomimétique.

A l'origine, la transamination est une réaction d'échange de la fonction amine primaire entre un acide aminé et un α -cétoacide catalysée par la transaminase. Cette réaction peut s'observer sans enzyme avec différents aldéhydes qui remplacent l' α -cétoacide. Parmi plusieurs aldéhydes testés, le pyridoxal-5'-phosphate (PLP), coenzyme des transaminases, donne la conversion la plus efficace sur l'angiotensine (Gilmore et al., 2006). En l'absence d'enzyme, la transformation peut avoir lieu sur n'importe quel résidu N-terminal d'une protéine. La première étape de la réaction est une condensation de l'aldéhyde du PLP avec le groupement amine pour former une imine. Le pH du proton en alpha de l'amine N-terminale est beaucoup plus faible que celui du proton en alpha de l' ϵ -amine des lysines. Il y a donc un équilibre de tautomérisation uniquement à cette position, ce qui rend la transamination par le PLP spécifique du N-terminal. Ceci a été confirmé par digestion puis analyse des fragments en spectrométrie de masse. Il se produit ensuite une hydrolyse de la nouvelle imine formée qui conduit à la formation de pyruvamide (Figure 16A). Ce pyruvamide va alors pouvoir être dérivé avec une hydrazine substituée pour former une hydrazone ou par une hydroxylamine pour former une oxime (Figure 16B). La structure de la protéine demeure intacte après cette modification à son extrémité (Gilmore et al., 2006).

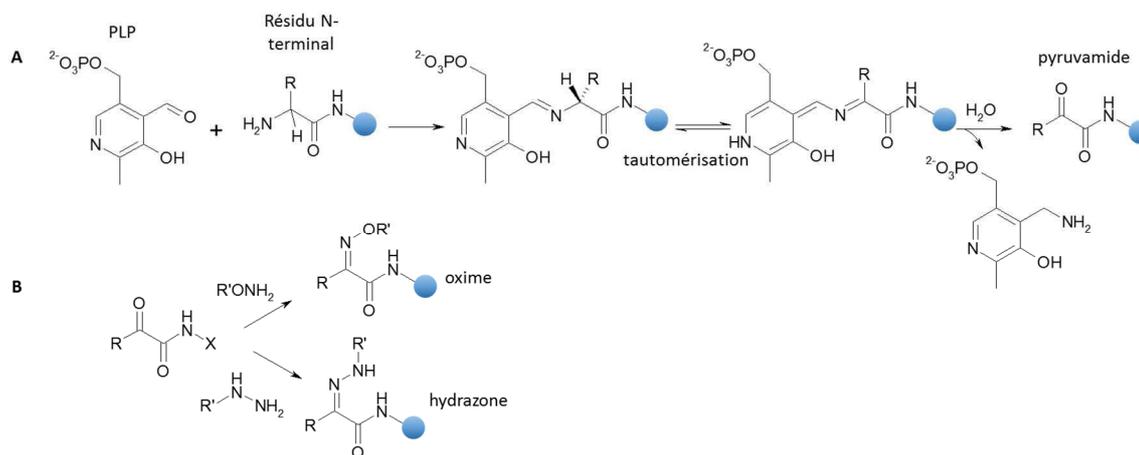


Figure 16 : Dérivation de l'extrémité N-terminale d'une protéine par le PLP. A) mécanisme de la réaction de transamination par le PLP. 1^{ère} étape : formation d'une imine. 2^{ème} étape : équilibre de tautomérisation. 3^{ème} étape : hydrolyse en pyruvamide. B) Formation d'une hydrazone ou d'une oxime à partir du pyruvamide par couplage respectivement avec une hydroxylamine et une hydrazine.

La liaison oxime a été utilisée à plusieurs reprises en guise de linker ou de moyen de détection de protéines car la réaction a un bon rendement, et la liaison est plus stable que l'hydrazone dans des conditions physiologiques (Kalia and Raines, 2008). Ainsi, le groupe de Gilmore a pu attacher des polymères PEG à l'extrémité de plusieurs protéines. Une IgG murine anti-FLAG ainsi que le fragment Fab correspondant ont aussi été dérivés par le PLP sur leurs chaînes lourdes et légères puis couplés avec une hydroxylamine contenant un fluorophore, un PEG ou une biotine sans affecter leur capacité de liaison à l'antigène (Scheck and Francis, 2007).

Pour supprimer les co-produits formés lors de la dérivation de certains résidus N-terminaux (comme la décarboxylation de l'acide aspartique) et améliorer les rendements de conversion, une librairie térapeptidique de type XKWA a été créée avec les 20 acides aminés naturels en N-terminal. Les peptides commençant par une alanine ont donné les meilleurs rendements de formation d'oxime avec peu de produits secondaires. Les résultats de dérivations sur des protéines sont en accord avec les dérivations sur les térapeptides (Scheck et al., 2008). L'efficacité du PLP dépend aussi du deuxième et troisième résidus N-terminaux. Les séquences les plus réactives ont été déterminées par screening combinatoire d'une librairie constituée de peptides de 8 résidus (Witus et al., 2010). Les séquences de type AKX et AXK donnent les meilleurs rendements, jusqu'à environ 90% (Figure 17A). L'extrémité AKT a alors été introduite sur les protéines AFP (alpha-fœtoprotéine) et GFP (*green fluorescent protein*) et conduit à une plus grande efficacité de formation d'oxime totale comparée aux extrémités naturelles. Parmi cette oxime totale se trouvent l'oxime désirée et les adduits aldol-PLP et oxime-PLP (Figure 17B).

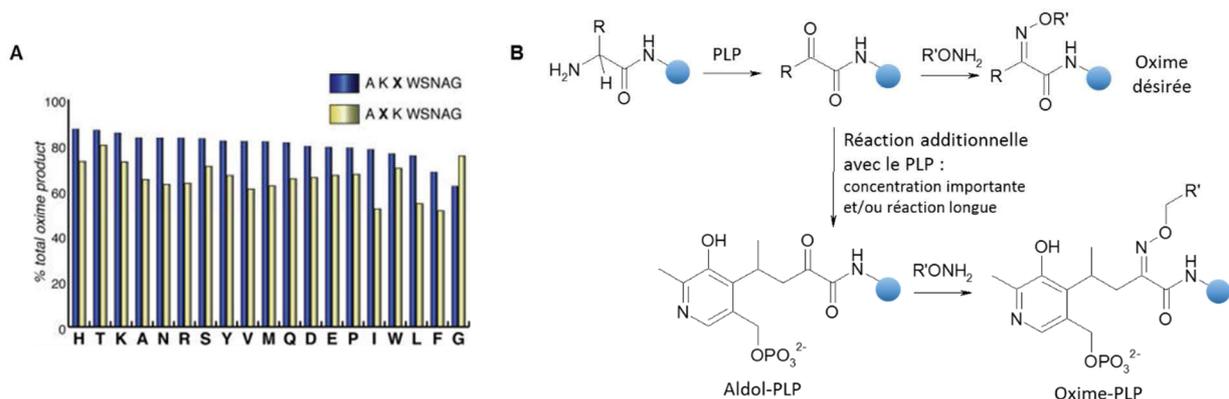


Figure 17 : A) Influence de la nature du deuxième et du troisième résidu lors du couplage au PLP. Le rendement correspond au pourcentage de formation d'oxime suite à la dérivation de peptides de séquences AKXWSNAG et AXKWSNAG par le PLP (10mM, 18h, 37°C) et au couplage de benzyl-hydroxylamine (250mM, 3h). Figure issue de Witus et al., 2010. B) Produits secondaires potentiellement formés lors de la dérivation au PLP.

ii. Incorporation *in vivo*

Il est possible d'introduire des acides aminés non naturels dont la chaîne latérale est un aldéhyde ou une cétone, comme la p-acétylphenylalanine. Pour cela, le code génétique est étendu en introduisant dans la cellule une paire ARN de transfert/aminoacyl-ARNt synthétase génétiquement modifiés capable de synthétiser ces acides aminés modifiés lorsqu'elle reconnaît un codon particulier au sein de l'ARN messager. Cependant, cette stratégie est complexe à mettre en oeuvre et le rendement de production d'anticorps a tendance à être affecté de façon non négligeable (Axup et al., 2012).

La fonction aldéhyde peut être introduite dans une protéine suite à l'oxydation d'une cystéine ou d'une sérine en formylglycine (fGly) catalysée par l'enzyme appelée FGE (*Formylglycine Generating Enzyme*). La formation de fGly est une modification décrite comme co- ou post-traductionnelle, qui a lieu avant le repliement de la protéine. Pour cela, la cystéine ou la sérine doit être contenue dans la séquence (C/S)XPXRXXXLTGR. On trouve des modifications de cystéines chez les eucaryotes et les microbes aérobies et des modifications de cystéines ou de sérines chez les microbes anaérobies (Berteau et al., 2006; von Figura et al., 1998).

Cette modification est essentielle à l'activité des sulfatases de type I car la cystéine transformée est située dans le site catalytique de ces enzymes. L'absence de fGly due à un déficit en FGE est responsable d'une pathologie : le *déficit multiple en sulfatases* (DMS) ou *maladie d'Austin* (Schmidt et al., 1995). C'est dans le cadre d'études sur cette maladie que le gène SUMF1 (*Sulfatase-Modifying Factor 1*) a été identifié comme codant la FGE humaine (Cosma et al., 2003; Dierks et al., 2003). Chez *E. coli*, il existe une activité *FGE-like* mais l'enzyme responsable de la formation de fGly est encore non définie (Dierks et al., 1998). D'autres FGE procaryotes ont également été établies comme responsables de la maturation des sulfatases. C'est le cas de *Mycobacterium tuberculosis* dont le gène Rv0712 a été identifié comme codant pour la FGE de cet organisme (Carlson et al., 2008).

La FGE reconnaît ses substrats uniquement grâce à leur séquence primaire car les séquences natives reconnues par l'enzyme se trouvent enfouies dans les sulfatases. Elle a donc été utilisée comme outil de bioconjugaison après introduction de la séquence consensus au sein de protéines hétérologues. Au départ, la séquence de 13 acides aminés LCTPSRGSLFTGR présente dans les sulfatases de *M. tuberculosis* a été introduite aux extrémités de protéines exprimées chez *E. coli*. Cette séquence a été reconnue par la pseudo-FGE d'*E. coli*. La séquence réduite LCTPSR contenant uniquement 6 résidus conservés entre les sulfatases de différentes espèces a aussi été reconnue (Carrico et al., 2007). Cependant, l'activité *FGE-like* chez *E. coli* étant relativement limitée et saturée lors de l'expression de protéines recombinantes, la FGE issue de *M. tuberculosis* a été surexprimée par co-transformation des

bactéries. Ceci a permis d'augmenter les rendements de conversion et d'obtenir jusqu'à 99% de conversion de la Cys présente dans la séquence LCTPSR en fGly. Cette séquence LCTPSR, appelée désormais aldéhyde tag, est donc suffisante et peut être introduite en N- ou C-terminal d'une protéine (Carrico et al., 2007). C'est cette séquence qui sera utilisée dans les études suivantes, de même que la FGE de *M. tuberculosis* sera surexprimée dans toutes les études où la protéine à dériver est produite chez *E. coli*. En effet, la spécificité de cette FGE n'est pas stricte et plusieurs positions de la séquence peuvent être substituées par une alanine tout en conservant la même conversion en fGly (Rush and Bertozzi, 2008).

La formylglycine a également pu être introduite dans des protéines produites en cellules eucaryotes dès 2009 car la FGE humaine est naturellement localisée dans le réticulum endoplasmique (Wu et al., 2009). Comme chez *E. coli*, une meilleure conversion en fGly est obtenue en co-transfectant le gène SUMF1 codant pour la FGE humaine, et la séquence LCTPSR est suffisante à la reconnaissance par la FGE (bien que la séquence de 13 acides aminés issues de l'arylsulfatase A humaine donne de meilleurs rendements). De plus, la présence de l'aldéhyde tag dans une protéine conduit aux mêmes rendements de production que sa forme sauvage. Les rendements de conversion en fGly sur la séquence LCTPSR sont cependant globalement moins bons que chez *E. coli* : environ 45% lorsque la FGE est co-transfectée de façon transitoire et environ 65% lorsqu'elle l'est de façon stable.

L'aldéhyde tag a donc été utilisé pour plusieurs applications de bioconjugaison : PEGylation (Carrico et al., 2007), couplage de sondes permettant la détection de protéines membranaires ou cytosoliques (Shi et al., 2012; Wu et al., 2009), immobilisation de protéines sur des surfaces (Cho and Jaworski, 2014; Kwak and Jaworski, 2013), glycosylation artificielle (Hudak et al., 2011), couplage de molécules d'ADN (Liang et al., 2014).

En particulier, l'aldéhyde tag a permis, en association avec d'autres techniques de conjugaison, des modifications sur des anticorps :

- conjugaison d'un peptide FLAG en N- ou C-terminal du fragment Fc d'une IgG murine (Wu et al., 2009),
- biotinylation C-terminale d'une IgG entière (Wu et al., 2009),
- formation d'hétérodimères entre le C-terminal de la chaîne lourde d'une IgG entière et la hGH ou la MBP (Hudak et al., 2012)
- couplage de la maystansine sur le trastuzumab au niveau du CH1, du CH2, du CH3, de l'extrémité C-terminale de la chaîne lourde, ou du domaine kappa la chaîne légère (Drake et al., 2014)
- glycosylation du fragment Fc d'une IgG humaine par substitution de l'Asn297 et des résidus suivants par un aldéhyde tag (Smith et al., 2014)

iii. Couplages sur les aldéhydes et cétones

Comme mentionné précédemment, les aldéhydes et cétones peuvent être couplés spécifiquement avec des hydrazines et des hydroxylamines à pH légèrement acide (4 à 6) pour former respectivement des hydrazones et des oximes (Figure 16B). La liaison oxime est plus stable que l'hydrazone dans des conditions physiologiques (Kalia and Raines, 2008), mais elle peut être en partie hydrolysée à long terme. Cette hydrolyse, même en faibles proportions, est incompatible avec le couplage de drogues pour générer des ADC car la drogue ne doit pas être libérée avant d'atteindre sa cible. Les ligations de Pictet-Spengler et Hydrazino-Iso-Pictet-Spengler (HIPS) ont donc été développées. Elles mettent en œuvre un aldéhyde et une hydroxylamine ou une hydrazine fonctionnalisées avec un cycle indole (Figure 18). Le second cycle formé est décrit comme stable à pH neutre (Agarwal et al., 2013a, 2013b). C'est cette ligation HIPS qui a permis le couplage de la maytansine sur différentes positions du trastuzumab. L'ADC obtenu a une meilleure stabilité dans le sérum, des propriétés pharmacocinétiques améliorées, une efficacité équivalente voire améliorée et un meilleur profil de tolérance que l'ADC classique obtenu par conjugaison aléatoire sur les lysines (Drake et al., 2014).

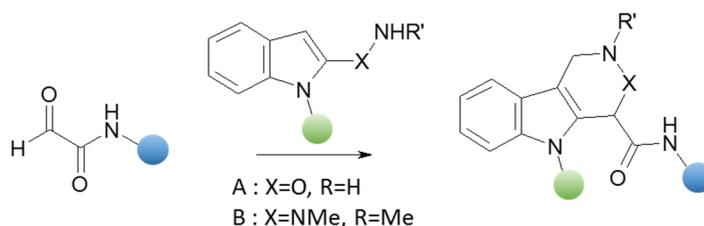


Figure 18 : Ligations de Pictet-Spengler. A) Pictet-Spengler classique. B) Hydrazino-Pictet-Spengler.

Lors d'un couplage direct d'une molécule ou d'une protéine au niveau de l'aldéhyde ou de la cétone précédemment introduite, il peut y avoir des problèmes d'encombrement. Une alternative est de coupler un linker bi-fonctionnel plus ou moins long pour espacer les 2 moitiés à coupler. Par exemple, des linkers hydroxylamine azide ou hydroxylamine cyclooctyne contenant différents nombres de PEG ont été utilisés pour coupler une IgG entière avec la hGH ou la MBP par chimie click (voir la partie Azides ci-dessous) (Hudak et al., 2012).

b. Azides

L'azide (ou azoture) est un groupement stable en conditions physiologiques, absent des molécules naturelles et non réactif vis à vis des fonctionnalités biologiques (Griffin, 1994). Il est donc un choix pertinent pour les conjugaisons bio-orthogonales. Il a également l'avantage d'être petit, peu polaire, et incapable d'être impliqué dans des liaisons hydrogènes. Il est ainsi peu probable que son introduction dans une protéine, et en particulier dans un anticorps,

change sa structure et ses propriétés. Par ailleurs, les azides ont permis la détection de biomolécules dans des systèmes cellulaires voire des animaux (McKay and Finn, 2014).

i. Ligation de Staudinger

La réaction de Staudinger a été la première réaction bio-orthogonale décrite. Elle a été découverte en 1919. A l'origine, elle correspondait à la réduction d'un azide en amine primaire par une triphénylphosphine (Figure 19A). L'ajout d'un groupement méthylester sur un phényle de cette phosphine permet de passer par un intermédiaire cyclique qui après hydrolyse aboutira à la création d'une liaison amide (Figure 19B). Cette réaction développée par le groupe de Bertozzi est appelée ligation de Staudinger (Saxon and Bertozzi, 2000). Une version où l'oxyde de phosphine est éliminé du produit final par hydrolyse a été développée (Figure 19C). Elle est appelée *traceless Staudinger ligation* (Saxon et al., 2000). Cette ligation a permis de dériver des biomolécules de façon sélective dans des cellules vivantes mais aussi dans des animaux (Prescher et al., 2004). Cependant, la ligation de Staudinger n'a pas pu être appliquée pour pré-cibler une tumeur avec un anticorps-azide et combiner un radionucléide phosphine dans le but de concentrer les radiations dans cette zone tumorale. En effet, un produit secondaire s'est formé avec la phosphine chez la souris (Vugts et al., 2011). De plus, phosphines ont tendance à s'oxyder facilement dans les systèmes biologiques, et cette réaction reste plutôt lente, ce qui complique les bioconjugaisons *in vivo*.

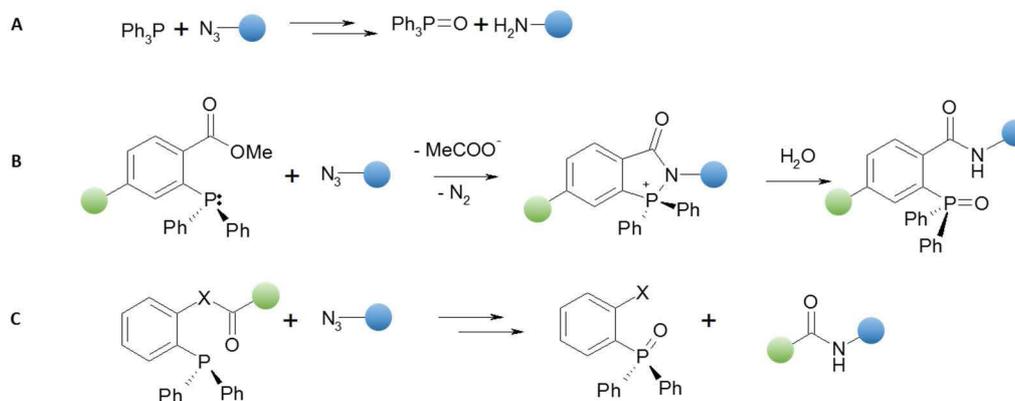


Figure 19 : Réactions de Staudinger. A) Réduction de Staudinger d'un azide en amine primaire. B) Ligation de Staudinger permettant l'addition de deux molécules par création d'une liaison amide. C) Ligation de Staudinger sans oxyde de phosphine sur le bioconjugué. X représente un soufre ou un oxygène.

ii. Chimie click catalysée au cuivre

Les cycloadditions [3+2] (également appelées cycloadditions 1,3-dipolaires) entre les azides et les alcynes aboutissant à la formation d'un mélange de triazoles disubstituées (Figure 20A) ont été découvertes par Michael à la fin du 19^{ème} siècle (Michael, 1893) puis étudiées plus en détail par Huisgen (Huisgen, 1963). Tout comme les azides, les alcynes sont des groupements

absents des systèmes biologiques et de petite taille. Ces cycloadditions lentes nécessitent de travailler à haute température ou pression pour obtenir de bons rendements de formation du triazole, ce qui n'est pas envisageable pour des réactions sur des biomolécules. Dans les années 2000, les groupes de Sharpless et Medal ont découvert que la catalyse au cuivre(I) augmentait énormément la vitesse de réaction en solution aqueuse avec des alcynes terminaux (Rostovtsev et al., 2002; Tornøe et al., 2002). Cette réaction est régiosélective et est appelée CuAAC pour *copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition* (Figure 20B). Le terme de chimie click est alors apparu. Pour être désignée par cette appellation, une réaction doit être « modulaire, avoir un champ d'application étendu, donner de très hauts rendements, générer seulement des coproduits inoffensifs pouvant être éliminés par des méthodes non chromatographiques et être stéréospécifique, mais pas nécessairement énantiosélective ». Elle doit également pouvoir fonctionner « dans des conditions simples, avec des réactifs facilement accessibles », et former un produit stable en conditions physiologiques (Kolb et al., 2001).

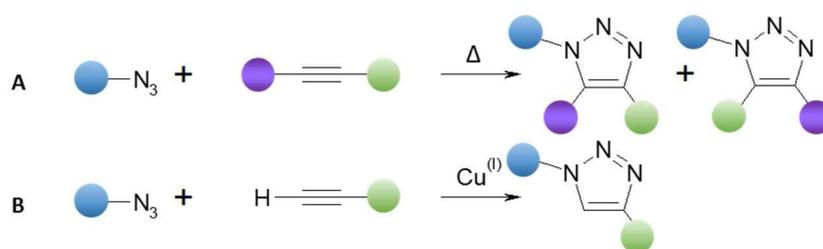


Figure 20 : Cycloadditions [3+2] entre un azide et un alcyne. A) Réaction d'Huisgen conduisant à la formation de deux régiomères. B) Réaction de chimie click catalysée au cuivre (CuAAC) avec un alcyne terminal conduisant à la formation d'un unique régiomère.

La CuAAC a par exemple été utilisée pour coupler un Fab anti-HER2 contenant un alcyne terminal avec une porphyrine azide. L'alcyne a été introduit par une réaction précédemment mentionnée : le pont disulfure intrachaine est réduit puis les cystéines sont pontées par un dibromomaléimide fonctionnalisé par un alcyne (Bryden et al., 2014).

La constante cinétique de cette chimie click est environ 25 fois supérieure à celle de la ligation de Staudinger (McKay and Finn, 2014). Cependant, elle a été appliquée quasiment seulement *in vitro* à cause de la cytotoxicité du cuivre, qui peut causer des dommages oxydatifs via la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (comme les radicaux hydroxyles) dans des cellules vivantes (Kele et al., 2009). Pour appliquer la CuAAC *in vivo*, il faut ajouter des ligands qui vont accélérer la réaction en protégeant le cuivre de l'oxydation. Ces ligands ont permis de faire de l'imagerie sur des cellules vivantes grâce à des glycanes contenant un alcyne terminal auxquels ont été couplés des fluorophores azide (Hong et al., 2010; Soriano del Amo et al., 2010).

iii. Chimie click sans cuivre

Pour améliorer la biocompatibilité de la chimie click, la catalyse au cuivre a été éliminée et remplacée par des alcynes activés par une tension de cycle. Cette réactivité des alcynes cycliques a été suggérée par Blomquist dans les années 1950 (Blomquist and Liu, 1953) puis décrite une dizaine d'années plus tard comme « explosive » par Wittig et Krebs, qui ont mis en réaction un cyclooctyne et un phénylazide (Wittig and Krebs, 1961). Ces cyclooctynes cycliques n'ont été utilisés en bioconjugaison que bien plus tard par le groupe de Bertozzi (Agard et al., 2004).

Le cyclooctyne est le plus petit cycle stable contenant un alcyne. La contrainte exercée au niveau de cette triple liaison (qui devrait être linéaire) le rend très réactif vis à vis des azides. La tension de cycle est donc suffisante pour se passer de catalyseur et la réaction est appelée SPAAC pour *strain-promoted azide-alkyne cycloaddition* (Figure 21A). Cependant, l'absence de cuivre ralentit la réaction. Pour remédier à ce problème, de nouveaux cyclooctynes ont été développés en greffant des substituants fluor électroattracteurs, en fusionnant des cycles aromatiques pour augmenter la tension angulaire, ou en introduisant différents hétéroatomes dans le cycle (King and Wagner, 2014).

L'azadibenzocyclooctyne ou DBCO (également abrégé par DIBAC ou ADIBO dans la littérature) est un cyclooctyne contenant un azote et fusionné avec deux benzyles (Figure 21B). Il a été synthétisé pour diminuer l'hydrophobicité du dibenzocyclooctyne, son homologue sans azote (Debets et al., 2010; Kuzmin et al., 2010). Il est l'un des cyclooctynes ayant la meilleure constante de vitesse et engendre donc une réaction 100 fois plus rapide que la ligation de Staudinger (King and Wagner, 2014).

La SPAAC n'est pas régiosélective lorsque les cyclooctynes utilisés sont asymétriques. Le bicyclo[6.1.0]nonyne (BCN), un composé symétrique, a été synthétisé pour n'obtenir qu'un régioisomère (Figure 21C). Il a une constante de vitesse du même ordre de grandeur que le DBCO et possède l'avantage d'être plus hydrophile (Dommerholt et al., 2010).

Pour appliquer la SPAAC à la conjugaison site-spécifique sur des anticorps monoclonaux, il est possible d'introduire le groupement azide ou DBCO grâce aux stratégies mentionnées précédemment (couplage sur des fonctionnalités existantes ou extrinsèques) ou d'autres stratégies car il existe un grand nombre de réactifs commerciaux possédant ces groupements.

Différents immunoconjugués ont été obtenus par chimie click. Un radioimmunoconjugué a été obtenu en 3 étapes : introduction d'un galactose modifié par un azide au niveau du glycane tronqué de l'anticorps, conjugaison avec un chélateur DBCO puis ajout du radionucléide. Le conjugué obtenu est stable et réactif *in vitro*, et montre une bonne pénétration tumorale (Zeglis

et al., 2013). Un ADC a ensuite été construit par déglycosylation du trastuzumab, dérivation de la glutamine 295 par une amine azide grâce à la transglutaminase, puis couplage à la MMAE DBCO. Le produit obtenu est homogène et fonctionnel *in cellulo* (Dennler et al., 2014). Le trastuzumab a également été dérivé par la MMAF via l'introduction d'un acide aminé non naturel (Zimmerman et al., 2014). Une autre application a été le couplage d'un fluorophore azide avec un scFv sur lequel un BCN a été préalablement introduit par réaction enzymatique catalysée par une transpeptidase, la sortase A. (Alt et al., 2015).

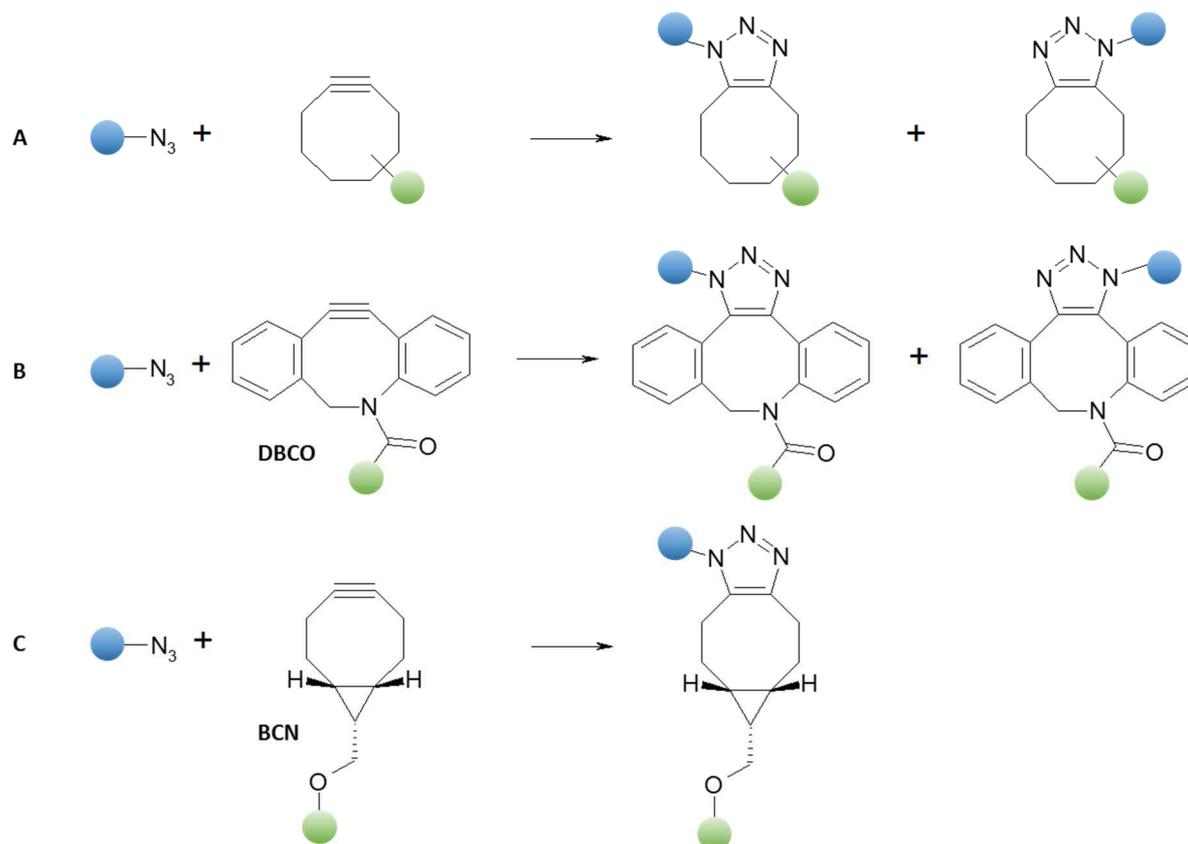


Figure 21 : Réactions de chimie click sans cuivre (SPAAC). Couplage d'un azide avec : A) un cyclooctyne, B) l'azidibenzocyclooctyne (DBCO), C) le bicyclo[6.1.0]nonyne (BCN).

La chimie click a également permis de coupler des protéines entre elles. Une IgG humaine possédant l'aldéhyde tag au niveau du C-terminal de ses chaînes lourdes a été dérivée par une hydroxylamine DBCO. Elle a été couplée en conditions équimolaires à la MBP (*maltose binding protein*) ou la hGH (*human growth hormone*) contenant elles-aussi un aldéhyde tag dérivé par une hydroxylamine azide. Le rendement global de formation (formation de l'oxime puis cycloaddition) est de 70% (Hudak et al., 2012).

La SPAAC requiert de très faibles excès. Un ratio DBCO/azide de 1.25 / 1 peut suffire pour aboutir à un couplage quantitatif en quelques heures à température ambiante (Dennler et al., 2014). En revanche, dériver un résidu de façon site-spécifique de façon directe par les

méthodes chimiques ou enzymatiques précédemment mentionnées nécessite la plupart du temps de plus larges excès. Ainsi, il est possible d'utiliser un grand excès lors de l'étape de fonctionnalisation par l'azide ou le DBCO, puis d'utiliser relativement peu de composé dans la seconde étape. Ceci est avantageux dans le cas de la production à large-échelle d'un ADC par exemple, car cela permet de réduire le coût en utilisant moins de drogue (les linkers permettant l'introduction d'azide ou DBCO sont meilleurs marché) et d'avoir moins de drogue non couplée à éliminer. L'utilisation d'un linker permet également d'augmenter le rendement grâce à ce grand excès et/ou grâce à l'augmentation de sa longueur qui va réduire les interactions stériques entre les protéines à coupler (Hudak et al., 2012).

La chimie click, catalysée ou non, est donc de plus en plus utilisée pour des couplages protéine-petite molécule ou protéine-protéine, surtout depuis les années 2010 (Figure 22). D'autres types de chimie click ont été développées, comme la réaction de Diels-Alder à demande inverse, également appelée ligation tétrazine (Blackman et al., 2008), ou les réactions photo-inductibles (Lim and Lin, 2011). Elles ne seront pas développées ici car nous avons choisi d'utiliser la SPAAC qui a été la plus décrite pour les conjugaisons sur les anticorps monoclonaux.

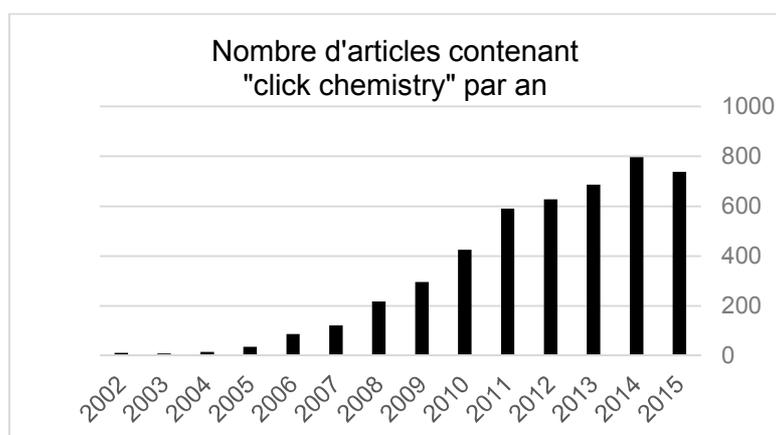


Figure 22 : Nombre d'articles contenant « click chemistry » mis en ligne par an sur la base de données MEDLINE.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Depuis quelques années, les anticorps monoclonaux recombinants jouent un rôle important dans le traitement des cancers grâce à leur spécificité et leur faible toxicité. Les étapes de criblage d'anticorps monoclonaux humains dirigés contre une cible sont les suivantes : des fragments variables au format scFv ou Fab sont sélectionnés pour leur capacité à se lier à l'antigène, fréquemment via une banque de phages. Même si les fragments d'anticorps peuvent être utilisés en cliniques dans certaines pathologies, ils sont dépourvus de l'activité effectrice du fragment constant Fc impliqué dans le recrutement du système immunitaire. A la suite de cette sélection, les candidats scFv sont donc reconstruits sous un format (scFv)₂-Fc se rapprochant des immunoglobulines naturelles. Ce fragment Fc permet également : de dimériser les fragments variables qui ont une faible affinité à cause de leur monovalence et d'augmenter leur demi-vie. Suite à cette reconstruction, les (scFv)₂-Fc sont produits en cellules eucaryotes (généralement HEK ou CHO), purifiés puis testés *in vitro* et *in vivo*.

Un des problèmes de ce type de criblage est la production à large échelle permettant de prouver l'efficacité thérapeutique et l'absence de toxicité dans des études précliniques chez l'animal. La difficulté vient du fait qu'il faut plusieurs litres de culture cellulaire pour produire les quelques milligrammes de (scFv)₂-Fc que l'on souhaite tester. Cela représente un travail important, long et onéreux. De même, si l'on choisit de tester chez l'animal un anticorps entier, il faut reformater ce (scFv)₂-Fc au préalable. Ces contraintes limitent aussi le nombre d'anticorps entrant dans cette phase préclinique.

Le but de ce projet est de démontrer qu'il est possible de construire des mimes d'immunoglobulines (scFv)₂-Fc en associant une production plus simple, rapide et à bas coût chez *E. coli* des scFv et un couplage chimique au fragment Fc qui est commun à tous les clones testés. En levant cette étape limitante, nous pourrions tester plus rapidement et en plus grand nombre les fragments d'anticorps dans des tests fonctionnels chez l'animal. Cela permettra la sélection de fragments d'anticorps sur leur activité en préclinique et non plus comme aujourd'hui sur des propriétés de liaison ou des activités sur des lignées cellulaires. Comme le fragment Fc est très stable, il pourra être produit en très grandes quantités et conservé à long terme. Le Fc de type IgG1 est majoritairement utilisé dans les anticorps thérapeutiques. Cependant, les IgG2 et IgG4 peuvent être utilisés pour avoir un recrutement de cellules immunitaires différentes. On peut donc envisager d'avoir en stock plusieurs Fc qui pourront être utilisés lors de différents criblages. La production indépendante des fragments variables et constants permet ainsi une grande modulabilité car il devient possible de tester rapidement un grand nombre de combinaisons entre des scFv et différents isotypes ou allotypes de Fc (Figure 23).

Nous avons choisi une réaction de chimie click sans cuivre pour coupler les fragments d'anticorps entre eux. Cette réaction est une addition de l'azide et du DBCO (azadibenzocyclooctyne). L'intérêt de cette chimie est son haut rendement, son fonctionnement en milieu physiologique et l'absence complète d'interférence avec les molécules biologiques dans la mesure où l'azide et le DBCO ne réagiront qu'entre eux et pas avec les chaînes latérales des résidus des protéines.

Pour appliquer cette chimie click aux fragments d'anticorps, il faut dériver le scFv sur son extrémité C-terminale et le Fc sur ses extrémités N-terminales, et ceci de façon spécifique. Parmi 5 stratégies de couplage sélectionnées, nous choisirons celle(s) donnant le meilleur compromis entre le rendement et la spécificité.

Les objectifs de cette thèse sont donc : faire la preuve de concept qu'il est possible de coupler un scFv produit en bactéries à un Fc humain par la chimie click, et montrer que ce (scFv)₂-Fc a des effets biologiques comparables au (scFv)₂-Fc produit classiquement, à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Pour cela, nous avons choisi comme modèle le scFv 4D5 correspondant aux parties variables du trastuzumab (Herceptine®) car les effets de cet anticorps *in vitro* et chez l'animal sont bien connus. De plus, ce clone au format Fab a pu être produit avec un très bon rendement en bactéries *E. coli* (Carter et al., 1992). Ce scFv 4D5 sera couplé à un Fc humain d'isotype IgG1, le même que celui du trastuzumab.

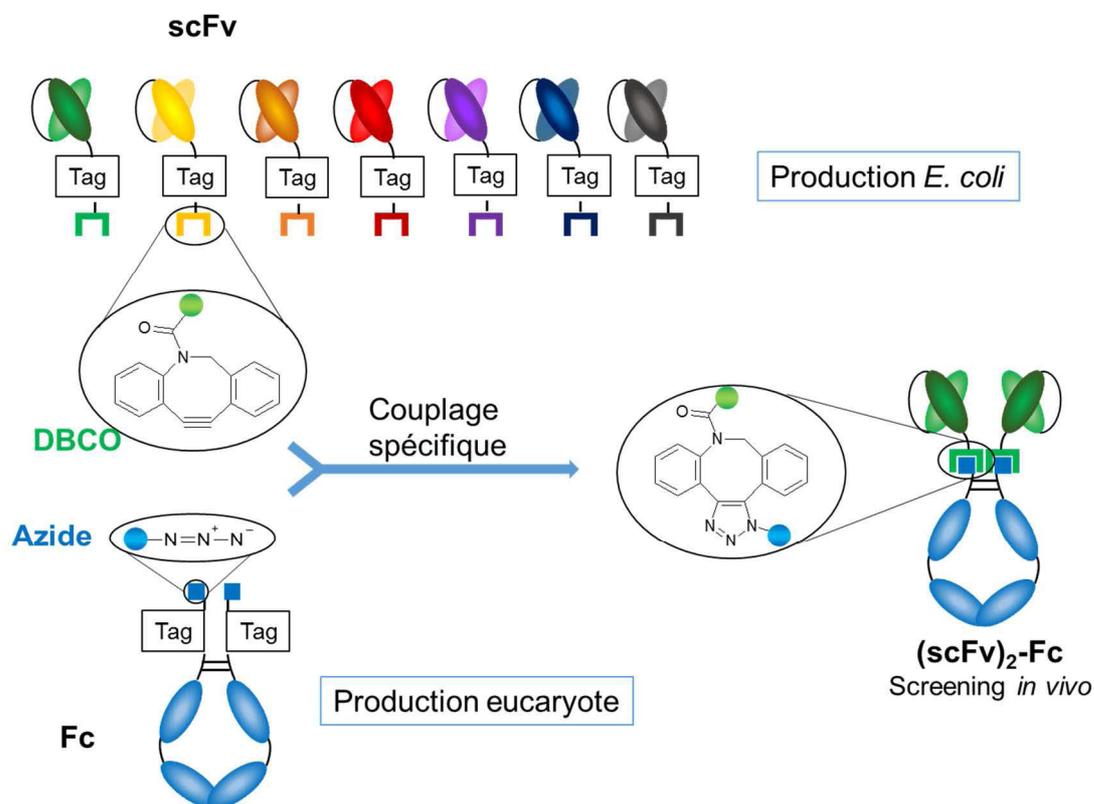


Figure 23 : Principe du screening par chimie click

RÉSULTATS

A. Construction des fragments contenant les tags de chimie click

1. Choix des stratégies de fonctionnalisation pour la chimie click

Nous avons testé cinq stratégies permettant l'introduction d'une fonction azide (N_3) ou azadibenzocyclooctyne (DBCO) ou bicyclo[6.1.0]nonyne (BCN) sur les fragments d'anticorps. Parmi le grand nombre de bio-conjugaisons décrites dans la littérature, nous avons choisi des réactions chimiques ou enzymatiques décrites comme étant site-spécifiques, permettant la dérivation des fragments variables (scFv ou Fab) à leur extrémités C-terminales et du fragment cristallisable (Fc) à ses extrémités N-terminales par des linkers bi-fonctionnels commerciaux. Enfin, ces réactions ont toutes été décrites comme pouvant être appliquées à des anticorps ou à des fragments d'anticorps, bien que la localisation des sites dérivés ne soit pas la même que dans notre cas. Elles sont résumées dans le Tableau 7.

Suivant les composés commerciaux existants, il n'est pas toujours possible d'introduire le groupement DBCO. Les stratégies mettant en oeuvre des cystéines libres (aldéhyde tag et maléimide) n'ont pas été testées sur le fragment Fc ou Fab. En effet, la proximité du tag avec la/les cystéine(s) présente(s) dans la région charnière, respectivement les 2 ponts disulfures inter-chaines lourdes et le pont entre la chaîne lourde et la chaîne légère pourrait causer des problèmes d'appariement.

Type de couplage	Nom de la stratégie	Résidu couplé	Tag introduit (Spécificité)	Fragments dérivables	Fonctionnalité
Chimique	maléimide	Cys	C	scFv	DBCO ou N_3
	PLP	NH ₂ N-terminal	AKT	Fc	N_3
	bis-sulfone	His	HHHHHH	scFv, Fab ou Fc	DBCO ou N_3
Enzymatique	aldéhyde tag	Cys	LCTPSR	scFv	N_3
	transglutaminase	Gln	LLQGA EQKLISEEDL	scFv, Fab ou Fc	DBCO ou N_3

Tableau 7 : Réactions utilisées pour introduire les fonctionnalités de chimie click. Le tag introduit est dérivé au niveau d'un résidu spécifique mentionné en rouge.

2. Construction des vecteurs contenant les tags

Pour des questions pratiques, nous avons choisi de produire un Fc unique contenant les 3 tags que nous souhaitons tester. Pour maximiser la dérivation du résidu N-terminal, les résidus AKT ont été placés à cette extrémité car ils correspondent à la combinaison donnant le meilleur rendement (Witus et al., 2010). La combinaison AKH donne la même efficacité mais

elle n'a été testée que sur des peptides et non appliquée à une protéine complexe, contrairement à AKT. Cette extrémité est suivie d'une étiquette His₆ permettant le couplage de bis-sulfones et la détection par des anticorps anti-polyhistidine. Enfin le tag glutamine LLQGA (Qtag) est placé à la suite de ces histidines car la détection d'une protéine de la taille du Fc par un anti-polyhistidine en western blot sera un moyen simple de s'assurer de la présence de cette séquence. Ce Fc est appelé Fc AKT(H)₆Q. Par la suite, seul(s) le(s) tag(s) donnant un bon couplage et une bonne spécificité seront conservés sur ce Fc. Ces différents tags ont été introduits dans le vecteur d'expression eucaryote pFUSE, qui contient le fragment Fc d'une IgG1 humaine (Figure 24A) (Moutel et al., 2009). Le hinge n'est constitué que de la partie inférieure contenant les 2 ponts disulfures inter-chaines lourdes et ne contient donc pas la cystéine du pont reliant la chaîne lourde à la chaîne légère.

Les scFv et Fab ont quant à eux été introduits dans des vecteurs ne contenant qu'un tag. Le tag His₆ est présent dans toutes les constructions car il est nécessaire pour la purification des fragments par chromatographie d'affinité métallique ainsi que pour leur détection. Les constructions contiennent également le peptide c-myc, qui se trouve dans les vecteurs d'expression bactérienne pET23NN et pAB1 utilisés (Figure 24B et C).

Le Fab 4D5 correspond au Fab' périplasmique décrit par Carter comme pouvant être produit à l'échelle du gramme par litre en fermenteur (Carter et al., 1992). Quelques résidus diffèrent car des sites de restriction ont été introduits aux extrémités du VH et du VL pour éventuellement insérer d'autres clones par la suite. La chaîne légère est d'isotype kappa. Elle est suivie de la chaîne lourde dont le CH1 correspond à une IgG1 et sur laquelle se trouveront les différents tags. Toutes deux sont sous le contrôle d'un seul promoteur.

Les tags ont été insérés dans les vecteurs par insertion d'oligonucléotides hybridés entre un ou deux sites de restriction. Dans les vecteurs pET23NN et pAB1, les différents tags ont été introduits au niveau du site de restriction NotI pour se trouver en 3' du fragment scFv. Dans le vecteur pFUSE, les différents tags ont été introduits entre les sites EcoRI et BglII. Après digestion par ces enzymes, les oligonucléotides hybridés sont introduits par ligation. Ces oligonucléotides obéissent donc aux critères suivants :

- Après hybridation, leurs extrémités sont cohésives pour permettre la ligation dans le vecteur préalablement digéré.
- Le site Not I est reconstitué en 5' du tag et les sites EcoRI et BglII sont reconstitués respectivement en 5' et en 3' du tag.
- Le cadre de lecture doit être conservé.

Les séquences protéiques des fragments d'anticorps ainsi que les schémas des différents vecteurs utilisés au cours de ce manuscrit se trouvent dans la partie Matériels et méthodes.

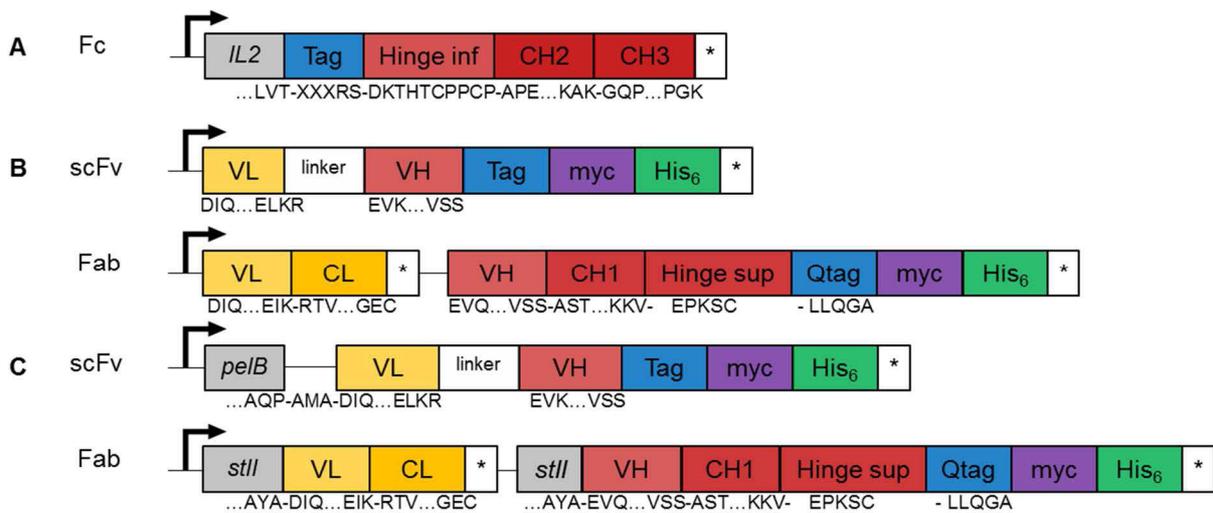


Figure 24 : Schéma des différentes constructions des fragments Fc, scFv et Fab. * représente un codon stop. Hinge inf : portion de hinge présente sur le fragment Fc. Hinge sup : portion de hinge présente sur le fragment Fab. A) Fc en vecteur d'expression eucaryote pFUSE, possédant un tag en N-terminal précédé de la séquence signal interleukine 2 (IL2). B) scFv et Fab en vecteur d'expression cytoplasmique pET23NN possédant un tag en C-terminal suivi des tags c-myc et His6 pour la détection et la purification. C) Mêmes scFv et Fab en vecteur d'expression périplasmique pAB1 précédés respectivement du peptide signal pelB et stII.

B. Production et purification des fragments d'anticorps

1. Fragment Fc

a. Production en cellules eucaryotes et purification

Les différents fragments Fc ont été produits par transfection transitoire de cellules eucaryotes HEK 293T. La séquence signal de l'interleukine 2 permet la sécrétion dans le milieu de culture. Les Fc sont purifiés sur colonne de protéine A par une élution acide en glycine à pH 2.7, puis mis en tampon PBS. Les rendements de production après purification sont de l'ordre de 10 à 20 mg/L de culture. Les Fc obtenus sont purs, ont la taille attendue et contiennent bien le tag His₆ (Figure 25).

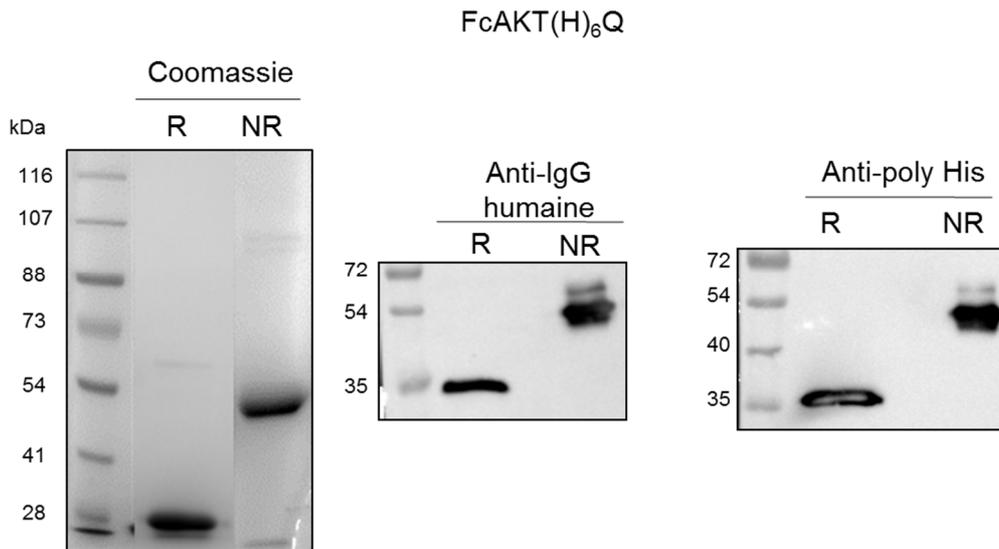


Figure 25 : Dépôt sur SDS-PAGE du Fc AKT(H)₆Q obtenu après purification sur protéine A. NR : non réduit. R : réduit. Coloration au bleu de Coomassie ou détection par western blot (WB) avec un anti IgG humaine spécifique du fragment Fc ou un anti-polyhistidine.

b. Fonctionnalité

La fonctionnalité du Fc AKT(H)₆Q a été confirmée par cytométrie en flux sur les lignées cellulaires monocytaires THP-1 et U-937 exprimant toutes deux les FcγRI et II. Ce Fc est capable de se lier à ces récepteurs à une concentration de 25 µg/mL, soit environ 40 nM (Figure 26). La liaison du fragment Fc aux cellules immunitaires n'est donc pas perturbée par l'introduction d'un tag.

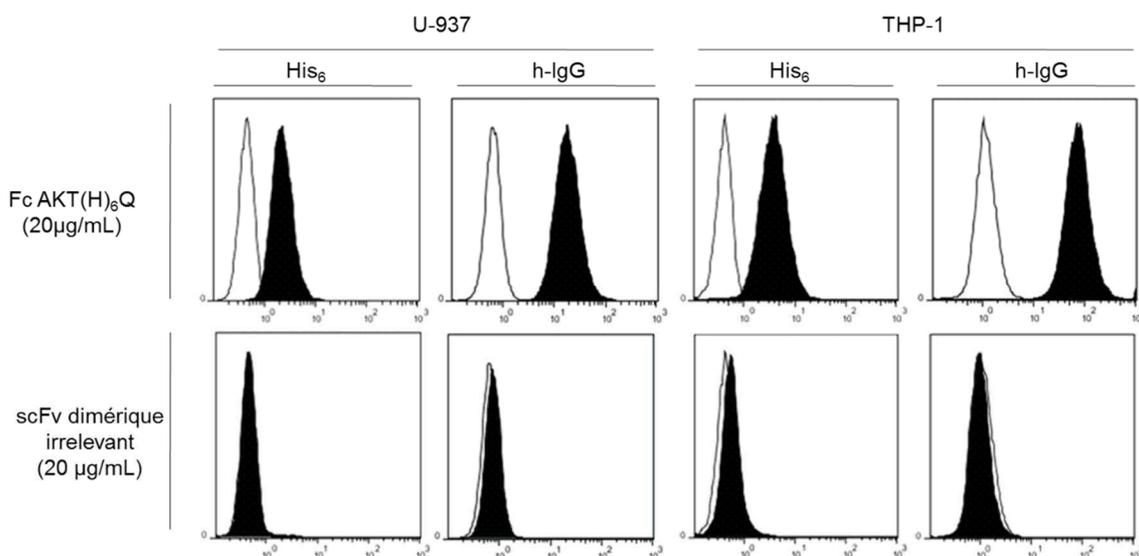


Figure 26 : Liaison du Fc AKT(H)₆Q aux FcγRI et II des lignées U-937 et THP-1 évaluée par cytométrie en flux. La fixation est détectée par un anti-IgG humaine (spécifique du Fc)-FITC ou un anti-polyhistidine-FITC.

2. Fragments scFv

a. Production chez *E. coli* et purification

i Production périplasmique

Le vecteur pAB1 contient un promoteur *lac* et une séquence signal pelB. L'induction à l'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), un analogue du lactose, va donc permettre la sécrétion du scFv dans le périplasma de la souche BL21(DE3). Trois méthodes d'extraction des protéines périplasmique ont été testées : la lyse par choc osmotique, à la polymyxine B et au lysozyme.

Le choc osmotique consiste à utiliser une solution hypertonique contenant du saccharose pour faire gonfler les membranes bactériennes. Une solution hypotonique contenant des ions magnésium va alors libérer le contenu périplasmique (Figure 8).

La polymyxine B est un antibiotique qui perméabilise la membrane externe des bactéries gram-négatives et le lysozyme hydrolyse les peptidoglycanes membranaires. Ces deux composés conduisent donc également à l'obtention du périplasma par la formation de sphéroplastes. Pour obtenir le contenu cytoplasmique (fraction soluble), la lyse peut être poursuivie par congélation des bactéries et resuspension dans une solution contenant du lysozyme et un détergent, le NP-40. Toutes les protéines qui ne sont pas solubilisées à cette étape sont des agrégats et constituent la fraction insoluble.

Nous n'avons pas récupéré de scFv 4D5 Qtag-myc dans la fraction périplasmique après un choc osmotique, de même qu'avec la polymyxine B (Figure 27, gauche, pistes 1 et 7), mais on retrouve le scFv dans la fraction cytoplasmique soluble (pistes 2 et 8). En revanche, la lyse au lysozyme a permis de récupérer du scFv dans le périplasma sans qu'il en reste dans le cytoplasme sous forme soluble ou insoluble (pistes 4, 5 et 6). Dans la fraction insoluble (piste 6), il ne devrait y avoir que quelques bandes correspondant aux porines de la bactérie. Ici ce n'est pas le cas pour toutes les conditions donc la lyse au lysozyme et NP-40 pour libérer le contenu cytoplasmique n'a pas été complète. Le scFv présent dans la fraction insoluble doit donc être un reste de scFv non lysé car il n'y a pas d'agrégats avec le choc au lysozyme.

Par la suite, le scFv 4D5 Qtag-myc a donc été extrait du périplasma par une lyse au lysozyme, et purifié sur colonne de cobalt avec une élution en présence de 200 mM d'imidazole. On obtient ainsi 3 mg de scFv pur par litre de culture bactérienne (Figure 27, droite).

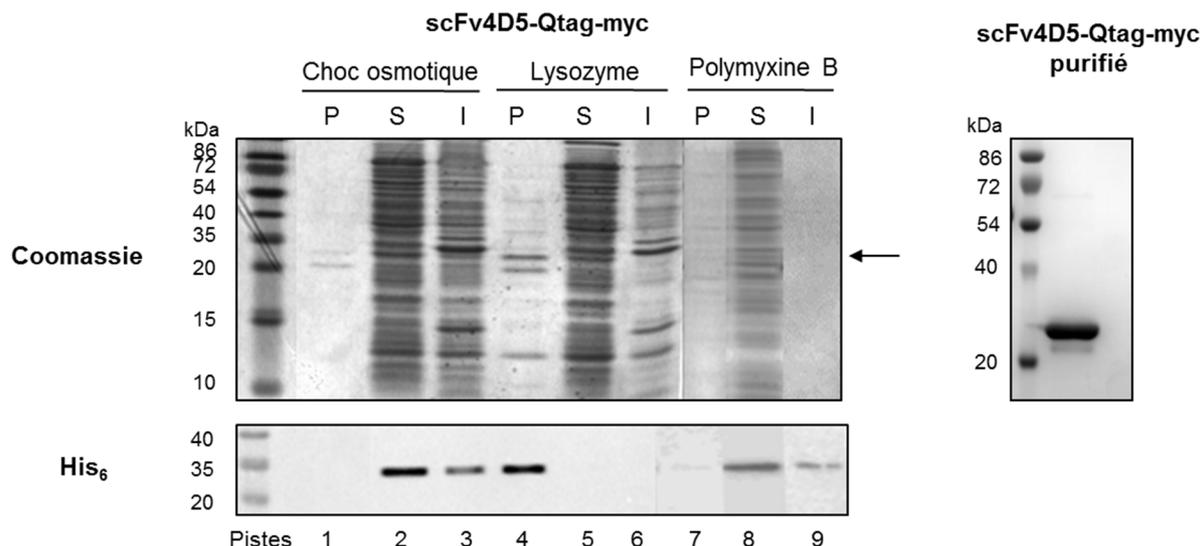


Figure 27 : Production périplasmique du scFv 4D5 Qtag-myc. A gauche : dépôt sur SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie ou détection par un anti-polyhisitidine-HRP des fractions périplasmiques (P), cytoplasmiques solubles (S) et insolubles (I) après lyse par choc osmotique, lysozyme ou polymyxine B. Les échantillons sont en conditions réductrices et proviennent de 20 μ L de culture bactérienne en Coomassie et 4 μ L en WB pour une DO₆₀₀ de 3.7 à la fin de l'induction. La flèche montre la taille attendue. A droite : dépôt sur SDS-PAGE en conditions non réductrices et coloration au bleu de Coomassie de 3 μ g scFv 4D5 Qtag-myc après purification sur colonne de nickel.

ii Production cytoplasmique

Le vecteur pET23NN contient un promoteur T7 qui est reconnu par l'ARN polymérase du phage T7. Cette enzyme très active est apportée par le prophage λ DE3 inséré dans le chromosome de la souche BL21(DE3). La polymérase est sous le contrôle du promoteur inductible *lacUV5* (Studier and Moffatt, 1986). Ainsi, en l'absence d'induction du *lacUV5*, très peu d'ARN polymérase et de scFv sont présents, ce qui permet une bonne croissance des bactéries. Lorsqu'un inducteur comme l'IPTG est ajouté, l'ARN polymérase est produite et va permettre la transcription suivie de la traduction du scFv, qui va s'accumuler dans le cytoplasme. Pour des raisons pratiques, nous avons utilisé un milieu de culture auto-inducteur (Studier, 2005). Il contient plusieurs sources de carbone, du glycérol, du glucose et du lactose. Les bactéries vont ainsi initier leur croissance en utilisant le glucose. Lorsque ce dernier sera épuisé, la bactérie va devenir perméable au lactose, qui va alors permettre l'induction du promoteur.

Après auto-induction et lyse des bactéries au lysozyme et NP-40, les fractions cytoplasmiques solubles et insolubles sont extraites et déposées sur SDS-PAGE. On observe une protéine nettement surexprimée à la taille attendue des scFv, une trentaine de kDa (Figure 28, gauche) Cette protéine n'est pas présente dans la fraction insoluble (pistes 2 et 4), donc les scFv n'agrègent pas, contrairement à ce qui a pu être décrit dans la littérature concernant la

production de fragments d'anticorps en cytoplasme (Frenzel et al., 2013). Après purification de la fraction soluble sur colonne de nickel et élution avec 200 mM d'imidazole, les scFv sont purs (Figure 28, droite) et obtenus avec de très bons rendements allant de 100 à 200 mg/L de culture. Ce type de production est également plus rapide que les productions eucaryotes puisque seulement 3 jours sont nécessaires entre le moment où une colonie prélevée sur boîte de Petri est mise en culture et le moment où l'on obtient le scFv purifié.

Les scFv-Cys-myc ont la particularité de dimériser de façon spontanée à environ 40% (Figure 28, piste 6). Ceci est en accord avec le fait que le cytoplasme d'*E. coli* est un environnement réducteur et que les ponts disulfures ne s'y forment probablement pas (Prinz et al., 1997). Une oxydation partielle a alors lieu lors de l'extraction du cytoplasme, au contact de l'oxygène atmosphérique.

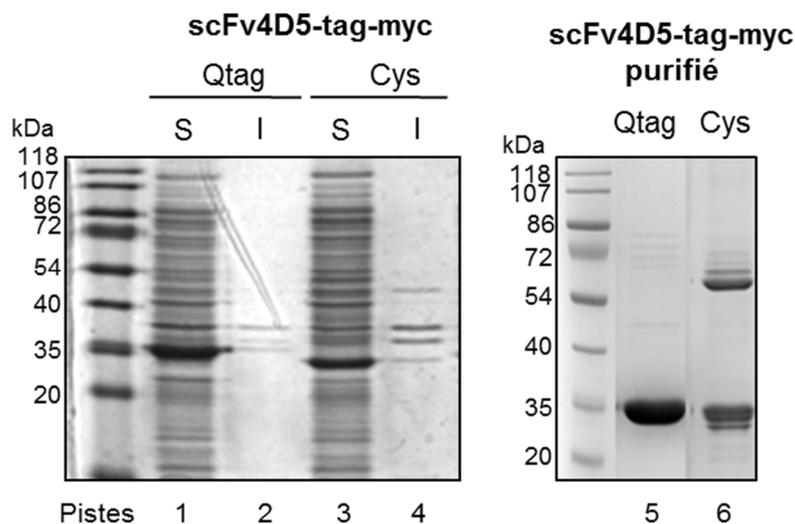


Figure 28 : Production cytoplasmique des scFv 4D5-Qtag-myc et -Cys-myc. Dépôt sur SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie. A gauche : fractions cytoplasmique solubles et insolubles. Les échantillons sont en conditions réductrices et proviennent de 10 μ L de culture bactérienne. A droite : 5 μ g de scFv purifiés sont déposés en conditions non réductrices.

Le scFv Ald tag-myc contient la séquence LCTPSR. Or, *E. coli* possède une activité FGE. La cystéine devrait donc en partie transformée en formylglycine *in vivo*, de façon co- ou post-traductionnelle. Pour améliorer ce taux de conversion, un plasmide pACYC184 contenant le gène de la FGE de *M. tuberculosis* (appelé Rv0712) a été co-transfecté avec le vecteur pET23NN contenant le scFv. Le vecteur pACYC184 utilisé possède le promoteur *ara*. L'expression de la FGE est donc induite à l'arabinose suivie de l'expression du scFv à l'IPTG. La DO₆₀₀ à la fin de ces inductions est de seulement 1.6, contre 5.2 lorsque la FGE n'est pas surexprimée et que le scFv Ald tag est en milieu auto-inducteur. Cette enzyme est donc probablement toxique pour nos bactéries. Une lyse classique au NP-40 et lysozyme permet

de collecter la fraction cytoplasmique soluble qui est alors purifiée sur colonne de nickel de la même façon que les autres scFv (Figure 29).

Le scFv Ald tag est purifié à hauteur de 31 mg/L de culture lorsque la FGE est co-exprimée contre plus de 100 mg/L sans celle-ci. De la même façon que le scFv Cys-myc, le scFv Ald tag-myc dimérise spontanément (Figure 29). Après la conversion de la Cys en fGly catalysée par la FGE, il y a moins de dimères car la fGly n'est plus capable de former des ponts disulfures. Il y a donc logiquement davantage de monomères lorsque la FGE est surexprimée : 65% contre 40%. Ce taux de conversion est nettement inférieur aux 99% obtenus lors de l'introduction du tag LCTPSR en C-terminal de la MBP (Carrico et al., 2007). Or, la formation de la fGly *in vivo* doit être suivie d'un couplage avec une hydroxylamine azide avant de pouvoir coupler le scFv au fragment Fc. Cette seconde réaction est décrite comme ayant un rendement de 70% (Hudak et al., 2012). On obtiendrait alors au maximum 45% de scFv contenant la fonction azide suite à ces 2 étapes, ce qui est trop faible. Ce problème de rendement combiné au fait que la FGE semble toxique pour nos bactéries nous ont donc conduit à abandonner cette stratégie pour la suite.

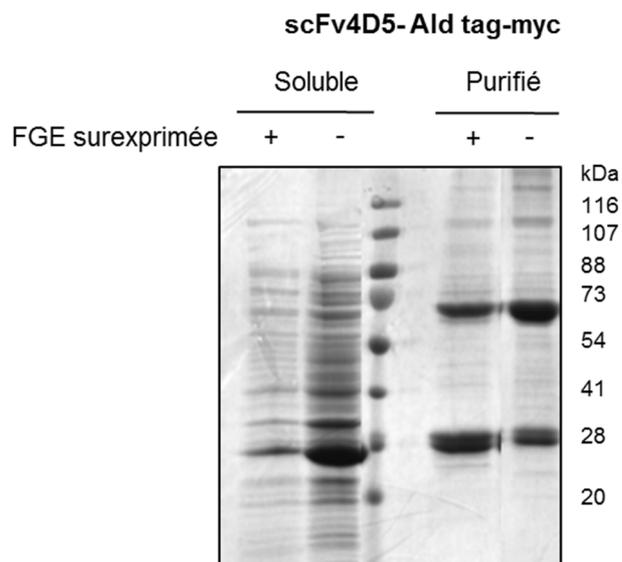


Figure 29 : Production cytoplasmique du scFv 4D5-Ald tag-myc en surexprimant ou non la FGE de *M. tuberculosis*. Dépôt sur SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie. A gauche : fractions cytoplasmique solubles. Les échantillons sont en conditions réductrices et proviennent de 20µL de culture bactérienne. A droite : 5 µg de scFv purifiés sont déposés en conditions réductrices.

b. Oxydation des scFv cytoplasmiques

Après purification, les scFv précipitent en quelques heures à température ambiante ou quelques jours à 4°C, ce qui conduit à la perte totale des protéines. Nous avons émis

l'hypothèse que cette instabilité était due au fait que leurs ponts disulfures n'étaient pas formés dans le cytoplasme où ils ont été produits.

i Production en cytoplasme oxydant

La souche BL21(DE3) utilisée habituellement a été co-transformée par le pET23NN-scFv et le plasmide pFH255 contenant les gènes codant pour l'isomérase de ponts disulfures DsbC et la sulfhydryle oxydase Erv1p. Ces enzymes ont été décrites comme permettant la production de protéines eucaryotes contenant plusieurs ponts disulfures au sein du cytoplasme d'*E. coli* (Nguyen et al., 2011). Après une lyse et une purification habituelles, la stabilité thermique des scFv est évaluée. Pour cela, ils sont chauffés de 24 à 95°C en présence de Sypro orange. Plus les protéines vont se déplier, plus ce fluorophore va pouvoir se fixer sur les résidus hydrophobes enfouis. Il y aura donc un maximum de fluorescence à la température où la protéine sera entièrement dépliée. Aux températures supérieures, elle va agréger et le fluorophore va alors se détacher, ce qui induit une diminution de fluorescence. Le scFv est caractérisé par sa température de demi transition (T_m), qui dépend directement de son état d'oxydation.

Les scFv 4D5 Qtag-myc et Cys-myc produits en cytoplasme réducteur ont une T_m d'environ 55°C. Le scFv 4D5 Qtag-myc produit en périplasma, dont l'environnement est naturellement oxydant, a quant à lui une T_m d'environ 63°C. Ce test est donc pertinent pour évaluer la formation des ponts disulfures intrachaines. Lorsque les scFv sont produits en cytoplasme oxydant, il n'y a aucun effet sur la T_m ce qui démontre que la co-expression des enzymes Erv1p et DsbC catalysant l'oxydation n'a pas suffi à former les ponts disulfures (Figure 30).

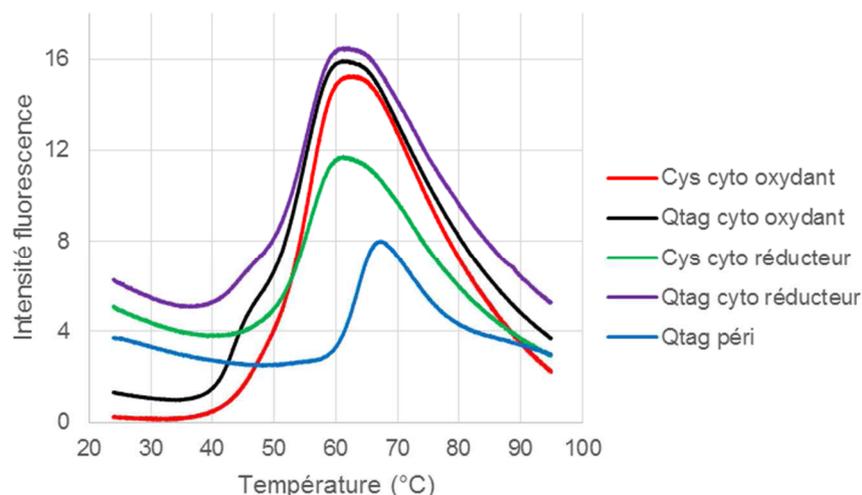


Figure 30 : Stabilité thermique des scFv produits en cytoplasme réducteur, cytoplasme oxydant et périplasma (naturellement oxydant). En rouge et vert : scFv 4D5 Cys-myc produits en cytoplasme respectivement oxydant et réducteur. En noir et violet : scFv 4D5 Qtag-myc produits en cytoplasme respectivement oxydant et réducteur. En bleu scFv 4D5 Qtag-myc produit en périplasma.

Cette absence d'oxydation est vraisemblablement due au fait que le scFv 4D5 est très fortement exprimé dans nos bactéries, ce qui sature le système d'oxydation enzymatique.

ii Oxydation au sulfate de cuivre des scFv purifiés

En nous inspirant de ce qui avait été décrit pour des Ig entières, nous avons alors cherché à oxyder les scFv au sulfate de cuivre (Junutula et al., 2008a). Ces scFv sont donc traités avec 20 équivalents molaires de CuSO_4 par scFv pendant 1h, 3h ou 16h à température ambiante. Le précipité formé, qui contient une petite quantité de scFv et des sels, est ensuite éliminé par centrifugation, le CuSO_4 est éliminé par dessalage et la stabilité thermique est évaluée. Dans notre cas, 1h ou 3h ne suffisent pas à oxyder totalement notre scFv avec 20 éq puisque l'on observe 2 transitions. En effet, après 3h il y a un changement de pente de la courbe aux alentours de 60°C. En revanche, au bout de 16h l'oxydation est totale et une T_m du même ordre de grandeur (63°C) que celle du scFv périplasmique est obtenue (Figure 31).

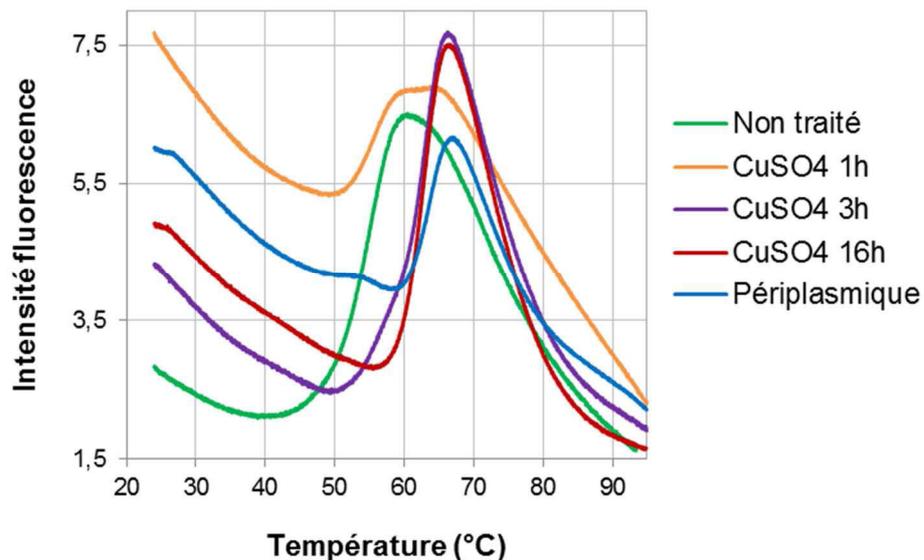


Figure 31 : Stabilité thermique du scFv 4D5 Qtag-myc après oxydation par 20 équivalents de sulfate de cuivre. En vert : scFv cytoplasmique non traité. En orange, violet et rouge : scFv cytoplasmique traité au cuivre respectivement pendant 1h, 3h et 16h. En bleu : scFv périplasmique naturellement oxydé.

Malgré cette oxydation qui le rend stable thermiquement, le scFv 4D5 doit être conservé sous certaines conditions pour ne pas précipiter : à 4°C et non à -20°C, à une concentration inférieure à 2.5 mg/mL, et en tampon TBS imidazole 200mM pH 7.5 car le PBS et l'absence d'imidazole conduisent à une précipitation complète, même une fois stabilisés par oxydation. Nous avons également testé les tampons HEPES 15mM, NaCl 150mM pH 7.4 et phosphate de sodium 20mM, NaCl 500mM pH 7.4. Là encore le scFv 4D5 précipite complètement.

c. Fonctionnalité des scFv cytoplasmiques

La capacité de liaison des scFv 4D5 Qtag-myc et Cys-myc produits en cytoplasme ou périplasma a été évaluée par cytométrie en flux sur la lignée de cancer du sein SK-BR-3 exprimant le récepteur HER2. La lignée NIH/3T3 de fibroblastes murins n'exprime pas HER2 humain. Elle est utilisée pour démontrer la spécificité de fixation des scFv. Quel que soit leur tag et la façon dont ils ont été produits, les scFv se lient spécifiquement à HER2 même à une très faible concentration de 0.1 $\mu\text{g/mL}$, soit environ 3 nM (Figure 32).

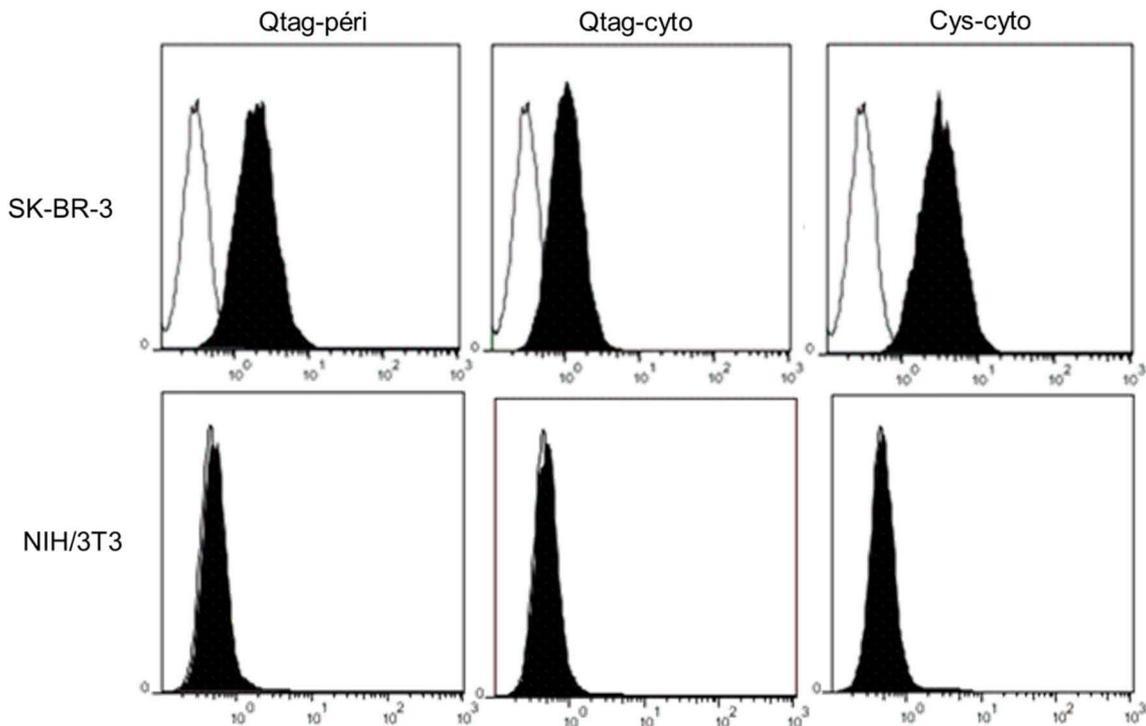


Figure 32 : Fixation des scFv 4D5-tag-myc non oxydés sur HER2 évaluée par cytométrie en flux sur la lignée SK-BR-3. Les scFv sont utilisés à une concentration de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ et sont détectés avec un anti-polyhistidine couplé au FITC. NIH/3T3 n'exprime pas HER2. Péri : périplasmique. Cyto : cytoplasmique.

Les scFv cytoplasmiques non oxydés sont donc capables de se lier à leur antigène mais leur instabilité thermique rend obligatoire leur oxydation au sulfate de cuivre. Pour vérifier que la conservation des scFv en présence de cet agent oxydant n'affectait pas leur fixation, nous avons procédé à un test ELISA. Le scFv 4D5 Qtag-myc a été oxydé pendant 16h. Cette oxydation a été suivie d'une conservation pendant 1 mois à 4°C sans éliminer le CuSO_4 dans une seconde condition. La Figure 33 ne montre aucune différence de liaison à HER2 entre le scFv non oxydé, oxydé naturellement et oxydé *in vitro* puis conservé en présence de CuSO_4 .

Les scFv 4D5 Qtag-myc et Cys-myc cytoplasmiques sont donc purifiés avec de très bons rendements. Leur oxydation *in vitro* permet d'égaliser le scFv périplasmique en terme de stabilité thermique et de fixation à HER2. C'est donc l'auto-induction cytoplasmique qui sera utilisée

pour produire tous les scFv. Par la suite, les scFv seront oxydés par 20 éq de CuSO₄ en TBS imidazole 200mM pH 7.5 pendant 16h à température ambiante (TA) et ce cuivre et cet imidazole ne seront pas éliminés avant de procéder aux couplages des extrémités de chimie click pour s'affranchir d'une étape de dessalage et éviter les problèmes de précipitation.

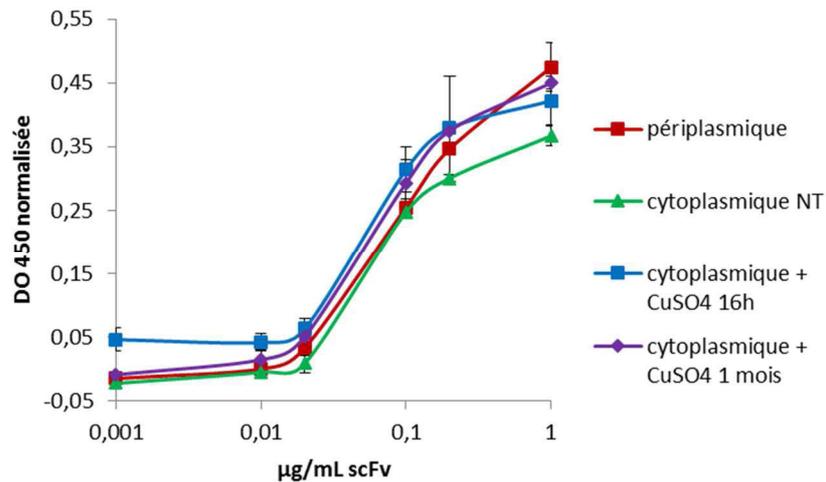


Figure 33 : Fixation du scFv 4D5 Qtag-myc oxydé au récepteur HER2-Fc évaluée par ELISA. Les scFv mis en présence de cuivre pendant 16h ou 1 mois (en bleu ou violet) sont comparés au scFv non oxydé (NT, en vert) et au scFv périplasmique (en rouge). Ils sont détectés par un anti-polyhistidine couplé HRP. La DO₄₅₀ normalisée correspond à la DO₄₅₀ en présence de scFv soustraite par la DO₄₅₀ avec l'anticorps secondaire seul sans scFv.

3. Fragments Fab

a. Construction à un promoteur

i Production cytoplasmique

Comme le scFv, le Fab 4D5 Qtag-myc est inséré dans le pET23NN. Il est produit en cytoplasme par auto-induction, extrait par une lyse au lysozyme et NP-40 puis purifié sur colonne de nickel. Le rendement obtenu après purification est de 6 mg/L soit environ 20 fois inférieur à celui du scFv équivalent. Ce "faible" rendement est dû au fait que la chaîne légère est beaucoup mieux exprimée que la chaîne lourde (Figure 34A, piste 1). Après purification il y a autant de chaîne lourde que de chaîne légère car seule la chaîne lourde se fixe sur le nickel (piste 3). La chaîne légère en excès n'est donc pas retenue sur la colonne. De plus, il y a beaucoup d'agrégation de la LC (piste 2) contrairement au scFv qui n'agrégeait pas du tout. Ces agrégats peuvent être dus à un problème intrinsèque de solubilité ou au fait qu'il n'y a pas assez de chaîne lourde avec qui s'associer.

Nous avons alors tenté d'améliorer les conditions d'induction en utilisant de l'IPTG à 0, 10, 100 ou 1000 μM pendant 4h, 6h ou 8h à 25°C, 30°C ou 37°C. Les bactéries sont ensuite lysées pour extraire leur cytoplasme. Les différentes fractions solubles ont été déposées sur SDS-PAGE et analysées par western-blot. Seule la concentration 1000 μM à 25°C ou 30°C qui a donné les meilleurs résultats est représentée ici (Figure 34B). De façon surprenante la HC est seulement exprimée de façon visible en western blot après 6h à 30°C (piste 7) alors que dans ces conditions la LC l'est assez peu. Par contre, on ne distingue pas cette HC en bleu de Coomassie. Ces conditions n'aboutissent donc pas à une amélioration suffisante pour être exploitées.

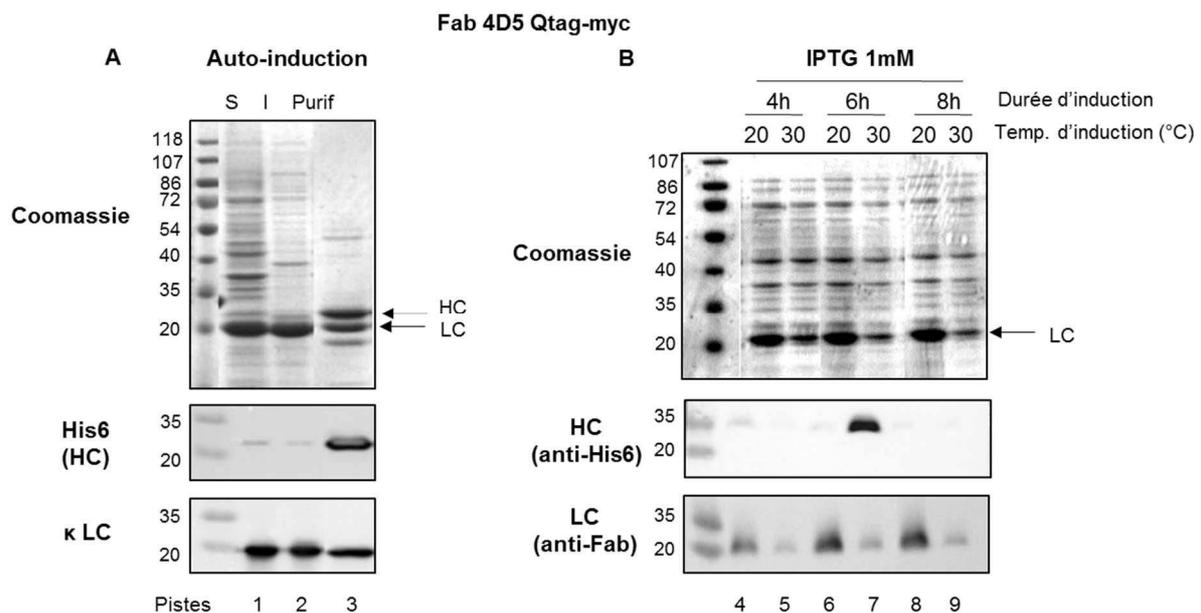


Figure 34 : Expression cytoplasmique du Fab 4D5 Qtag-myc par auto-induction (A) et par ajout d'IPTG 1mM (B). Dépôt sur SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie ou détection de la chaîne lourde (HC) par un anti-polyhistidine-HRP et de la chaîne légère (LC) par un anti-Fab produit en chèvre puis un anti-chèvre HRP ou par un anti-chaîne légère kappa-HRP. Les échantillons sont en conditions réductrices et proviennent de 10 μL de culture bactérienne en Coomassie et 1 μL en WB. A) Après auto-induction, les fractions cytoplasmiques soluble (S) et insoluble (I) sont déposées ainsi que le Fab après purification sur nickel (Purif) : 5 μg en Coomassie et 1.2 μg en WB. B) Après induction avec 1 mM d'IPTG à 25 ou 30°C, les fractions cytoplasmiques solubles sont déposées.

ii Production périplasmique

Nous avons donc tenté de produire le Fab 4D5 Qtag-myc en périplasme après insertion dans le vecteur pAB1 de la même façon que le scFv. Comme pour l'expression cytoplasmique, nous avons testé différentes conditions d'induction : IPTG à 0, 10, 100 ou 1000 μM pendant 4h, 6h ou 8h à 25°C, 30°C ou 37°C. Les bactéries sont ensuite lysées au lysozyme pour extraire leur périplasme. Ces différentes fractions ont été déposées sur SDS-PAGE et analysées par western-blot. Seule les inductions à 37°C qui ont donné les meilleurs résultats sont

représentées ici (Figure 35). Là encore la HC est beaucoup moins exprimée que la LC. De plus, notre Fab se produit avec un rendement de seulement 3 mg/L (comparable à celui obtenu en cytoplasme) alors qu'il a été décrit comme se produisant avec de très hauts rendements, mais avec un autre promoteur et en fermenteur (Carter et al., 1992).

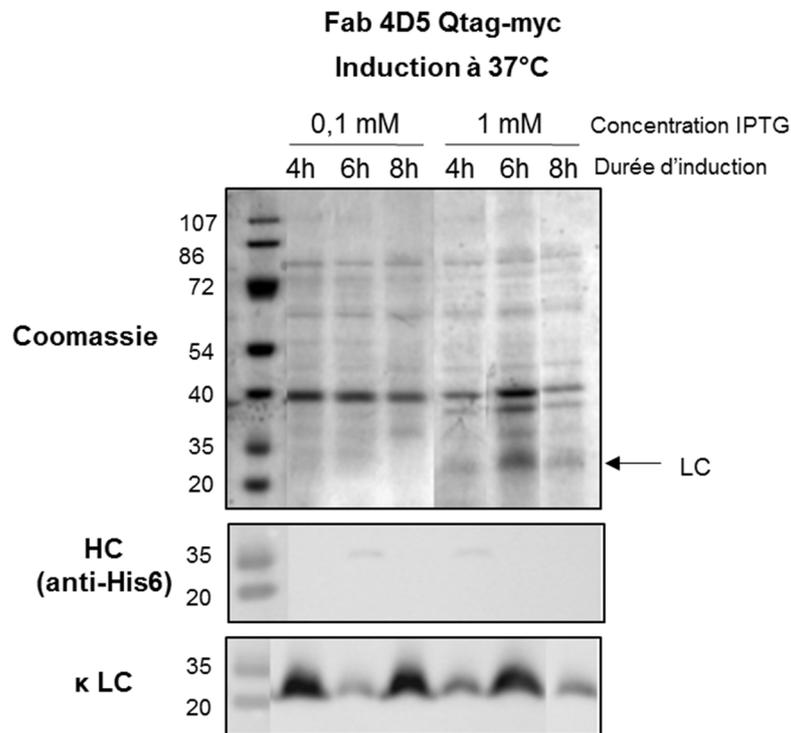


Figure 35 : Expression périplasmique du Fab 4D5 Qtag-myc par induction à 37°C avec 0.1 ou 1 mM d'IPTG entre 4h et 8h. Les fractions périplasmiques sont déposées sur SDS-PAGE puis colorées au bleu de Coomassie ou détectées par un anti-polyhistidine HRP pour la chaîne lourde (HC) et par un anti-chaîne légère kappa HRP pour la chaîne légère (LC). Les échantillons sont en conditions réductrices et proviennent de 10 µL de culture bactérienne en Coomassie et 1µL en WB.

b. Construction à deux promoteurs

Le fait de ne trouver de chaîne lourde du Fab ni dans les fractions solubles ni sous forme agrégée nous laisse penser qu'il pourrait y avoir un problème au niveau de sa transcription. Pour tenter d'améliorer l'efficacité transcriptionnelle, nous avons inséré un deuxième promoteur T7 en amont de cette chaîne au sein du vecteur pET23NN par *PCR assembly*. Le Fab cytoplasmique a été induit en milieu auto-inducteur pendant 20h à 20°C et à l'IPTG dans les conditions les plus optimales déterminées avec un seul promoteur : 1 mM pendant 3h à 30°C ou 6h à 25°C. Après ces durées, le cytoplasme est extrait et les fractions solubles et insolubles sont analysées par SDS-PAGE colorées au bleu de Coomassie et détectées par western blot.

Quelle que soit l'induction, la chaîne lourde reste non exprimée (Figure 36). Faute de temps, nous avons donc choisi de ne pas poursuivre le développement des fragments Fab et de nous focaliser sur le couplage de scFv produits dans le cytoplasme d'*E. coli* et oxydés *in vitro* au sulfate de cuivre sur un Fc produit en cellules HEK.

Nous aurions pu tester d'autres promoteurs pour palier au problème d'expression de la chaîne lourde, ou encore utiliser des scFab qui consistent à relier les chaînes lourdes et légères du Fab par un linker peptidique, de la même façon que les scFv.

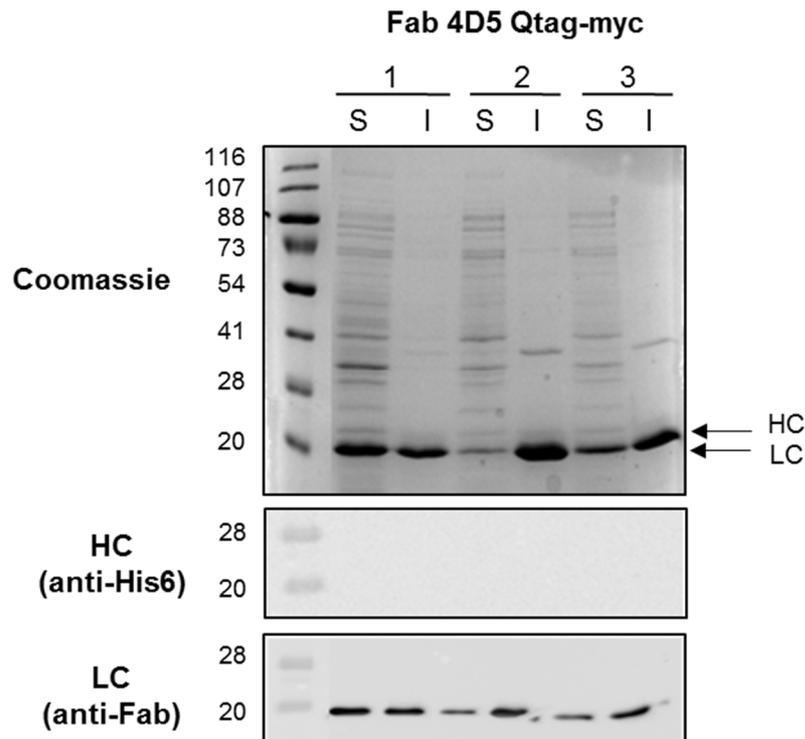


Figure 36 : Expression cytoplasmique du Fab 4D5 Qtag-myc construit avec un promoteur supplémentaire en amont de la chaîne lourde. 1 : auto-induction 20h à 20°C. 2 : induction à l'IPTG 1 mM pendant 3h à 30°C. 3 : induction à l'IPTG 1 mM pendant 6h à 25°C. Dépôt sur SDS-PAGE des fractions cytoplasmiques solubles (S) ou insolubles (I) puis coloration au bleu de Coomassie ou détection de la chaîne lourde (HC) par un anti-polyhistidine HRP et de la chaîne légère (LC) par un anti-Fab produit en chèvre puis un anti-chèvre HRP. Les échantillons sont déposés en conditions réductrices et proviennent de 16µL de culture bactérienne à $DO_{600}=2.2$ en Coomassie et de 2 µL en WB.

C. Fonctionnalisation des fragments pour la chimie click

1. Principe

Les conditions des réactions de couplage en termes d'équivalents molaires de linker par rapport au fragment d'anticorps, de tampon, de temps et de température sont inspirées de celles précédemment décrites dans la littérature. Après réaction, l'excès de linker est éliminé par dessalage. Les fonctionnalités azide et DBCO sont détectées respectivement par un fluorophore DBCO ou azide. La quantification relative entre les différentes conditions est donc possible par dépôt sur SDS-PAGE, détection de la fluorescence puis coloration au bleu de Coomassie. Lorsque des fragments de masses molaires différentes et/ou contenant un ou 2 tag(s) (2 tag pour le Fc, 1 tag pour le scFv) seront comparés, ils seront déposés de telle sorte à déposer une quantité de matière d'azide ou de DBCO équivalente (c'est-à-dire deux fois moins de Fc que de scFv par exemple).

Les linkers bi-fonctionnels utilisés contiennent tous quelques molécules de polyéthylène glycol (PEG) entre les fonctionnalités de chimie click et les fonctionnalités permettant le couplage sur les fragments d'anticorps. Ces PEG ont deux fonctions : permettre un éloignement stérique des extrémités azide ou DBCO par rapport aux anticorps, ce qui va les rendre plus accessibles lors de la réaction de chimie click finale. Par exemple, le DBCO-PEG₄-maléimide a une longueur de 26.3 Å. La seconde fonction est de réduire ou éliminer les problèmes d'agrégation ou de précipitation dus au caractère hydrophobe du DBCO grâce à l'ajout d'une chaîne hydrophile.

2. PLP

Le PLP a été décrit comme transformant de façon spécifique l'amine primaire N-terminale d'une protéine en cétone. La présence de cette cétone est détectée par couplage à l'hydroxylamine Alexa Fluor 488. En dérivant le Fc avec des concentrations de PLP de 0.5 à 5 mM, on observe l'apparition de multimères de Fc (Figure 37A). Ces multimères sont dus à un couplage provoqué par le PLP car ils sont observés dans les mêmes proportions même sans ajouter l'hydroxylamine (données non représentées ici). En conditions réductrices, les Fc entre 54 et 73 kDa peuvent donc correspondre à la réduction de ces multimères ou encore à la présence de couplages entre les 2 chaînes d'un même dimère de Fc qui empêchent sa réduction. La fluorescence est bien spécifique de la présence de cétone car elle est absente lorsque le Fc n'est pas préalablement dérivé au PLP. Le rendement de dérivation est comparable dans toutes les conditions. En revanche, il semble y avoir légèrement moins de couplages inter- ou intra-Fc lorsque la concentration en PLP est plus importante (pistes 5 et

10). Après réduction, les dimères présentent de la fluorescence ce qui prouve que la fonction cétone a tout de même été introduite.

Pour déterminer si ces multimères sont dus au long temps de réaction du PLP, une gamme de temps de réaction entre 1h et 18h a été effectuée avec 5mM de PLP, la concentration donnant le moins de multimères (Figure 37B). Plus la réaction est longue, plus ces multimères sont présents. Le rendement maximal est obtenu au bout de 2h30 de réaction (pistes 13 et 18). A ce temps, il y a déjà des multimères en quantité non négligeable. Aux temps plus longs, la cétone formée peut être dégradée et/ou former des produits secondaires conduisant à des couplages inter- ou intra-moléculaires, ce qui expliquerait la plus faible efficacité.

La dérivation au PLP de chaque protéine doit être optimisée de manière à trouver un compromis entre un rendement le meilleur possible et peu de produits secondaires. Ici, nous n'avons pas réussi à trouver des conditions permettant de dériver l'amine N-terminale de notre Fc en cétone de façon spécifique. La formation de liaisons covalentes inter- ou intra-protéines en présence de PLP n'a jamais été décrite auparavant et nous n'avons pas cherché à déterminer la nature de ces liaisons. Leur apparition pose un problème de pureté du Fc donc nous avons décidé de ne pas poursuivre cette stratégie. De plus, le PLP a précédemment été décrit pour la dérivation de protéines monomériques mais nous sommes dans un contexte différent car notre Fc est dimérique.

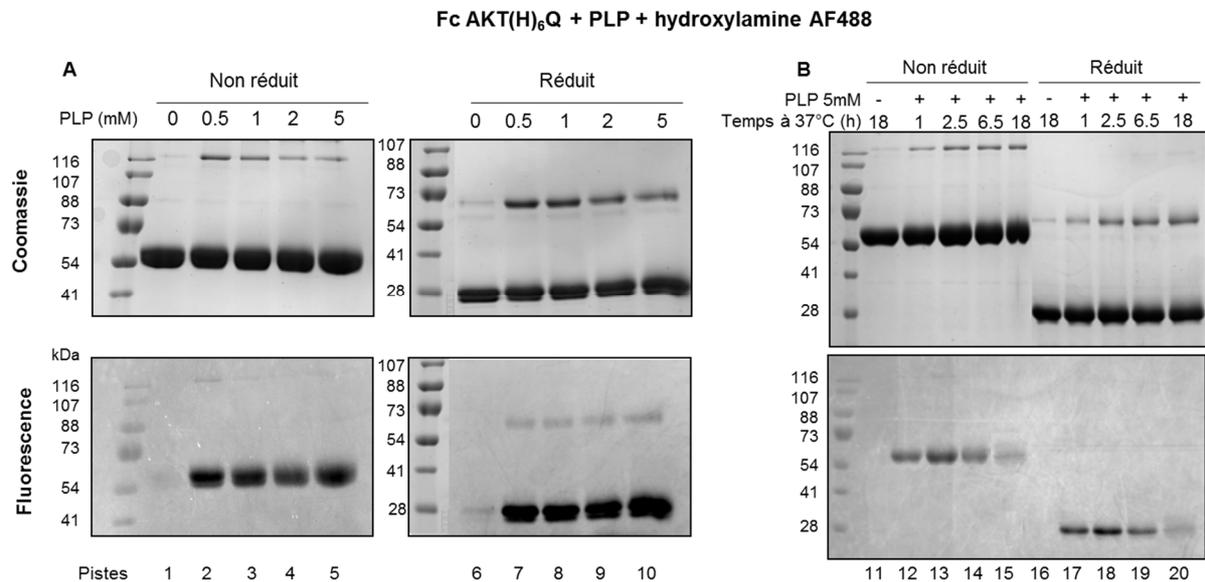


Figure 37 : Dérivation du Fc AKT(H)₆Q au PLP révélée par couplage à l'hydroxylamine Alexa Fluor 488. Dépôt sur SDS-PAGE de 4µg de Fc, révélation de la fluorescence et coloration au bleu de Coomassie. A) Gamme de concentration de PLP de 1 à 5 mM lors d'une réaction de 18h à 37°C. B) Gamme de temps de réaction à 37°C de 1h à 18h en présence de PLP 5 mM.

3. Bis-sulfones

Les bis-sulfones permettent de dériver les tags His₆. Au départ, nous souhaitons conjuguer les bis-sulfones sur les scFv ou le Fc. Cependant, la présence d'imidazole est requise pour empêcher la précipitation des scFv. Or, les bis-sulfones s'additionnent sur le cycle imidazole de la chaîne latérale des histidines donc sa présence semble incompatible avec l'utilisation de ces composés. Pour vérifier cela, nous avons couplé la bis-sulfone-PEG₃-azide ou la bis-sulfone-PEG₂-DBCO sur le Fc AKT(H)₆Q en présence de différentes concentrations d'imidazole. Ces composés ont été synthétisés par le Dr Nicolas Joubert (GICC Tours).

Après 6h de réaction à température ambiante, l'excès de sulfone est éliminé par dessalage et les extrémités azide et DBCO sont détectées par fluorescence. En présence de 200mM d'imidazole, la réaction avec les sulfones est totalement inhibée (Figure 38). Même à seulement 10mM, elle est fortement inhibée. Le même résultat a été obtenu pour la bis-sulfone DBCO. La conjugaison des bis-sulfones ne peut donc être appliquée qu'au fragment Fc.

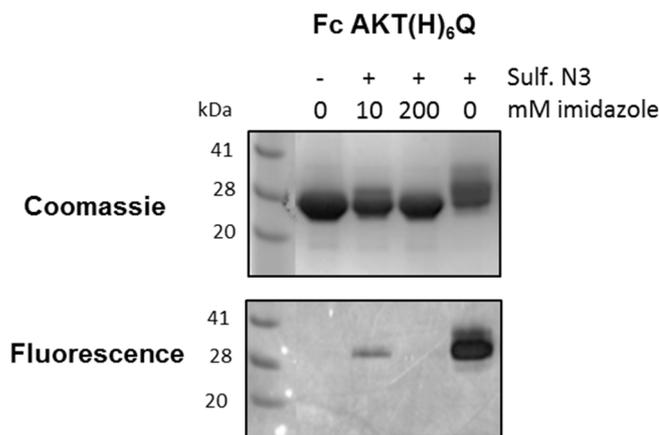


Figure 38 : Inhibition du couplage de la bis-sulfone-PEG₃-azide sur le Fc AKT(H)₆Q en présence d'imidazole. L'extrémité azide est détectée par du DBCO fluorescent puis 5µg sont déposés sur SDS-PAGE en conditions réductrices.

Les bis-sulfones ont été décrites comme spécifiques du tag His₆ lors du couplage à un dAb. Cependant, elles peuvent aussi se fixer à deux histidines séparées par un résidu car la chémérine contenant le tag (His-Gly)₃ a pu être conjuguée (Cong et al., 2012). Or, dans le fragment Fc d'une IgG1 humaine une succession de résidus histidines se trouvent dans le domaine CH3 (Figure 39). Elles sont présentes aux positions 429, 433 et 435 (numérotation EU) et sont relativement proches dans l'espace. Nous avons alors émis l'hypothèse que les bis-sulfones risquaient de se fixer dans cette zone. L'histidine 435 a une position centrale dans l'espace mais elle est impliquée dans la liaison au FcRn donc elle ne peut pas être mutée. L'histidine 433 est indirectement impliquée dans cette liaison. Lorsqu'elle est mutée en alanine, le Fc conserve 41% de son affinité au récepteur (Shields et al., 2001). Nous avons

donc introduit cette substitution H433A sur un Fc sans tag par mutagenèse dirigée puis comparé la fixation des bis-sulfones avec et sans cette mutation.

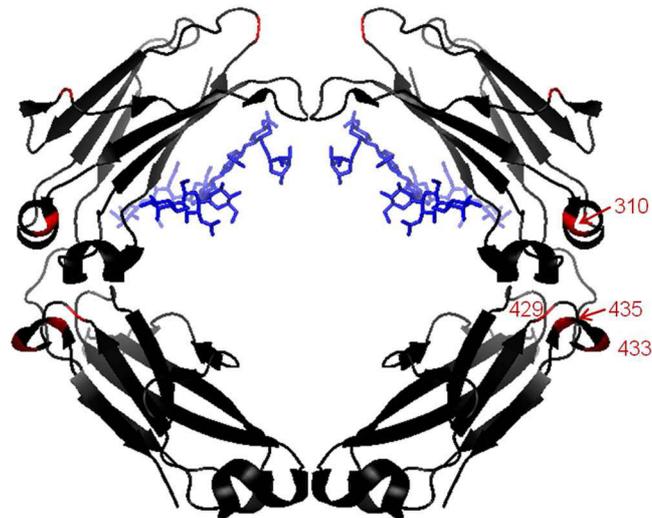


Figure 39 : Structure cristallographique d'une IgG1 humaine. En bleu : glycosylation. En rouge : résidus histidine.

La Figure 40 montre un couplage identique de la sulfone azide que l'histidine 433 soit mutée ou non. Des résultats identiques ont été obtenus avec la sulfone DBCO. La présence de dimères non réductibles de Fc montre qu'il y a des conjugaisons entre deux histidines situées chacune sur une chaîne du Fc, ce qui empêche sa dissociation en monomère, et/ou que des histidines situées sur des Fc différents sont pontées par une bis-sulfone. Les bis-sulfones semblent donc capables de se fixer sur deux histidines proches dans l'espace, même si elles sont séparées de plus d'un résidu dans la séquence primaire. Par exemple, les histidines 429 et 435 d'une même chaîne sont assez proches et pourraient être impliquées.

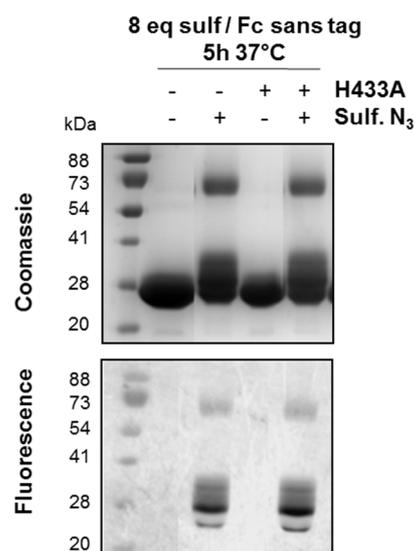
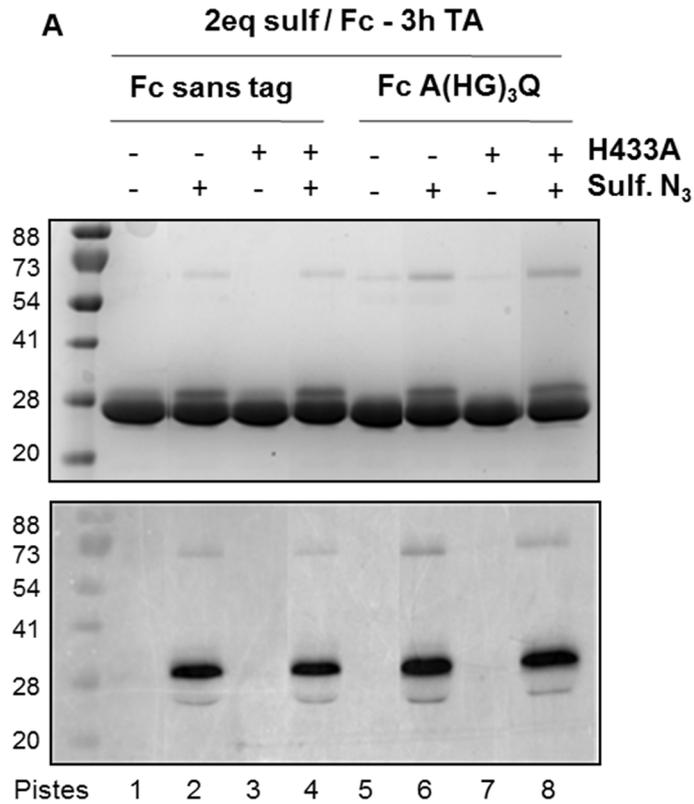


Figure 40 : Dérivation du fragment Fc d'une IgG1 humaine sans tag avec ou sans mutation H433A par 8 équivalents molaires de bis-sulfone-PEG₃-azide pendant 5h à 37°C. La présence de l'azide est détectée par couplage de DBCO fluorescent puis 5µg sont déposés en conditions réductrices sur SDS-PAGE.

Nous nous sommes alors demandé si les bis-sulfones pouvaient avoir une préférence de fixation pour un tag polyhistidine par rapport aux autres histidines. Deux bis-sulfones peuvent se fixer par tag His₆ (Cong et al., 2012). Nous avons donc choisi d'introduire un tag (His-Gly)₃ qui permet de ne conjuguer qu'une seule bis-sulfone par chaîne de Fc. Le Fc A(HG)₃Q (qui contient aussi un Qtag) a été construit par insertion d'oligonucléotides hybridés entre les sites de restriction EcoRI et BglII à partir du Fc AKT(H)₆Q. La mutation H433A y a été introduite par mutagenèse dirigée. Une quantité équimolaire de bis-sulfone a été mise en réaction avec le Fc sans tag ou le Fc A(HG)₃Q contenant ou non la substitution H433A (donc 2 équivalents par Fc) pendant un temps de réaction plus court (3h à température ambiante). Dans ces conditions plus douces les dimères non réductibles ne sont presque plus présents (Figure 41A). Cependant, la mutation H433A ne permet toujours pas d'empêcher l'addition sur le Fc sans tag (piste 4). Ceci prouve que les bis-sulfones peuvent se fixer sur deux histidines d'une même chaîne lorsqu'elles sont proches spatialement et/ou être impliquées dans une réaction d'addition avec n'importe quelle histidine sans que la seconde addition (présente dans le mécanisme réactionnel de la Figure 13) sur une histidine voisine n'ait lieu. De plus, le Fc A(HG)₃Q avec ou sans mutation H433A présente une conjugaison comparable à celle sur le Fc sans tag (pistes 2, 4, 6 et 8). Ceci montre que l'efficacité de couplage sur le Fc sans tag était déjà maximale.

Ainsi, les bis-sulfones se fixent sur d'autres histidines que celles présentes dans une séquence de type HXH. Toutes les possibilités de fixation sont représentées dans la Figure 41B. Ces couplages non spécifiques nous ont donc conduit à abandonner cette stratégie car il n'est pas envisageable de muter toutes les histidines accessibles du Fc étant donné leur implication dans la liaison du fragment Fc au FcRn.



B

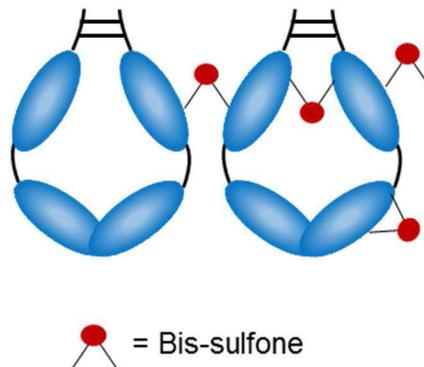


Figure 41 : Dérivation du Fc A(HG)₃Q ou du Fc sans tag avec ou sans mutation H433A par la bis-sulfone-PEG₃-azide. A) 2 équivalents molaires de sulfone sont mis en réaction avec le Fc sans tag ou le Fc A(HG)₃Q pendant 3h à température ambiante. La présence de l'azide est détectée par couplage de DBCO fluorescent puis 5µg sont déposés en conditions réductrices sur SDS-PAGE. B) Possibilités de fixation des bis-sulfones sur le Fc. Les sites de fixation sont aléatoires sur le schéma.

4. Cystéine libre

a. Dérivation au maléimide

Le scFv 4D5 Cys-myc est oxydé au sulfate de cuivre pour former ses ponts disulfures intrachainés. Comme nous l'avons vu précédemment (Figure 28), il est en partie sous forme dimérique donc le pont interchaîne doit ensuite être réduit pour rendre la cystéine introduite accessible. Cette réduction ne doit pas affecter les ponts intrachainés donc nous avons utilisé un agent réducteur doux : le TCEP (tris(2-carboxyéthyl)phosphine). Pour vérifier que le TCEP n'a réduit que les ponts inter-scFv, ces scFv ont subi un test de stabilité thermique (Figure 42). L'oxydation a bien permis d'obtenir une T_m similaire à celle du scFv périplasmique et la réduction au TCEP élimine totalement les dimères sans affecter cette stabilité.

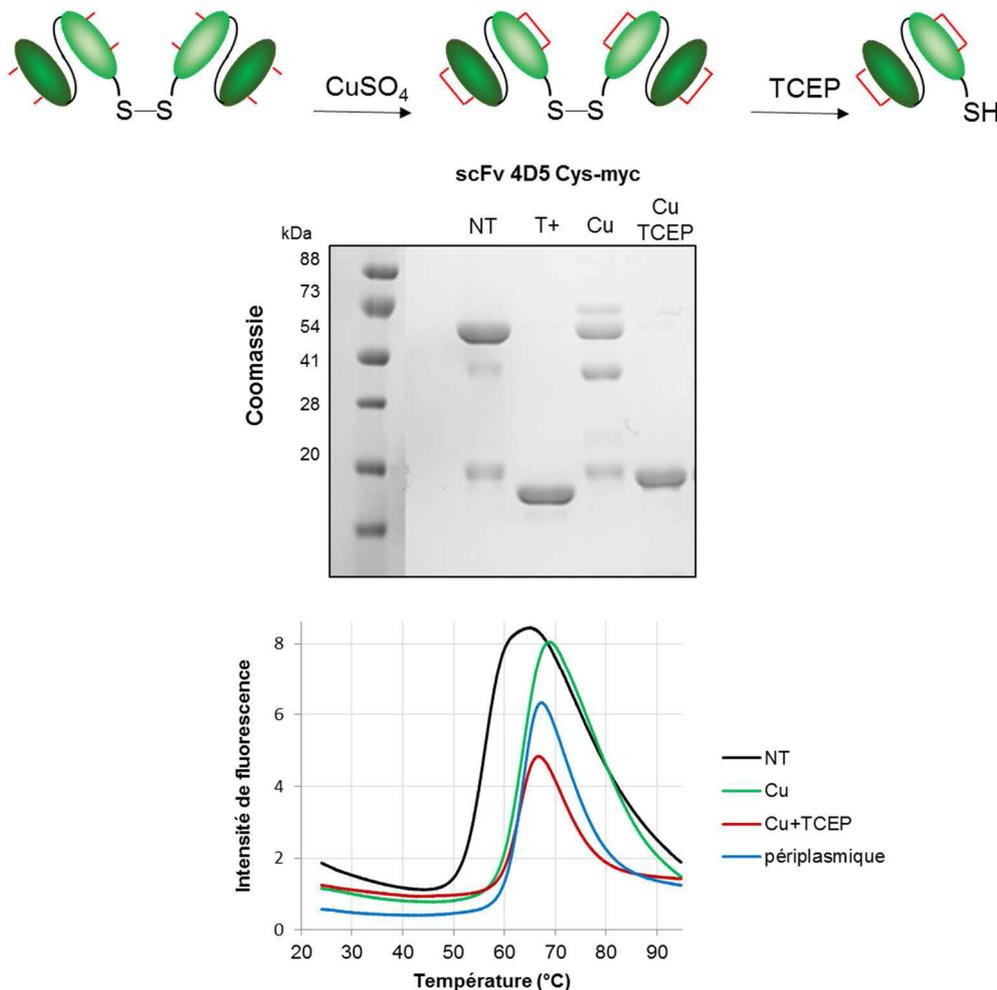


Figure 42 : Conservation de la stabilité thermique après réduction des dimères de scFv 4D5 Cys-myc au TCEP. Traitement par 20 éq de CuSO_4 pendant 16h à TA, élimination du cuivre, traitement par 100 éq de TCEP 1h à 37°C, élimination du TCEP, blocage des cystéines libres par 30mM de N-éthylmaléimide pendant 30min à TA. Au milieu : 5 μg de scFv sont déposés sur SDS-PAGE en conditions non réductrices. En bas : test de stabilité thermique sur les mêmes échantillons. NT : scFv cytoplasmique non traité (courbe noire). T+ : scFv périplasmique (bleu). Cu : scFv cytoplasmique oxydé au CuSO_4 (vert). Cu TCEP : scFv cytoplasmique oxydé au CuSO_4 puis réduit au TCEP (rouge).

Nous avons cherché par la suite la quantité minimale de TCEP capable de réduire les scFv dimériques. Pour cela, une gamme de 2 à 100 équivalents molaires par scFv oxydé a été réalisée (Figure 43). Le scFv est totalement réduit avec 20 équivalents. C'est donc cette quantité qui sera utilisée par la suite.

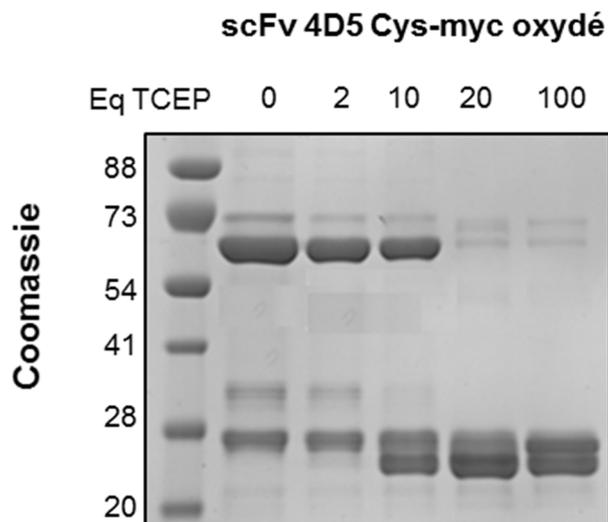


Figure 43 : Réduction du scFv 4D5 Cys-myc préalablement oxydé au CuSO_4 par 2 à 100 équivalents de TCEP pendant 1h à 37°C . Les cystéines libres sont bloquées par couplage de 10eq de maléimide-PEG₄-DBCO pendant 1h à TA puis le TCEP est le maléimide sont éliminés sur Zeba Spin. 5 μg de scFv sont déposés en conditions non réductrices sur SDS-PAGE.

Le TCEP ne contenant pas de soufre, il n'entrera pas en compétition avec le thiol libre du scFv réduit lors du couplage du maléimide DBCO et ne sera donc pas éliminé. Il existe également du maléimide azide commercial. Cependant, la fonction azide peut être réduite par le TCEP. Il faut donc éliminer cet agent réducteur avant de procéder à la conjugaison. Cette étape supplémentaire de dessalage entraîne une diminution de la concentration en scFv et des dimères risquent de se reformer le temps que les cystéines libres soient bloquées par le maléimide. Pour ces raisons, nous avons choisi de nous focaliser sur l'utilisation du maléimide-PEG₄-DBCO.

En plus de réagir avec les thiols, le maléimide peut se conjuguer aux amines primaires et être hydrolysé, essentiellement à des pH supérieurs à 7.5. A pH 7, il est 1000 fois plus réactif envers un groupement sulfhydryle qu'envers une amine d'après la fiche technique du composé utilisé. Pour démontrer la spécificité du maléimide DBCO pour les cystéines libres, nous avons utilisé le scFv 4D5 Qtag qui ne possède pas de cystéine libre après oxydation au cuivre. La Figure 44 montre qu'à pH 6.5 et 7.5 le même rendement de couplage est obtenu sur un tag Cys (pistes 1 à 6) mais il y a une légère fixation à pH 7.5 sur le Qtag sans cystéine libre (piste 10). Avec 10 équivalents de maléimide à pH 6.5, les scFv Cys-myc ont en partie redimérisé suite à l'élimination du TCEP et du maléimide en excès (piste 1). Ceci prouve que le couplage de ce maléimide n'est pas complet. En revanche, avec 20 équivalents (piste 2 et 8) il n'y a pas de dimères reformés et il y a légèrement moins de fixation sur le scFv Qtag qu'avec 30 équivalents (piste 3 et 9). Cette condition est donc un bon compromis entre rendement et spécificité et sera utilisée par la suite.

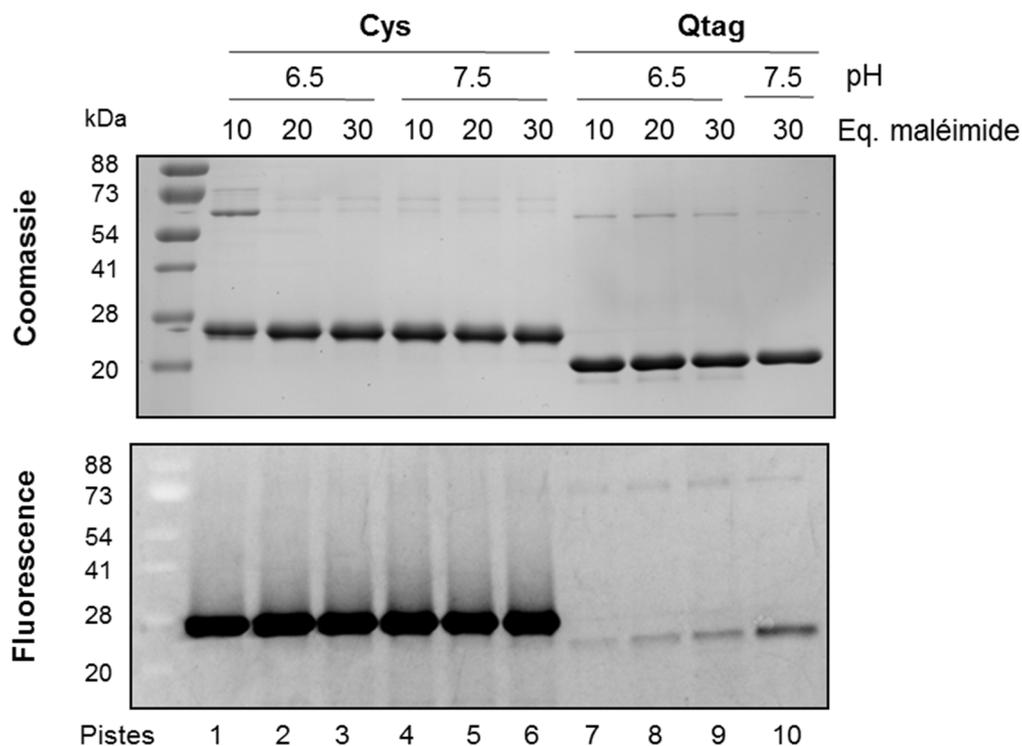


Figure 44 : Dérivation du scFv 4D5 Cys-myc par 10 à 30 éq de maléimide-PEG₄-DBCO à pH 6.5 ou 7.5 après réduction au TCEP. Le scFv 4D5 Qtag est utilisé comme témoin sans cystéine libre. La présence de DBCO est révélée par couplage à l'azide fluor 488. 2µg sont déposés sur SDS-PAGE en conditions non réductrices.

Une autre réaction secondaire possible est la réaction du thiol de la cystéine libre sur le DBCO, appelée thiol-yne. Après réduction des dimères de scFv 4D5 Cys-myc au TCEP, 10 équivalents de DBCO fluorescent ont été mis en réaction avec le scFv pendant 24h à TA, ce qui correspond à un large excès et une durée beaucoup plus longue que la durée de réaction

habituelle entre le scFv et le maléimide DBCO. Aucune fluorescence n'a été détectée donc il n'y a pas de réaction parasite entre la cystéine et le DBCO dans nos conditions.

b. Dérivation à l'APN

Comme le maléimide est connu pour avoir tendance à subir des réactions d'hydrolyse et d'échange de thiol, en particulier *in vivo*, nous avons comparé l'efficacité de couplage de l'APN-BCN et du maléimide-PEG₄-DBCO. L'absence de conjugaison sur le scFv 4D5 Qtag montre que l'APN est attaqué de façon spécifique par les thiols à pH 7.5 (Figure 45A, piste 4), de même que le maléimide à pH 6.5 (piste 6). Le rendement augmente avec l'excès d'APN (pistes 1, 2 et 3) mais sans être aussi efficace que le maléimide avec le même excès de réactif et la même durée de réaction (piste 5). Nous avons alors augmenté la durée de réaction avec ces 20 équivalents (Figure 45B). De façon surprenante, après 22h de réaction le rendement est moins important qu'après 7h (pistes 10 et 9), qui correspond au meilleur couplage obtenu, alors que l'APN n'est pas décrit comme étant sujet à une dégradation. Après 7h de réaction, l'efficacité est comparable à celle du maléimide (pistes 9 et 7).

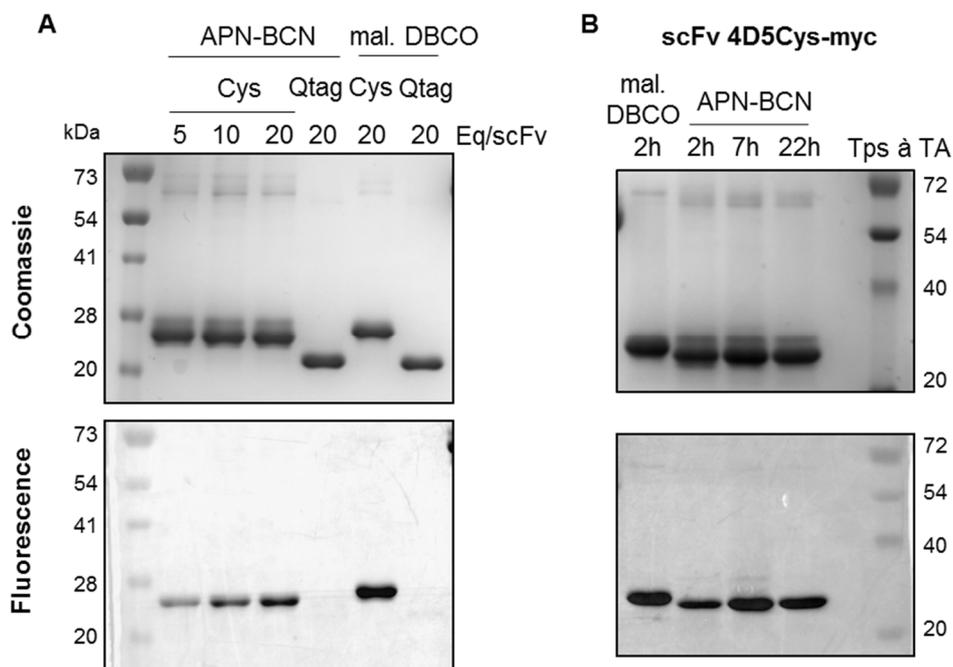


Figure 45 : Dérivation du scFv 4D5 Cys-myc par l'APN-BCN. Le BCN est détecté par couplage à l'azide fluor 488. Les échantillons sont déposés en conditions non réductrices sur SDS-PAGE à hauteur de 2µg. A) Gamme de 5 à 20 équivalents molaires d'APN-BCN en comparaison avec 20 équivalents molaires de maléimide-PEG₄-DBCO pendant 2h à TA. Le scFv 4D5 Qtag est utilisé comme témoin sans cystéine. B) 20 équivalents molaires d'APN-BCN sont mis en réaction pendant 2h à 22h à TA en comparaison avec 20 équivalents molaires de maléimide-PEG₄-DBCO pendant 2h à TA.

5. Transglutaminase

a. Dérivation du scFv

Le scFv initialement prévu pour être couplé par la stratégie de la transglutaminase était le scFv 4D5 Qtag-myc. Lorsque ce scFv a été conjugué par l'amine-PEG₄-DBCO (entre 10 et 60 équivalents par scFv), des dimères de scFv sont apparus de façon similaire dans toutes les conditions (Figure 46), et ce malgré l'utilisation de la plus faible quantité de TG utilisée dans la littérature (Lhospice et al., 2015). Ces liaisons sont covalentes car non réductibles. Leur formation est catalysée par la TG car la piste avec du DBCO sans enzyme ne montre que des monomères. Après élimination de l'excès de linker, la fluorescence montre que la fixation de l'amine DBCO est elle aussi catalysée par l'enzyme. Ce composé s'est également couplé sur le scFv Cys-myc qui ne contient pas de Qtag, contrairement à ce qui était attendu.

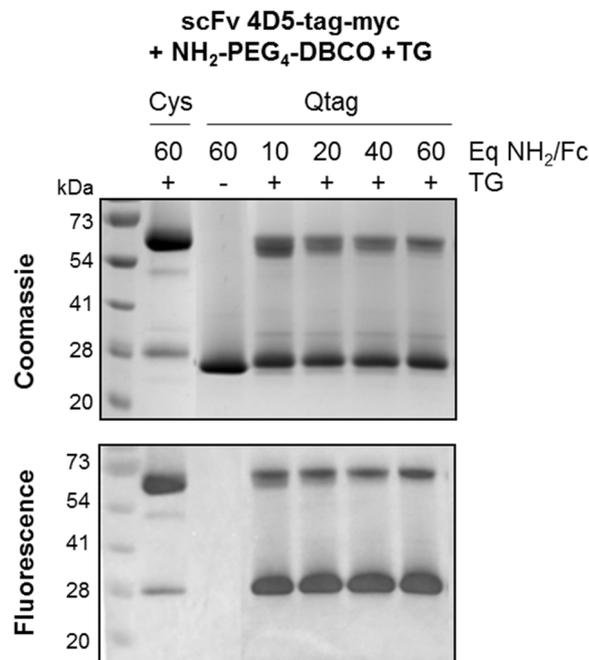


Figure 46 : Dimérisation des scFv 4D5 Qtag-myc catalysée par la TG. Couplage du NH₂-PEG₄-DBCO (10 à 60 équivalents molaires) sur les scFv 4D5 Qtag-myc et Cys-myc catalysé par 15 U TG / μ mol scFv pendant 16h à 37°C. Détection du DBCO par l'azide fluor 488 et dépôt de 5 μ g en conditions réductrices sur SDS-PAGE.

Nous avons donc émis l'hypothèse que l'amine DBCO pourrait être capable de se fixer sur le tag c-myc du scFv 4D5 Cys-myc. Comme le rôle biologique de la TG est de former des liaisons glutamine-lysine, il est possible que la lysine contenue dans ce tag accessible forme des liaisons covalentes avec une glutamine ce qui expliquerait la dimérisation des scFv. Pour vérifier cela, nous avons construit 3 nouveaux vecteurs par mutagenèse dirigée à partir du pET23NN-scFv 4D5 Qtag-myc. Dans l'un d'entre eux le peptide c-myc a été délété pour exprimer le scFv 4D5 Qtag. Dans les 2 autres cas, le Qtag a été délété et il reste soit le c-myc

sauvage (WT) de séquence EQK**L**ISEEDL, soit un c-myc muté appelé K3F de séquence EQ**F**LISEEDL. Cette substitution a été choisie car l'anticorps anti-c-myc 9E10 commercial est toujours capable de se fixer sur cette séquence (Hilpert et al., 2001). Ces 3 nouveaux scFv ont été produits en cytoplasme d'*E. coli* comme décrit précédemment. De la même façon que le scFv 4D5 Qtag-myc, ils sont bien surexprimés dans les fractions solubles des lysats bactériens et la mutation K3F du c-myc est bien détectée par l'anti c-myc (Figure 47A). Ces nouvelles constructions sont donc purifiées sur colonne de nickel, oxydées et conservées de la même façon que les scFv précédents.

Lorsque ces scFv sont incubés avec de la TG pendant le temps de réaction habituel (16h à 37°C), des dimères apparaissent seulement avec le scFv 4D5 myc (Figure 47B). L'absence de dimères lorsque la lysine du c-myc est mutée ou lorsque le c-myc est délété montre que c'est bien cette lysine qui est impliquée dans une liaison covalente avec une glutamine. Il s'agit très probablement de la glutamine du c-myc qui est accessible à la TG.

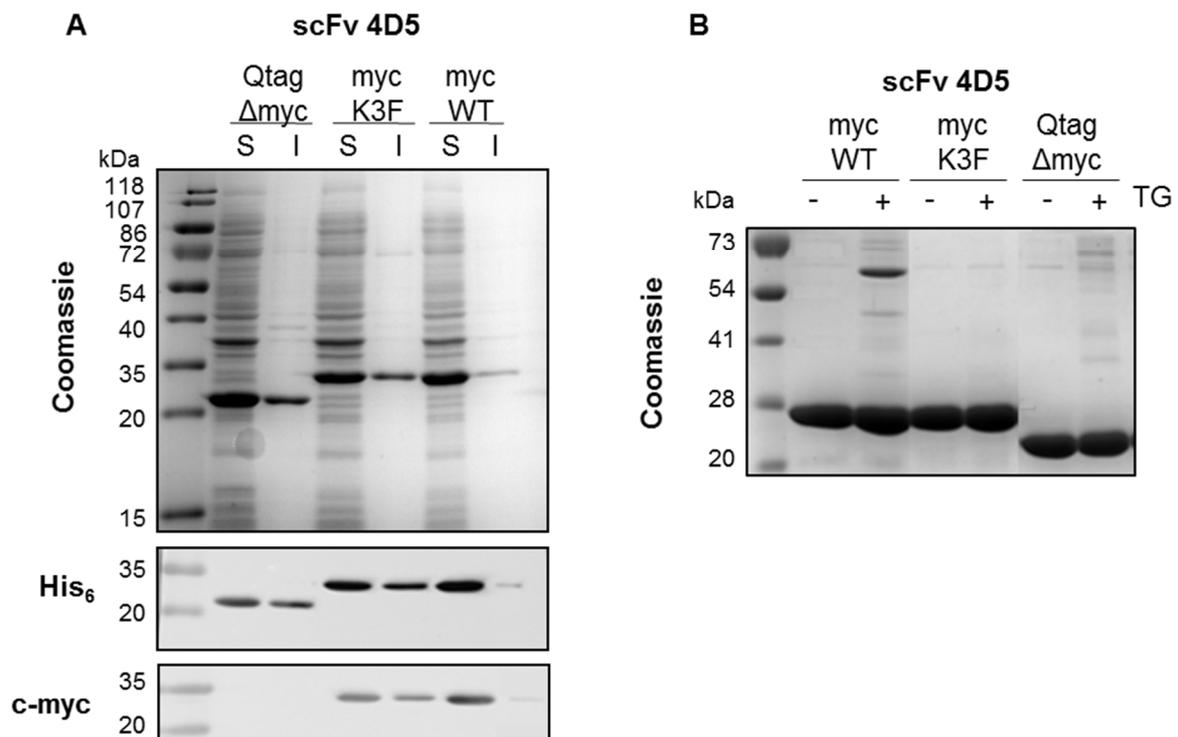


Figure 47 : Constructions alternatives au scFv 4D5 Qtag-myc. A) Production cytoplasmique des scFv 4D5-Qtag, -myc WT, -myc K3F avec S : fraction soluble et I : fraction insoluble. Dépôt sur SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie ou détection par un anti-polyhistidine HRP ou un anti-c-myc produit en souris puis un anti souris HRP. Les échantillons sont en conditions réductrices et proviennent de 10 μ L de culture bactérienne en Coomassie et 2 μ L en WB. B) Incubation des scFv avec 0.6 U TG/ μ mol scFv pendant 16h à 37°C puis dépôt de 5 μ g sur SDS-PAGE en conditions réductrices.

En revanche, lorsque l'on ajoute 40 fois plus d'amine azide que de scFv, il n'y a presque plus de dimères, même dans le cas du scFv 4D5 myc WT (Figure 48A). Dans ce cas, l'amine du linker est en compétition avec l'amine de la lysine du peptide c-myc. Comme ce linker est en large excès, il y aura plus de chance que la glutamine du Qtag soit couplée à celui-ci. Après élimination de l'excès de linker, la révélation en fluorescence montre que la mutation K3F diminue l'efficacité de couplage par rapport au myc WT et qu'il y a un rendement comparable entre le myc WT et le Qtag. Une tendance identique a été observée avec le linker amine DBCO, avec encore plus de différence entre le myc WT et le myc K3F en terme de rendement (non représenté ici). Nous avons alors choisi de poursuivre avec le scFv 4D5 Qtag à cause des traces de dimères présentes avec scFv 4D5 myc WT.

La Figure 48B schématise la formation des dimères de scFv. Avec le scFv 4D5 Qtag-myc, on observait des dimères fluorescents mais pas avec le scFv 4D5 myc WT. Ceci s'explique par le fait qu'il y a deux glutamines substrats de la TG dans le Qtag-myc. Même si la glutamine du myc est impliquée dans une réaction avec une lysine, celle du Qtag reste libre et accessible au linker azide. A l'inverse, si la glutamine du Qtag est impliquée dans une réaction avec une lysine, celle du myc reste libre d'être conjuguée avec une amine. Comme ces 2 résidus sont plus éloignés que la lysine et la glutamine du tag myc qui sont voisines, ce cas de figure est peut-être moins fréquent que le précédent. Les scFv 4D5 myc K3F et Qtag ne forment quant à eux pas de dimères faute de lysine à proximité de leur substrat glutamine.

Peu après l'obtention de ce résultat, un article a décrit le peptide c-myc comme étant un substrat de la TG (Dennler et al., 2015). Ceci confirme donc nos observations.

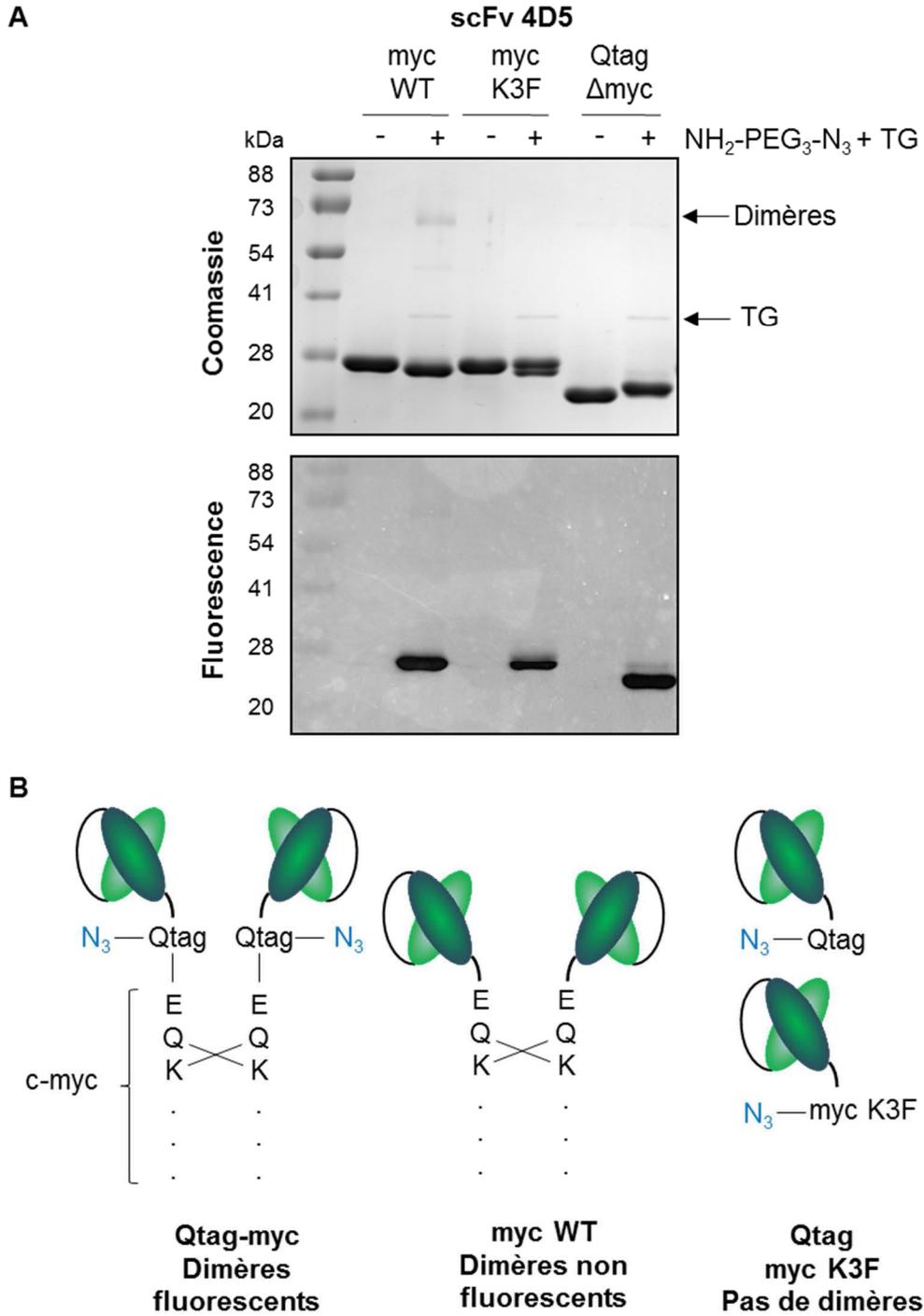


Figure 48 : A) Dérivation des scFv par 40 équivalents molaires de NH₂-PEG₃-N₃ et 15 U TG/ μ mol pendant 16h à 37°C. Après élimination du linker en excès, détection de l'azide par DBCO-PEO₄-CR110 et dépôt de 2 μ g sur SDS-PAGE en conditions réductrices. La flèche représente la TG qui a une masse de 38 kDa. B) Schéma des glutamines et lysines impliquées dans la formation des dimères de scFv.

b. Dérivation du Fc

Le Fc AKT(H)₆Q initial a été rapidement écarté par abandon de l'utilisation du PLP. A partir de celui-ci, nous avons construit le Fc A(HG)₃Q par insertion d'oligonucléotides hybridés. Celui-ci permettait de tester les stratégies des bis-sulfones et celle de la TG sur un même Fc. Lorsque ce Fc a été incubé avec de la TG, des multimères de Fc sont apparus en conditions non réductrices et les dimères se sont révélés en partie non réductibles (Figure 49A). Ces multimères sont moins nombreux lorsque l'amine azide est ajoutée en plus de la TG (piste 3 et 9) mais leur quantité est loin d'être négligeable malgré un excès de 10 amines par Qtag.

Nous avons suspecté que la présence d'une lysine dans la région charnière de l'IgG1 humaine en position 222 (numérotation EU) pourrait être responsable de la formation de ces liaisons covalentes car seulement 5 résidus la séparent de la glutamine du Qtag. Cette position a donc été mutée en alanine par mutagenèse dirigée à partir du Fc A(HG)₃Q. Le Fc A(HG)₃Q K222A obtenu a alors été produit et purifié comme décrit précédemment. Lorsque ce Fc est mis en réaction avec l'amine azide dans les mêmes conditions que précédemment, les multimères et dimères non réductibles disparaissent quasiment totalement (Figure 49A, pistes 6 et 12 comparées aux pistes 3 et 9). Cette substitution a également pour conséquence d'améliorer considérablement le rendement de réaction d'après l'intensité de fluorescence. En effet, lorsque la glutamine est impliquée dans une réaction de couplage avec la lysine 222, elle n'est plus disponible pour l'amine. La substitution de cette lysine rend à nouveau la glutamine accessible et le dimère de Fc devient monomérique après réduction (Figure 49B). La réaction glutamine-lysine peut également se faire entre 2 Fc différents ce qui cause l'apparition de multimères en conditions non réductrices.

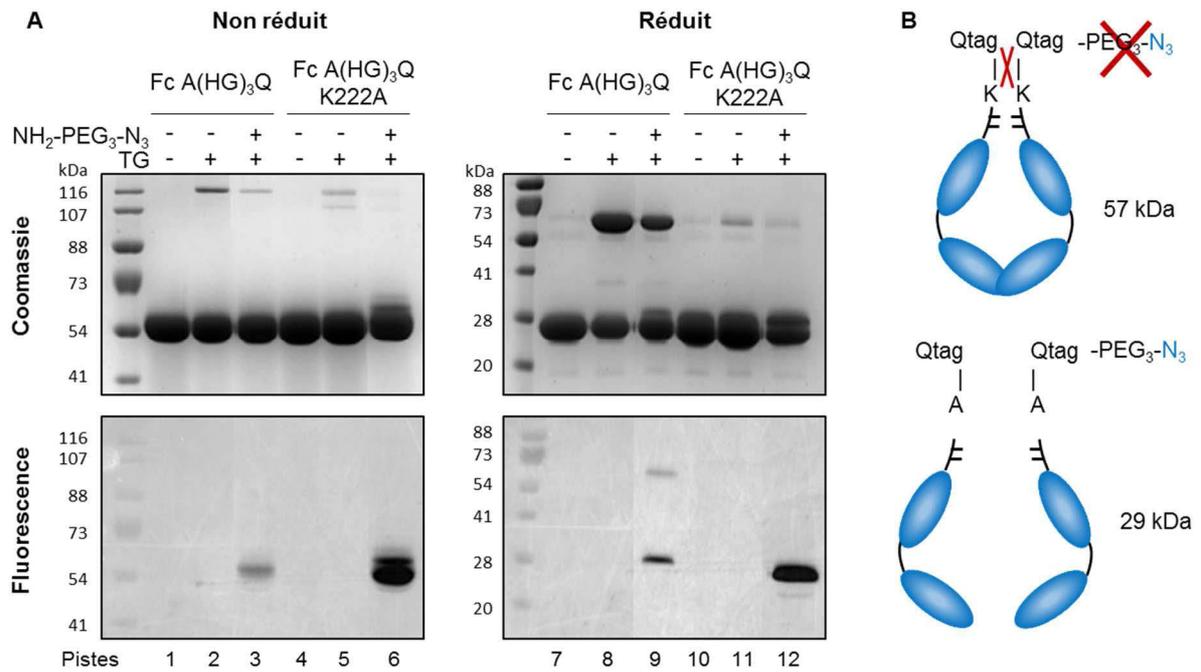


Figure 49 : Dérivation du Fc A(HG)₃Q par la TG. A) Couplage de 20 équivalents de NH₂-PEG₃-N₃ par Fc A(HG)₃Q +/- K222A catalysé par 4 U TG/μmol Fc pendant 16h à 37°C. Après élimination de l'amine en excès, détection de l'azide par le DBCO-PEO₄-CR110 puis dépôt de 5 μg sur SDS-PAGE. B) Schéma de formation des liaisons covalentes entre glutamine et lysine sur le Fc A(HG)₃Q.

En parallèle à ces tests avec la TG, les bis-sulfones se sont révélées non spécifiques du tag (His-Gly)₃ (Figure 40). Ce tag a alors été supprimé du Fc car il devenait inutile. Le nouveau Fc utilisé est appelé Fc Qtag K222A. Il a été produit et purifié comme décrit précédemment. Cependant, nous avons observé un rendement de couplage de l'amine azide très nettement inférieur au rendement obtenu avec l'ancien Fc A(HG)₃Q K222A (Figure 50, pistes 4 et 10 comparées aux pistes 6 et 12).

Le scFv 4D5 Qtag et le Fc A(HG)₃Q K222A ont été déposés pour avoir la même quantité de matière de Qtag (donc deux fois moins de Fc que de scFv). On peut alors directement comparer l'intensité de fluorescence pour comparer les rendements. La conjugaison a donc eu lieu à des taux similaires en conditions réductrices (pistes 8 et 12). En conditions non réductrices, il est plus difficile de les comparer car plusieurs populations de Fc sont présentes (pistes 2 et 6).

Pour tenter d'expliquer la différence de réactivité entre ces 2 Fc, ils ont été digérés et analysés par LC/MS. Les peptides obtenus avec les meilleurs scores sont détaillés dans le Tableau 8.

Fc Qtag K222A	MW	MW théorique	Fc A(HG) ₃ Q K222A	MW	MW théorique
ALLQGARSD	931,51	929,49	GHGHGLLQGARSD	1306,66	1303,64
ALLQGARSDATHTCPPCPAPE	2250,45	2248,04	HGHGLLQGARSD	1249,04	1246,62
LLQGARSDATHTCPPCPAPE	2180,02	2177,00	HGLLQGARSD	1055,13	1052,54
LQGARSDATHTCPPCPAPE	2066,73	2063,92			
QGARSDATHTCPPCPAPE	1953,34	1950,83			

Tableau 8 : Peptides N-terminaux obtenus après digestion et analyse LC/MS des Fc Qtag K222A et Fc A(HG)₃Q-K222A. Les masses (MW) sont données en daltons. En rouge : séquence entière du Qtag.

Il semble que les 2 constructions subissent des dégradations N-terminales et/ou des problèmes de clivage du peptide signal ce qui engendre la perte de la séquence complète LLQGA du Qtag dans certaines populations de Fc Qtag K222A. Dans le cas du Fc A(HG)₃Q K222A, le Qtag est toujours présent car il est plus éloigné de l'extrémité N-terminale. Cette hétérogénéité de populations est peut-être à l'origine de la présence de 2 populations distinctes de Fc Qtag K222A non traité sur bleu de Coomassie en conditions réductrices (Figure 50, piste 9). A l'inverse, le Fc A(HG)₃Q K222A ne semble présenter qu'une population à l'état d'origine puis 2 populations après couplage (pistes 11 et 12). Ceci correspond sans doute à une partie non conjuguée (taille la plus faible) et une partie conjuguée (taille la plus haute). Le Fc A(HG)₃Q K222A est donc le Fc qui sera utilisé pour coupler le scFv 4D5 Qtag.

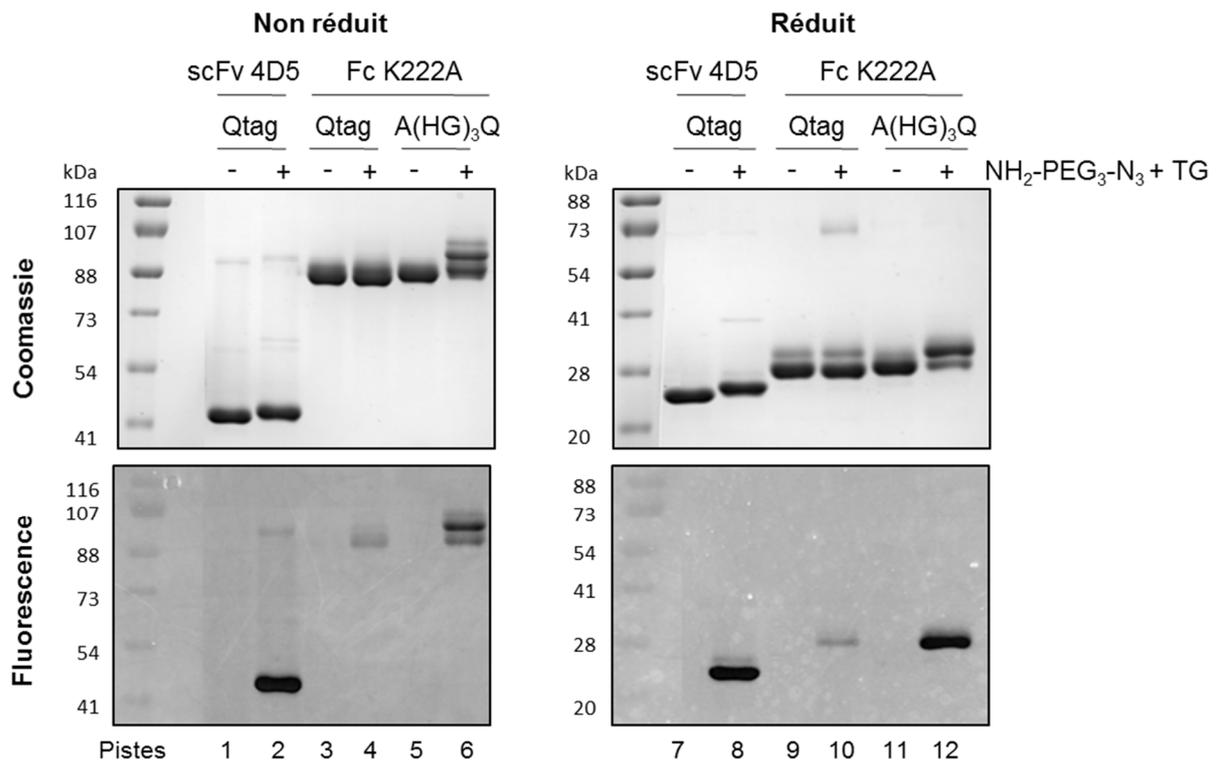


Figure 50 : Comparaison du couplage de 40 équivalents de NH₂-PEG₃-N₃ par Qtag sur le scFv 4D5 Qtag, le Fc A(HG)₃Q K222A et le Fc Qtag K222A catalysé par 15U TG/μmol/Qtag pendant 16h à 37°C. Après élimination de l'amine en excès, détection de l'azide par le DBCO-PEO₄-CR110 puis dépôt de 2μg de scFv et 1.9μg de Fc sur SDS-PAGE.

c. Optimisation des conditions de couplage

Les TG microbiennes, et en particulier celle de *S. mobaraensis*, sont inhibées par certains cations divalents comme le Cu^{2+} . Environ 20% d'inhibition d'activité a été observée avec 1mM de chlorure de cuivre (Damodaran, 2000). Cette concentration est de l'ordre de grandeur de celles utilisées pour oxyder le scFv 4D5 Qtag. Nous avons donc comparé le rendement de couplage de l'amine DBCO sur le scFv en présence ou non de sulfate de cuivre. La Figure 51A montre qu'il n'y a pas de diminution de l'efficacité de conjugaison en présence de cuivre, et ce malgré une faible quantité d'enzyme utilisée.

Comme le scFv précipite en l'absence d'imidazole, l'influence de l'imidazole sur l'activité de la TG a été évaluée sur le Fc A(HG)₃Q auquel ont été ajoutés 200mM d'imidazole. Plus précisément, c'est la capacité de formation de liaisons glutamine-lysine empêchant la réduction des dimères de Fc qui a été évaluée. La Figure 51B montre que la TG provoque l'apparition de multimères en conditions non réductrices et est capable d'empêcher totalement cette réduction lorsqu'elle est utilisée en quantité équivalente à la quantité précédemment décrite pour dériver les glutamines 295 et 297 (Lhospice et al., 2015). La présence d'imidazole n'a aucun impact sur la formation de ces liaisons covalentes. Cette absence de réduction n'était pas complète dans la Figure 49 car 3 fois moins de TG avait été utilisée. Cette propriété inattendue du Fc A(HG)₃Q sera exploitée dans la partie suivante.

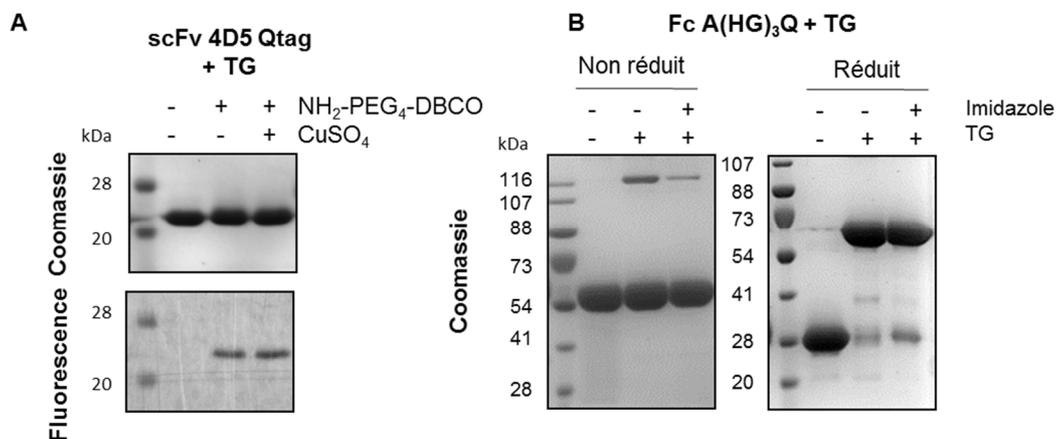


Figure 51 : Influence de la présence de sulfate de cuivre (1.2 mM) et d'imidazole (200mM) sur l'activité de la TG. A) Couplage de 10 équivalents molaires de NH₂-PEG₄-DBCO sur le scFv 4D5 Qtag catalysé par 0.6 U TG/μmol pendant 16h à 37°C en présence ou non de 1.2mM de CuSO₄. Après élimination de l'amine en excès, détection par couplage à l'azide fluor 488 et dépôt de 2.5μg sur SDS-PAGE en conditions réductrices. B) Incubation du Fc A(HG)₃Q avec 11 U TG/μmol/Qtag pendant 16h à 37°C en présence ou non de 200mM d'imidazole puis dépôt de 5μg sur SDS-PAGE.

Ces deux tests montrent que les réactions sur le scFv pourront se faire en présence d'imidazole et de sulfate de cuivre, ce qui permettra de s'affranchir d'une étape de dessalage

suite à l'oxydation du scFv. L'éventuel impact de l'utilisation de TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM) au lieu du PBS n'a pas été évalué mais du Tris 25mM, NaCl 150mM a déjà été utilisé précédemment (Strop et al., 2013). De plus, le Tris est une amine primaire mais elle est tri-substituée en alpha, ce qui lui donne une structure très différente de celle des linkers précédemment utilisés pour le greffage sur des anticorps. Nous avons donc supposé que notre tampon serait également compatible.

La TG permet la fixation d'azide ou de DBCO sur un Fc ou un scFv mais il est crucial que cette conjugaison ait lieu sur le Qtag. En effet, dans le cas contraire, le (scFv)₂-Fc obtenu après couplage des 2 fragments n'aurait pas une structure semblable aux immunoglobulines classiques et il risquerait de perdre ses propriétés de liaison à l'antigène et/ou ses fonctions effectrices, voire de ne pas être stable. Pour vérifier la spécificité de couplage, un Fc commercial sans Qtag a été mis en présence d'amine azide ou DBCO et de TG. D'après la Figure 52, ce Fc est inerte vis à vis de la TG quelle que soit l'amine utilisée (pistes 3 et 8). Le scFv et le Fc sont déposés de telle sorte à avoir la même quantité de matière de Qtag (donc deux fois moins de Fc que de scFv) et la fluorescence obtenue est comparable donc l'amine azide se fixe de la même façon sur ces deux fragments, et ce malgré des tampons de réaction différents (pistes 4, 5 et 9). Ce résultat prouve qu'il sera possible d'extrapoler les résultats d'optimisation de couplage du Fc au scFv ou inversement. La fixation de l'amine DBCO est en revanche légèrement inférieure à celle de l'amine azide.

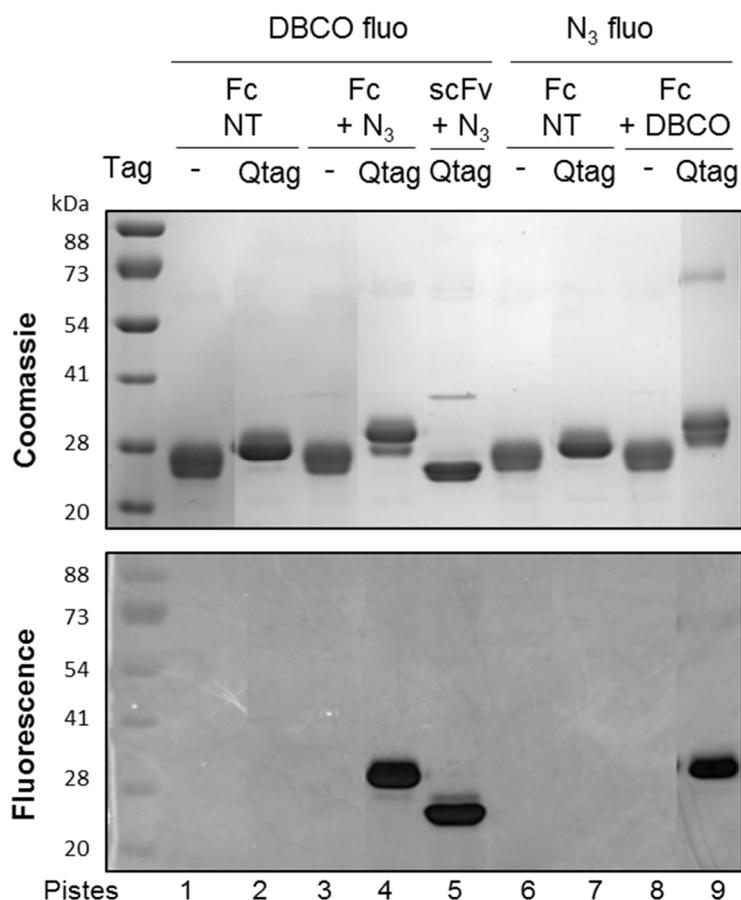


Figure 52 : La dérivation à la TG est spécifique du Qtag. Couplage de 10 équivalents molaires de NH₂-PEG₄-DBCO ou NH₂-PEG₃-N₃ par Qtag sur le Fc sans tag (-), le Fc A(HG)₃Q K222A (Qtag) et le scFv 4D5 Qtag, catalysé par 15U TG/μmol/Qtag pendant 16h à 37°C. Après élimination de l'amine en excès, le fluorophore complémentaire est couplé puis 2 μg de scFv ou 1.9 μg de Fc sont déposés sur SDS-PAGE en conditions réductrices.

L'influence de l'excès d'amine et de la quantité d'enzyme sur le rendement de dérivation par l'azide et le DBCO ont été évaluées sur le scFv 4D5 Qtag en tampon TBS imidazole 200mM pH 7.5 CuSO₄ 0.8mM. La TG étant plus lourde que le fragment d'anticorps, il n'est pas possible de l'éliminer par dessalage en même temps que l'amine excédentaire. Le nombre d'équivalents molaires par Qtag ainsi que le nombre d'unités de TG par μmol de scFv et par glutamine réactive correspondent aux plus faibles quantités (10 équivalents et 15 U/μmol/Q) (Lhospice et al., 2015) ainsi qu'à la plus grande quantité d'amine (40 équivalents) et à la moitié de la plus grande quantité de TG (225 U/μmol/Q) utilisées dans la littérature (Dennler et al., 2014). Le rendement semble légèrement meilleur avec un plus large excès d'amine (Figure 53). En revanche, la quantité de TG ne semble pas vraiment influencer. Avec l'amine DBCO, on observe la formation d'une quantité négligeable de dimères de scFv qui ne sont pas visibles avec l'amine azide.

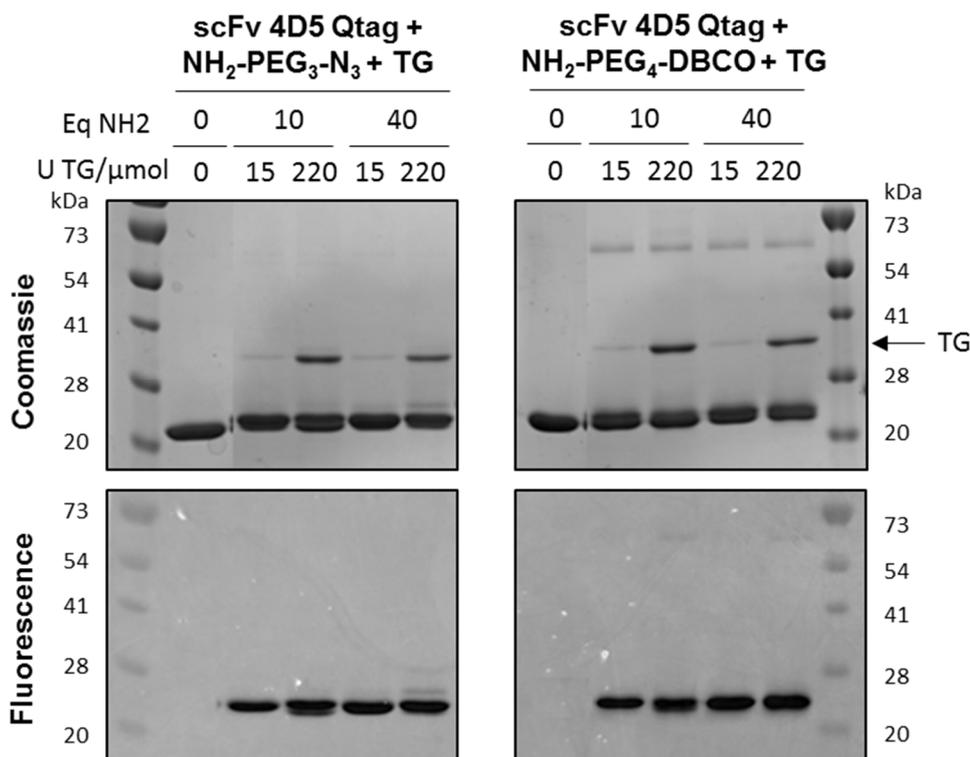


Figure 53 : Influence de l'excès d'amine et de la quantité de TG sur la dérivation du scFv 4D5 Qtag. A gauche : amine-PEG₃-azide. A droite : amine-PEG₄-DBCO. Le scFv est dérivé par 10 ou 40 équivalents molaires d'amine avec 15 ou 225 U TG/μmol scFv pendant 16h à 37°C. Après élimination de l'excès d'amine, le fluorophore complémentaire est couplé puis 2μg de scFv sont déposés sur SDS-PAGE en conditions réductrices. La flèche indique la TG à 38 kDa.

Comme l'encombrement stérique peut s'avérer critique lors du couplage entre deux protéines, nous avons également testé un linker plus long : l'amine-PEG₁₂-azide, qui a été synthétisée par le Dr Sylvain Ursuegui (Université de Strasbourg). Cette amine sera comparée à l'amine-PEG₃-azide utilisée jusqu'à maintenant. D'après la Figure 54, un excès de 40 molécules d'amines par Qtag donne un rendement beaucoup plus faible qu'un excès de 10 par Qtag, quelle que soit la longueur du linker. Ceci est contraire à ce qui a été obtenu dans le cas du scFv où un plus large excès augmentait légèrement le rendement (Figure 53). Cependant, dans le cas de celui-ci, la concentration finale en amine était de 1.2mM avec un pourcentage volumique de DMSO dans le tampon de 5% alors que dans le cas du Fc, la concentration finale en amine est de 4.7mM et le DMSO est à 9%. Il y a donc plus d'amine et proportionnellement moins de DMSO. Elle a donc peut être précipité ce qui l'a rendue non réactive. Le pourcentage de DMSO peut également avoir influé sur l'activité de la TG mais il est difficile d'envisager d'en mettre moins avec un excès de 40 par Qtag et une concentration en Fc d'environ 3 mg/mL car l'amine ne peut pas être solubilisée à une concentration très supérieure à 50mM, qui est la concentration du stock utilisé pour cet expérience. La fluorescence montre ensuite que le linker le plus court donne un meilleur rendement. Ceci

s'observe également en bleu de Coomassie où il y a 2 populations de Fc : une correspondant au Fc conjugué et une autre au Fc non conjugué de taille plus faible. Avec 20 équivalents d'amine-PEG₃-azide, la population conjuguée est majoritaire, contrairement aux conditions qui fonctionnent moins bien. Enfin, il n'y a aucune différence entre 18h et 41h de réaction, donc la réaction arrive déjà à saturation après 18h à 37°C.

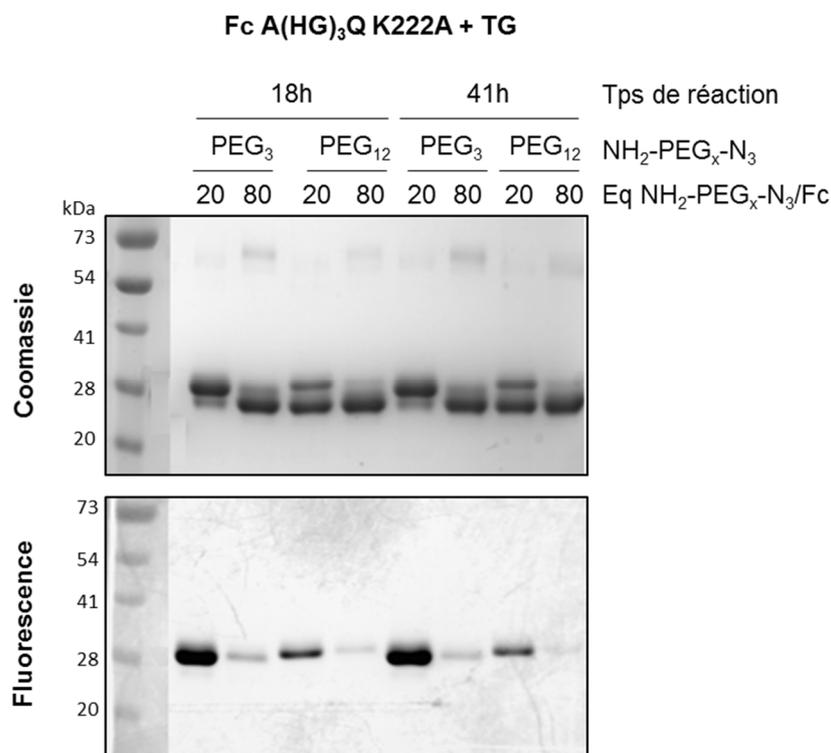


Figure 54 : Influence de l'excès d'amine, de la longueur du linker et du temps de réaction sur la dérivation du Fc A(HG)₃Q K222A par une amine-PEG_x-azide. Le Fc est mis en réaction avec 20 ou 80 équivalents molaires d'amine par Fc et 30 U TG/μmol Fc pendant 18h ou 41h à 37°C. Cette amine contient 3 ou 12 motifs PEG. Après élimination de l'excès de ce composé, détection par le DBCO-PEO₄-CR110 puis dépôt de 2μg sur SDS-PAGE en conditions réductrices.

Désormais, 10 équivalents molaires d'amine sont utilisées par Qtag pour éviter sa précipitation et faciliter son élimination, ainsi que 15 U TG/μmol/Qtag, et ce pendant 16h à 18h à 37°C. Dans certaines études, le couplage à la TG est réalisé en PBS à pH 8 (Jeger et al., 2010; Strop et al., 2013). Ici nous sommes à pH 7.5 dans le cas du scFv et à pH 7.2-7.4 dans le cas du Fc. L'influence du pH a été évaluée par couplage d'amine azide sur le Fc A(HG)₃Q K222A. Les pH 6.6 et 7.4 donnent des greffages similaires (Figure 55A). En revanche, un pH supérieur à 8.1 conduit à un moins bon rendement. Du PBS à pH 7.4 a ensuite été dilué d'un facteur 2, 4 et 10 par de l'eau pour déterminer l'influence de la force ionique (Figure 55B). Les meilleures efficacités sont obtenues pour un PBS 1x, voire 0.5x de façon identique. Ces conditions de pH et de force ionique sont celles qui avaient été utilisées jusqu'à maintenant.

Fc A(HG)₃Q K222A + NH₂-PEG₃-N₃ + TG

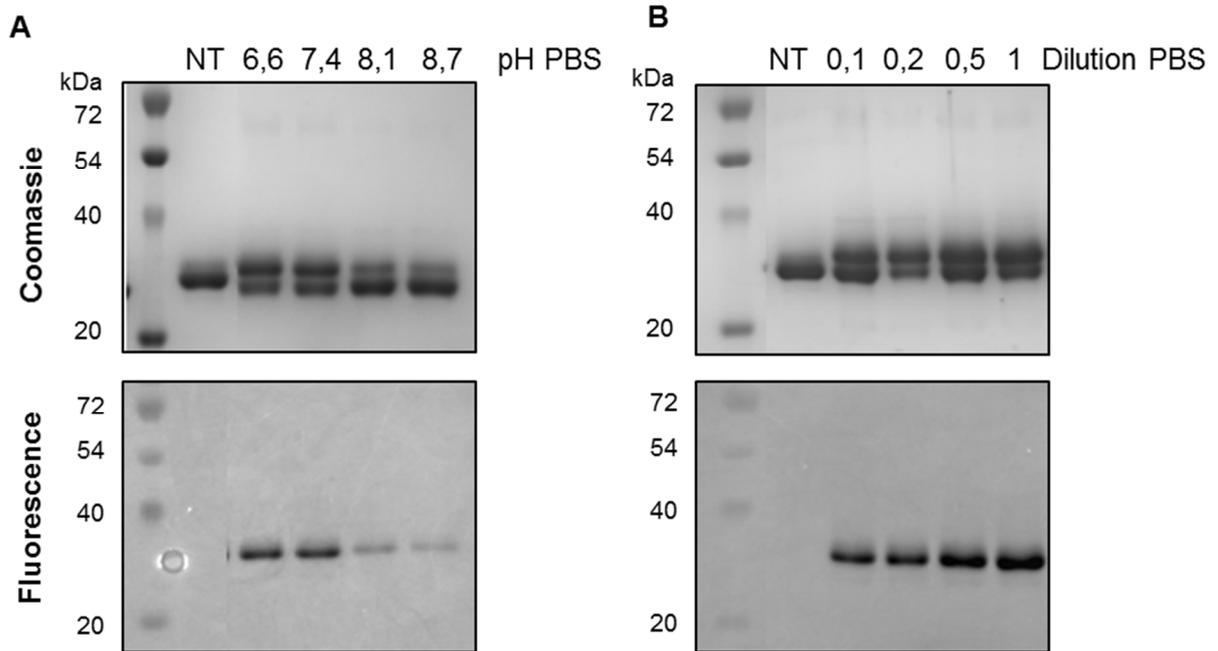


Figure 55 : Influence du pH et de la force ionique sur le couplage à la TG. Le Fc A(HG)₃Q K222A est dérivé par 10 équivalents molaires d'amine-PEG₃-azide / Qtag et 15 U TG/μmol/Qtag pendant 16h à 37°C. L'azide est détecté par couplage de 30 équivalents molaires de DBCO-PEO₄-CR110 / Qtag pendant 24h à TA puis 2μg sont déposés sur SDS-PAGE en conditions réductrices. A) Réaction dans du PBS à pH 6.6, 7.4, 8.1 ou 8.7. B) Réaction dans du PBS pH 7.4 1x, 0.5x, 0.25x ou 0.1x.

6. Transglutaminase et dérivation des cystéines

Nous avons montré que l'ajout de TG au Fc A(HG)₃Q empêchait sa dissociation par formation de liaisons covalentes entre des glutamines et des lysines, et ce même après réduction de ses ponts disulfures (Figure 51B). Nous avons alors émis l'hypothèse qu'il devenait possible de dériver les cystéines de la région charnière après avoir stabilisé le Fc sous forme dimérique grâce à cette TG.

Pour cela, le Fc a été mis en présence de TG, réduit au TCEP, puis ses cystéines libres ont été dérivées par du maléimide-PEG₄-DBCO. La Figure 56A confirme que la TG est capable de former des liaisons covalentes empêchant totalement la réduction des dimères de Fc (piste 7). On observe également l'apparition de multimères de Fc qui correspondent à des couplages entre 2 Fc différents. La fixation du maléimide est spécifique des cystéines de la charnière car elle ne se produit que lorsque le Fc a été réduit au TCEP (pas de fluorescence dans les pistes 4 et 9). Le rendement de couplage du maléimide est le même que le Fc soit préalablement stabilisé par la TG ou non (pistes 3 et 5) ce qui prouve que la présence de ces liaisons covalentes glutamine-lysine interchaines ne perturbe pas le greffage.

Ce Fc A(HG)₃Q stabilisé à la TG, réduit, puis dérivé par du maléimide conserve une fixation aux FcγR I et II comparable à celle du Fc non dérivé au maléimide et au trastuzumab en cytométrie en flux (Figure 56B).

Cette nouvelle stratégie fait l'objet d'une demande de brevet pour la construction d'ADC. Elle sera prochainement appliquée à une immunoglobuline entière.

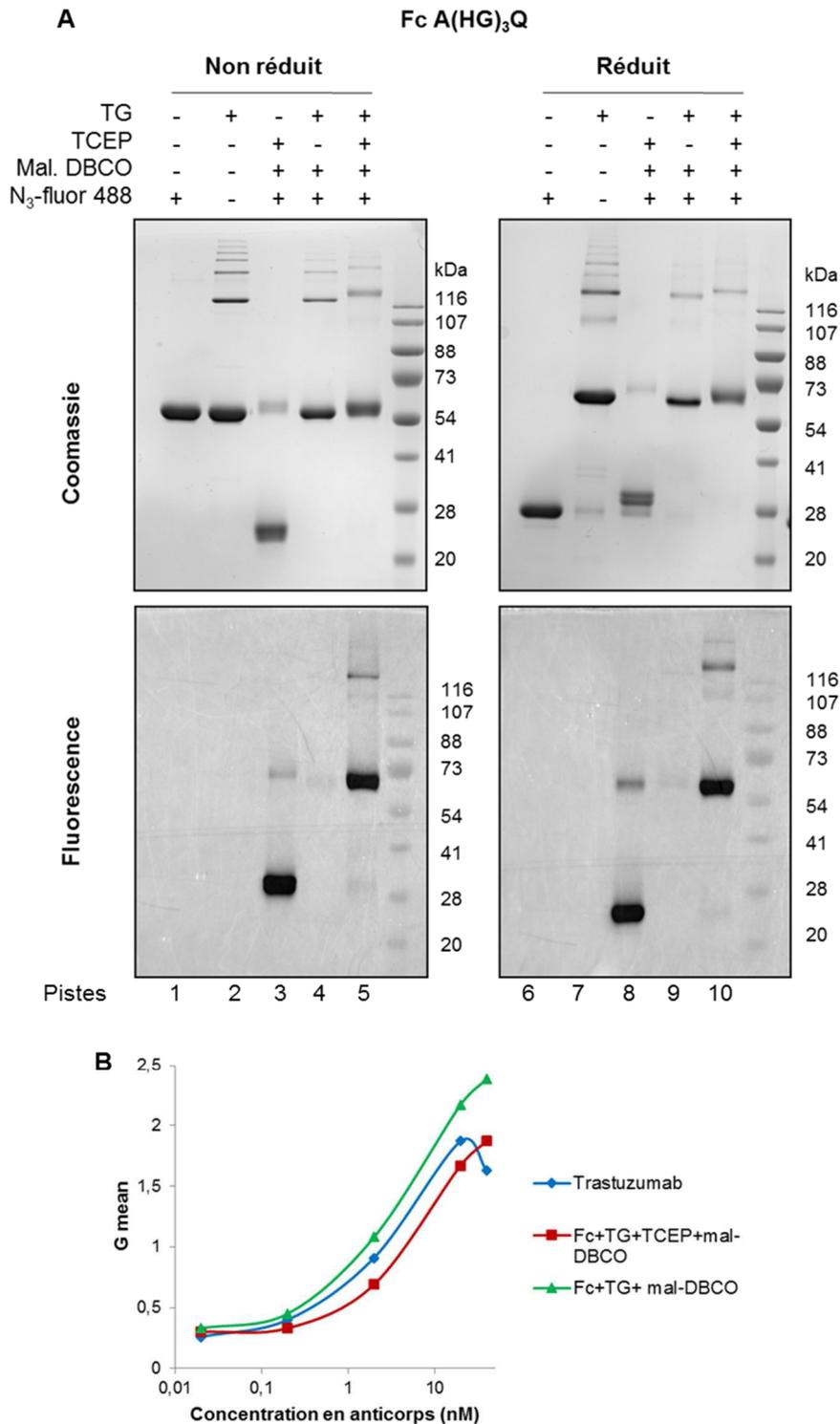


Figure 56 : Dérivation des cystéines du Fc A(HG)₃Q par le maléimide-PEG₄-DBCO. Le Fc est stabilisé par 30 U TG/μmol pendant 16h à 37°C, réduit au TCEP puis les cystéines sont dérivées grâce à 80 équivalents molaires de maléimide-PEG₄-DBCO (Mal. DBCO). Le TCEP et l'excès de maléimide sont alors éliminés. A) Détection du DBCO par couplage à l'azide fluor 488 puis dépôt de 1μg sur SDS-PAGE en conditions réductrices ou non. B) Comparaison de la liaison du trastuzumab et du Fc A(HG)₃Q stabilisé à la TG et dérivé ou non au maléimide-PEG₄-DBCO sur les FcγRI et II de la lignée U-937 par cytométrie en flux. La fixation est détectée par un anti-IgG humaine spécifique du fragment Fc couplé au FITC. La condition Fc+TG+mal-DBCO correspond à la piste 4 du SDS-PAGE où le maléimide ne se fixe pas.

D. Couplage des fragments scFv au fragment Fc par chimie click

1. Choix de la stratégie de couplage

A ce stade, plusieurs combinaisons de couplages entre le scFv et le Fc sont encore envisageables. Le Fc peut être dérivé par la transglutaminase pour introduire l'amine-PEG₃-azide ou l'amine-PEG₄-DBCO, ou bien encore stabilisé à la transglutaminase, réduit au TCEP puis dérivé sur les cystéines de la charnière par du maléimide-PEG₄-DBCO.

Le scFv 4D5 peut quant à lui être couplé à l'amine-PEG₃-azide ou à l'amine-PEG₄-DBCO par la transglutaminase, mais aussi au maléimide-PEG₄-DBCO ou à l'APN-BCN après réduction des dimères de scFv 4D5 Cys. Le maléimide-PEG₃-azide et l'APN azide pourraient également être utilisés à la place du maléimide-PEG₄-DBCO. Dans ce cas, le TCEP devrait être éliminé avant réaction avec le maléimide car il réduirait l'azide en amine, ce qui la rendrait non réactive vis à vis du DBCO. Nous avons choisi de nous focaliser sur le maléimide DBCO et l'APN-BCN pour nous affranchir d'une étape supplémentaire de dessalage qui provoquerait une diminution de la concentration du scFv ou du Fc.

Le Fc A(HG)₃Q stabilisé à la TG puis réduit possède 4 cystéines réactives vis à vis du maléimide. Il y a donc un risque de fixer 4 scFv par molécule de Fc et d'obtenir une structure trop éloignée des structures d'immunoglobulines naturelles. Pour déterminer le nombre de cystéines conjuguées par le maléimide et qui sont accessibles à un composé plus volumineux que le fluorophore utilisé précédemment (azide fluor 488) via cette stratégie, nous avons couplé à ce Fc DBCO un peptide dont l'amine N-terminale a été remplacée par une fonction azide de masse molaire égale à 1.85 kDa. La présence de 4 peptides fixés devrait générer une augmentation de masse de 7.4 kDa en conditions non réductrices. Le Fc A(HG)₃Q K222A dérivé par l'amine DBCO et la TG a été utilisé comme témoin. Il contient seulement 2 sites de couplages. Si 2 peptides-azide sont fixés sur les Qtag, on attend donc une augmentation de masse de 3.7 kDa. Le Fc A(HG)₃Q K222A dérivé par l'amine azide et la TG a servi de second témoin. Il a été dérivé par un peptide de 2.1 kDa contenant la fonction DBCO sur la chaîne latérale de sa cystéine C-terminale. Si 2 peptides DBCO sont couplés, la différence de masse devrait être de 4.2 kDa.

Les masses des peptides se sont avérées trop faibles pour évaluer précisément le nombre de peptides fixés par Fc en conditions non réductrices (Figure 57, haut). Cependant, étant donné le faible décalage de masse entre le Fc dérivé sur ces cystéines avec ou sans couplage de peptide-N₃ (pistes 3 et 4), il semble que le peptide s'est moins bien fixé que sur le Fc dérivé sur ses Qtag, et ce malgré la présence de 2 fois plus de sites potentiels. Ceci peut être causé par une faible fixation du maléimide lors de la première étape ou à une faible fixation du

peptide-N₃ sur des DBCO faiblement accessibles. Le dépôt en conditions réductrices n'apporte aucun renseignement supplémentaire sur ce Fc conjugué au maléimide car le traitement à la TG empêche sa réduction (Figure 57, bas). En revanche, dans le cas des couplages sur les Qtag il permet de déterminer un rendement global de conjugaison. En effet, il n'est pas possible de déterminer si le monomère de Fc réduit couplé à un peptide provient d'un Fc dimérique contenant un peptide sur chacune de ses chaînes ou contenant un peptide sur une chaîne et une seconde chaîne non dérivée. Ainsi, le Fc A(HG)₃Q K222A-N₃ a été dérivé par le peptide DBCO à hauteur de 69% (piste 6) et le Fc A(HG)₃Q K222A-DBCO a été dérivé par le peptide N₃ à hauteur de 38% (piste 2). En considérant que les réactions entre le Fc-N₃ et le peptide-DBCO et entre le Fc-DBCO et le peptide-N₃ ont le même rendement, les rendements de dérivation de ce fragment par l'amine N₃ et DBCO sont au minimum de 69% et 38%. Ils pourraient être supérieurs dans le cas où la réaction de couplage des peptides sur le Fc ne serait pas totale.

Il faut noter que l'augmentation de masse consécutive à l'ajout du peptide-DBCO sur le Fc A(HG)₃Q semble beaucoup plus importante que les 4.2 kDa attendus (piste 6, gel non réducteur). Néanmoins cet écart est trop faible pour correspondre à des multimères de Fc. En revanche, en conditions réductrices on observe une variation de masse normale.

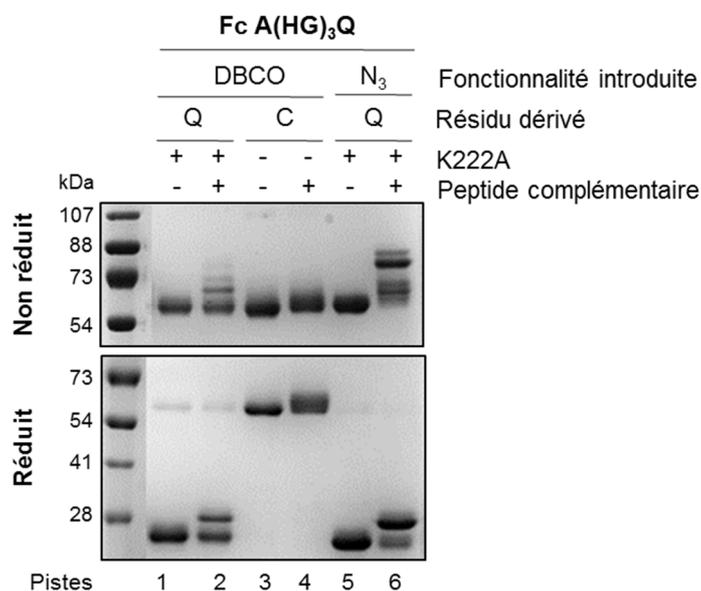


Figure 57 : Comparaison de l'efficacité de dérivation du Fc A(HG)₃Q par le maléimide DBCO ou l'amine DBCO ou azide par couplage de peptides. Q : le Fc A(HG)₃Q K222A est dérivé par 20 éq molaires d'amine-PEG₄-DBCO (DBCO) ou d'amine-PEG₃-azide (N₃) et 30 U TG/μmol pendant 16h à 37°C. Après élimination de l'excès d'amine, 20 éq molaires de peptide-N₃ ou peptide-DBCO sont couplés pendant 5h à TA. C : le Fc A(HG)₃Q est stabilisé par 30 U TG/μmol pendant 16h à 37°C, réduit par 200 éq de TCEP pendant 1h30 à 37°C, puis couplé avec 80 éq molaires de maléimide-PEG₄-DBCO pendant 1h à TA (20 éq par Cys). Après élimination de l'excès de maléimide et du TCEP, le Fc est mis en réaction avec 40 éq molaires de peptide DBCO pendant 5h à TA. 1μg de Fc est déposé sur SDS-PAGE en conditions non réductrices (haut) et réductrices (bas) avant et après réaction avec le peptide approprié, puis coloré au bleu de Coomassie.

Pour déterminer la cause du mauvais rendement de couplage du peptide-N₃ sur le Fc dérivé au maléimide DBCO, ce Fc a été couplé à un azide fluorescent. L'intensité de fluorescence a été comparée à celle obtenue lors de la fixation du maléimide DBCO sur le scFv 4D5 Cys-myc dans les mêmes conditions de réaction. Pour cela, les échantillons ont été déposés sur SDS-PAGE de telle sorte que la même quantité de matière de fluorophore soit présente, c'est à dire 4 fois moins de Fc que de scFv donc 0.9 µg de Fc à 53.9 kDa et 2.1 µg de scFv à 30.1 kDa. Pour comparer toutes les stratégies restantes, le scFv 4D5 Qtag et le Fc A(HG)₃Q K222A dérivés par l'amine-N₃ ou DBCO ont également été déposés (2 µg de scFv à 28.8 kDa et 1.9 µg de Fc à 53.9 kDa, soit 2 fois moins de Fc que de scFv en quantité de matière). La comparaison des intensités de fluorescence de la Figure 58 montre donc que :

- La dérivation au maléimide est du même ordre de grandeur sur le scFv que sur le Fc (pistes 2 et 4).
- L'introduction de DBCO est plus efficace via une amine par catalyse à la TG sur le scFv 4D5 Qtag que via un maléimide sur le scFv 4D5 Cys-myc (pistes 1 et 2). Logiquement, la stratégie de la TG se révèle également plus efficace que celle du maléimide sur le fragment Fc (pistes 3 et 4).

Le mauvais rendement de couplage du peptide-N₃ observé dans la Figure 57 semble donc être dû à un problème de greffage du maléimide, malgré la présence de 4 cystéines proches sur le Fc A(HG)₃Q. De plus, il pourrait également être plus difficile de greffer un scFv de 30 kDa qu'un fluorophore de moins d'un kDa dans cette région du Fc qui est probablement un peu encombrée à cause des liaisons covalentes formées par la TG. Nous n'avons donc pas testé le couplage d'un scFv sur ce Fc A(HG)₃Q stabilisé à la TG, réduit au TCEP puis dérivé au maléimide.

- La fonctionnalité azide est mieux introduite que le DBCO, aussi bien sur le scFv que sur le Fc (pistes 1, 3, 5 et 6). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'amine DBCO a tendance à précipiter plus que l'amine azide en tampon de réaction (PBS ou TBS imidazole 200mM). Il n'est pas possible d'augmenter le pourcentage de DMSO pour augmenter sa solubilité car on risque alors de faire agréger les fragments d'anticorps.
- Globalement les couplages sur les scFv et sur les Fc sont comparables pour une même stratégie et une même fonctionnalité introduite.

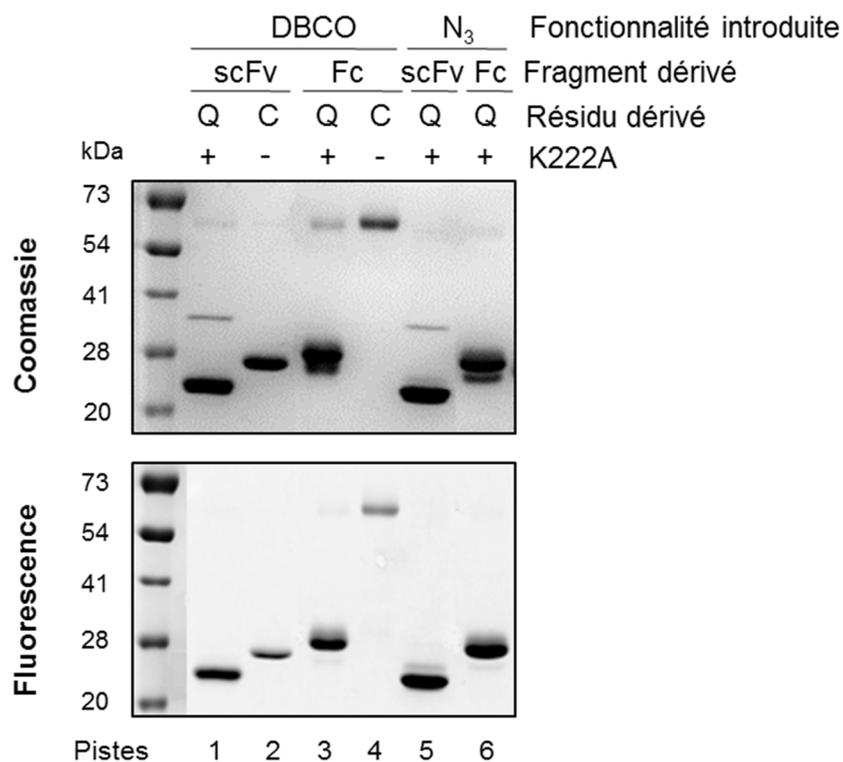


Figure 58 : Comparaison de l'efficacité de couplage de dérivation du scFv 4D5 Qtag et du Fc A(HG)₃Q K222A par l'amine-DBCO ou -N₃, ainsi que du scFv 4D5 Cys et du Fc A(HG)₃Q par le maléimide-DBCO par révélation en fluorescence. C : dérivation sur une/plusieurs cystéine(s). Q : dérivation sur la glutamine du/des Qtag. Les fragments sont dérivés dans les conditions optimales précédemment décrites pour chaque stratégie puis déposés sur SDS-PAGE en conditions réductrices.

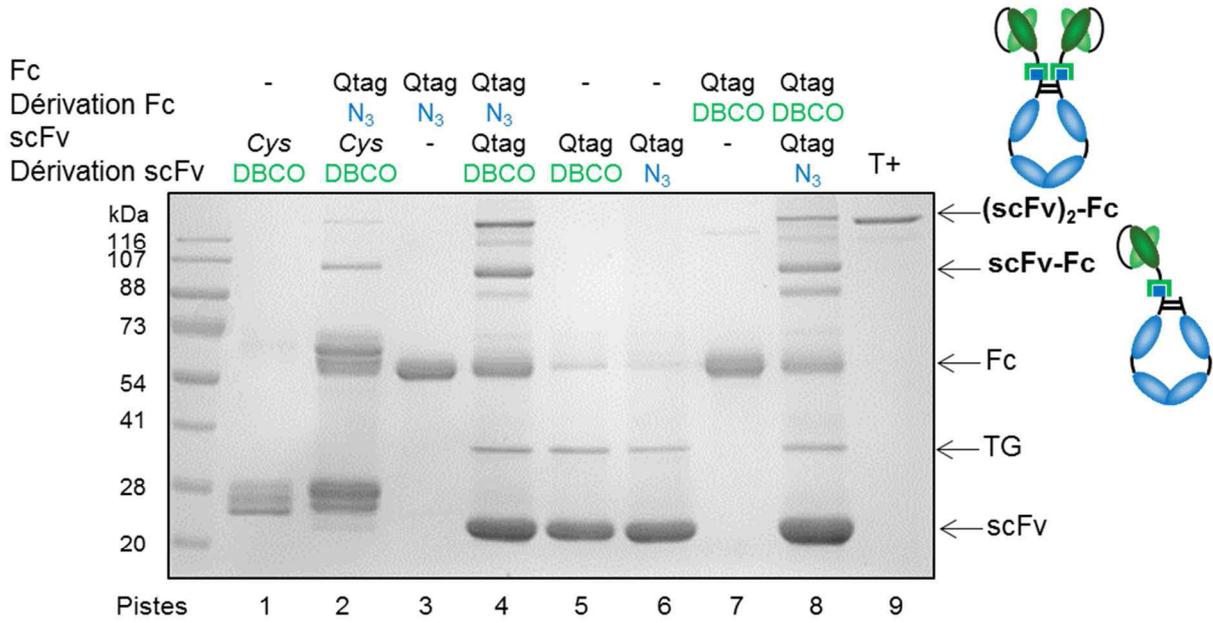
Suite à ces résultats, nous avons poursuivi avec la stratégie de la TG pour dériver le fragment Fc par l'azide ou le DBCO. Le scFv 4D5 Qtag donne de meilleurs rendements de dérivation que le scFv 4D5 Cys-myc. Cependant, lors d'un couplage scFv + Fc, le scFv sera utilisé en excès molaire par rapport au Fc. Le pourcentage de conjugaison du scFv par l'azide ou le DBCO pourrait donc ne pas être limitant. Ainsi, les scFv 4D5 Cys-myc et Qtag ont été couplés au fragment Fc. Ils ont d'abord été dérivés dans les conditions optimales précédemment décrites. En parallèle, le Fc A(HG)₃Q K222A a été dérivé par une amine via la TG. Les scFv et Fc ont alors été incubés pendant 66h à 37°C en utilisant 10 équivalents molaires de scFv par Fc (soit 5 équivalents par site de couplage). Cette durée de réaction est nettement supérieure à ce qui est préconisé dans la littérature et les fiches techniques des composés pour coupler les fonctions azide et DBCO. En effet, la température ambiante ou de 4°C sont habituellement décrites pour ce type d'addition. Ici, les 37°C permettent de favoriser la diffusion des molécules. Ces conditions « extrêmes » sont utilisées dans le but de maximiser le rendement de réaction.

Les mélanges scFv + Fc entraînent l'apparition de deux populations de poids moléculaires supérieurs à celui du fragment Fc (Figure 59A, pistes 2, 4 et 8). La population la plus haute correspond au Fc couplé à deux scFv : (scFv)₂-Fc. Son poids moléculaire est légèrement supérieur à celui du témoin positif (piste 9) car il contient des résidus en plus (constituant les tags) et les linkers azide et DBCO constitués au total de 7 PEG sur chaque site de couplage. La population intermédiaire correspond très certainement à un Fc couplé à un seul scFv : scFv-Fc. La bande aux alentours de 38 kDa correspond à la TG qui n'est pas éliminée lors du dessalage car sa taille est trop proche de celles des fragments scFv et Fc.

Le scFv 4D5 Cys se couple nettement moins bien au Fc que le scFv 4D5 Qtag. On observe seulement une trace de (scFv)₂-Fc dans ce cas (piste 2). La meilleure combinaison est obtenue par dérivation du scFv 4D5 Qtag par le DBCO et dérivation du Fc par l'azide (piste 4). Ces résultats coïncident avec ce qui a été observé par fluorescence dans la Figure 58B. En effet, c'est l'introduction des fonctionnalités de chimie click sur le Fc qui est limitante car le scFv est utilisé en excès lors du couplage scFv + Fc. Cependant, pour un même Fc azide, l'excès de scFv 4D5 Cys ne permet pas de compenser sa moins bonne dérivation par le DBCO comparée au scFv 4D5 Qtag.

On remarque qu'il reste beaucoup de Fc non couplé au scFv suite à ces réactions. Pour déterminer s'il s'agit de Fc non dérivé par la TG ou de Fc-azide non couplé à un scFv, les mélanges scFv + Fc ont été prélevés à différents temps de réaction et mis en réaction avec du DBCO fluorescent (Figure 59B). Ces échantillons sont comparés au Fc-azide seul + DBCO fluorescent (piste 10). Comme attendu, il y a beaucoup moins de fluorescence après incubation avec des scFv. Après 66h, il reste peu de Fc-azide non couplé à un scFv 4D5 Qtag DBCO (piste 16). Néanmoins, dans le cas du scFv 4D5 Cys-myc, il ne reste plus du tout de Fc-azide disponible dès 21h alors qu'il s'agit du même lot que celui utilisé pour le Qtag et que le rendement de formation de (scFv)₂-Fc et scFv-Fc est moins important (pistes 11 à 13). Nous avons alors émis l'hypothèse que l'étape de dessalage du scFv après conjugaison au maléimide pouvait être incomplète, d'autant plus que 2 fois plus de maléimide que d'amine est utilisé. Dans ce cas, le Fc-azide se trouvera en présence de maléimide-PEG₄-DBCO restant et de scFv 4D5 Cys-myc DBCO. Pour des raisons de diffusion moléculaire, il est probable que la réaction avec le maléimide DBCO soit la plus favorisée. Le Fc-azide se retrouve alors bloqué et non réactif vis à vis du scFv ou du fluorophore. Le faible rendement pourrait également être expliqué par le fait que le maléimide est sujet à l'hydrolyse ou encore au transfert avec d'autres thiols (Baldwin and Kiick, 2011). Dans notre cas, il n'y en principe pas de thiols libres sur le Fc, ni dans le tampon PBS dans lequel ce Fc pur est conservé.

A



B

Fc A(HG)3Q K222A-N₃ + 10eq scFv 4D5-tag-DBCO

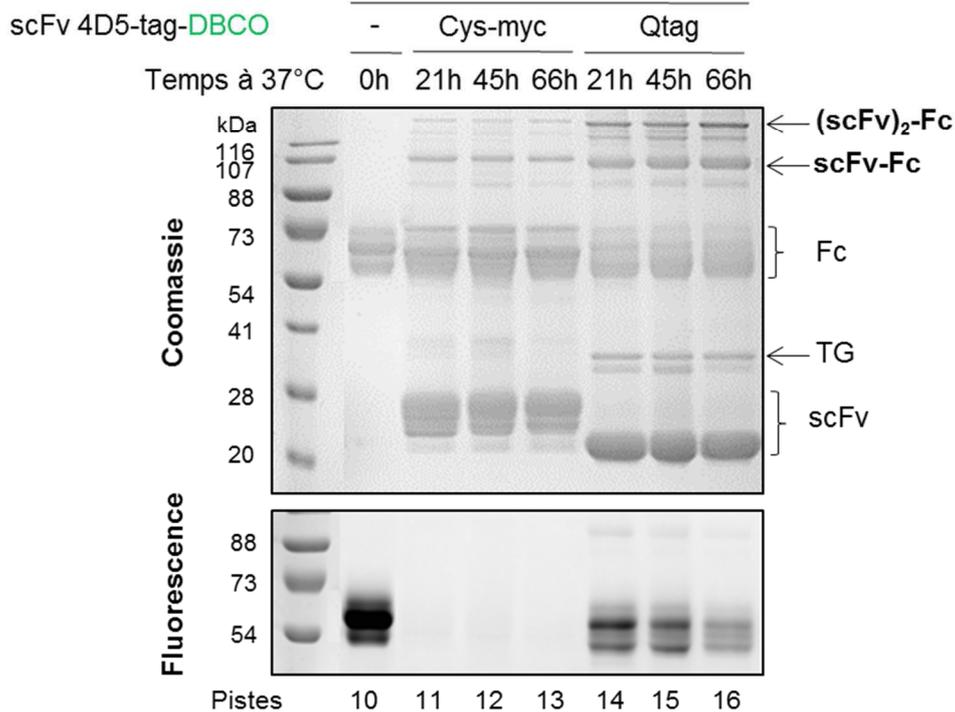


Figure 59 : Couplage du scFv 4D5 Cys-myc-DBCO ou Qtag-DBCO au Fc A(HG)₃Q K222A-N₃ et du scFv 4D5 Qtag-N₃ au Fc A(HG)₃Q K222A-DBCO. A) Le Fc est mis en réaction avec 10 eq de scFv pendant 66h à 37°C puis les mix scFv + Fc sont déposés sur SDS-PAGE pour avoir l'équivalent de 2 µg de Fc initial. Les scFv dérivés par N₃ ou DBCO sont déposés seuls à hauteur de 5 µg et le Fc dérivé par N₃ ou DBCO est déposé seul à hauteur de 2µg. Le (scFv)₂-Fc produit en cellules HEK est utilisé comme témoin positif (T+, 0.5 µg déposé). B) Après 21h, 45h et 66h de cette réaction à 37°C, l'équivalent de 2µg de Fc initial est prélevé et mis en réaction avec 30 équivalents de DBCO-PEO₄-CR110 pendant 4h à TA puis déposé sur SDS-PAGE en conditions non réductrices. Le Fc-N₃ non couplé au scFv est utilisé comme témoin (2µg).

2. Optimisation des conditions de couplage

La combinaison de couplage conservée pour la suite est celle mettant en jeu le scFv 4D5 Qtag dérivé par l'amine-PEG₄-DBCO et le Fc A(HG)₃Q K222A dérivé par l'amine-PEG₃-N3. Les conditions utilisées ci-dessus pour coupler les scFv au Fc ont alors été optimisées, notamment en terme de durée de réaction qui était très longue. Des ratios de 2 à 10 équivalents molaires de scFv par Fc (soit un excès de 1 à 5 par site de couplage) ont été testés pour des réactions de 24h à 37°C. Pour le ratio 10/1, une gamme de 4h à 48h de couplage a été réalisée, ainsi qu'une autre condition de 24h à TA (Figure 60).

En conditions non réductrices, le rendement de formation de scFv-Fc et (scFv)₂-Fc augmente légèrement avec l'excès de scFv par Fc pour un temps et une température de réaction donnés (pistes 4, 5 et 8). Il n'y a pas de différence notable entre une réaction à TA ou à 37°C pendant 24h avec 10 scFv par Fc (pistes 6 et 8). A 37°C, le couplage semble déjà être arrivé à saturation dès 4h (piste 7). En conditions réductrices, on observe un scFv couplé à un Fc monomérique (scFv-Fc_m). Il n'est pas possible de savoir si ce composé provient de la réduction d'un scFv-Fc ou d'un (scFv)₂-Fc. Ce SDS-PAGE donne donc seulement un aperçu de l'efficacité globale de la réaction de chimie click, sans faire la distinction entre ces 2 espèces. Les mêmes résultats qu'en conditions non réductrices sont obtenus en terme d'excès mais il semblerait que dans ce cas le rendement de la réaction ne soit saturé qu'à partir de 24h à 37°C et non pas 4h. De plus, une température de 37°C semble légèrement meilleure que la température ambiante ici. Les réactions suivantes seront donc effectuées pendant 24h à 37°C pour s'assurer que ces paramètres cinétiques et de température ne soient pas limitants.

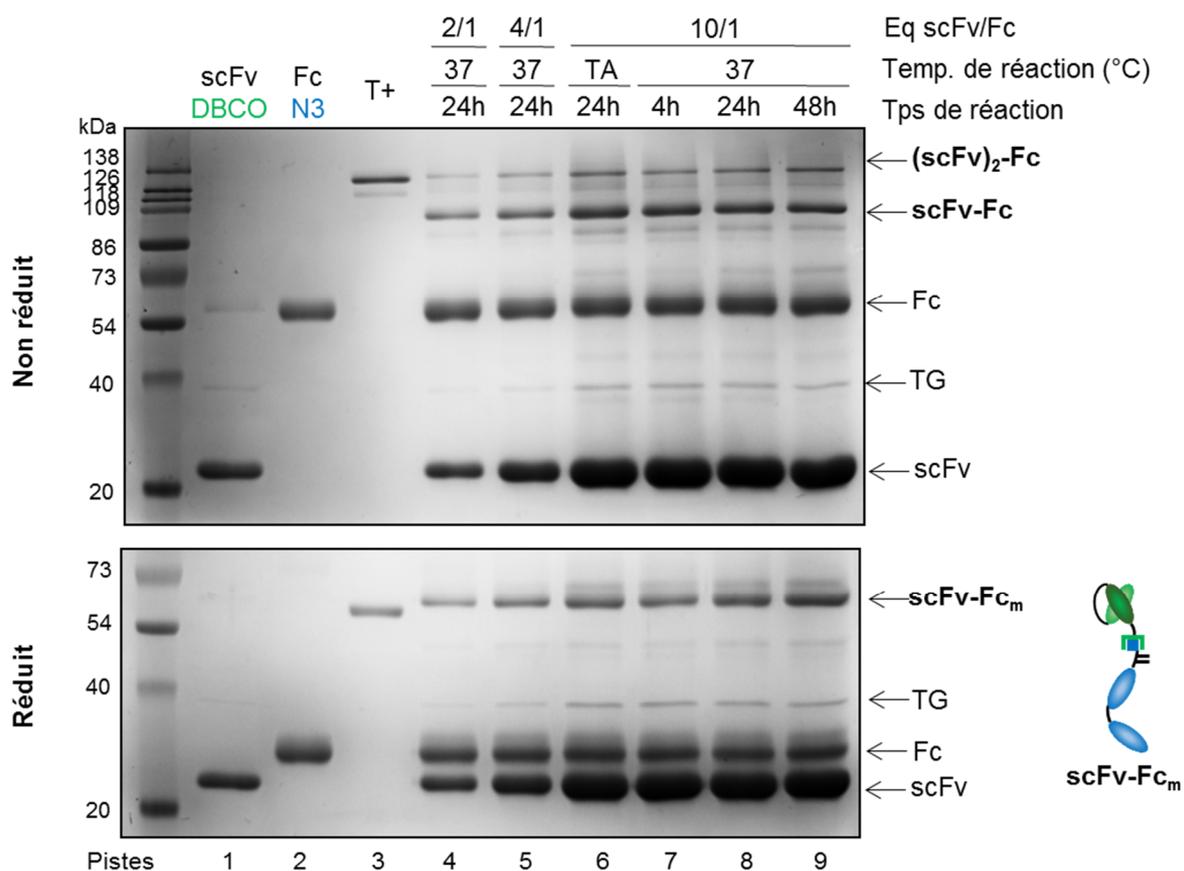


Figure 60 : Influence du ratio scFv/Fc, de la durée et de la température sur le rendement de couplage du scFv 4D5 Qtag His₆ DBCO avec le Fc A(HG)₃Q-K222A N₃ préalablement dessalés sur Zeba Spin. Témoins négatifs : scFv seul (2.2 µg) et Fc seul (2 µg). T+ : témoin positif : (scFv)₂-Fc eucaryote (0.5µg). Après les temps indiqués, les mélanges scFv + Fc sont déposés à hauteur de 2 µg de Fc initial en conditions réductrices (bas) et non réductrices (haut) sur SDS-PAGE coloré ensuite au bleu de Coomassie.

Des rendements de formation assez faibles sont obtenus par quantification des bandes obtenues rapportées aux poids moléculaires des différentes espèces : inférieurs à 10% de $(scFv)_2$ -Fc et 20-25 % de scFv-Fc.

Suite aux résultats de la Figure 59, nous avons émis l'hypothèse que l'étape de dessalage après la dérivation des fragments par l'azide ou le DBCO via la transglutaminase pouvait peut-être s'avérer incomplète. Le dessalage habituel consistait à passer les échantillons sur une colonne Zeba™ Spin 7k MWCO par centrifugation. Par la suite, nous avons utilisé des colonnes contenant de la résine Sephadex™ G-25 (5k MWCO) permettant une élution par gravité en plusieurs fractions. Comme les petites molécules sortent de la colonne après les plus grosses, la dernière fraction contenant les fragments d'anticorps a plus de chance d'être contaminée par des traces de linker azide ou DBCO que les premières. Cette fraction sera donc éliminée.

Nous avons à nouveau testé différents ratios de scFv/Fc : entre 2 et 10 équivalents molaires (soit entre 1 et 5 par site de couplage) ainsi que différentes concentrations en fragment Fc dans les mélanges scFv + Fc. Pour le ratio 10/1, 0.15 mg Fc/mL est la concentration maximale pouvant être testée sans concentrer les protéines car le fait d'ajouter un tel excès de scFv dilue fortement le Fc. Pour les ratio 4/1 et 2/1, les concentrations maximales sont respectivement de 0.35 et 0.6 mg Fc/mL. Pour tester l'influence du ratio à concentration en Fc constante, la condition 2/1 a été diluée par du TBS imidazole 200mM pour obtenir 0.35 ou 0.15 mg Fc/mL final et la condition 4/1 a été diluée pour obtenir 0.15 mg Fc/mL final (Figure 61).

Là encore, c'est le ratio 10 scFv par Fc qui donne le meilleur taux de couplage. A ratio constant, il semble que le rendement soit légèrement meilleur lorsque la concentration en fragments est la plus haute possible (pistes 4, 5 et 6 ou 7 et 8). L'excès de scFv DBCO par rapport au Fc azide a plus d'impact qu'une concentration protéique élevée d'après la comparaison entre la condition 2 éq scFv / Fc avec 0.6 mg Fc/mL (piste 4) et la condition 10 éq scFv / Fc avec 0.15 mg Fc/mL (piste 9). Toutes les conditions donnent de meilleurs résultats que lorsque les fragments sont dessalés sur Zeba Spin (Figure 60). Les rendements de formation sont ici d'environ 20% pour le $(scFv)_2$ -Fc et d'environ 30% de scFv-Fc, ce qui correspond à environ 80% des sites de couplages potentiels ayant été dérivés.

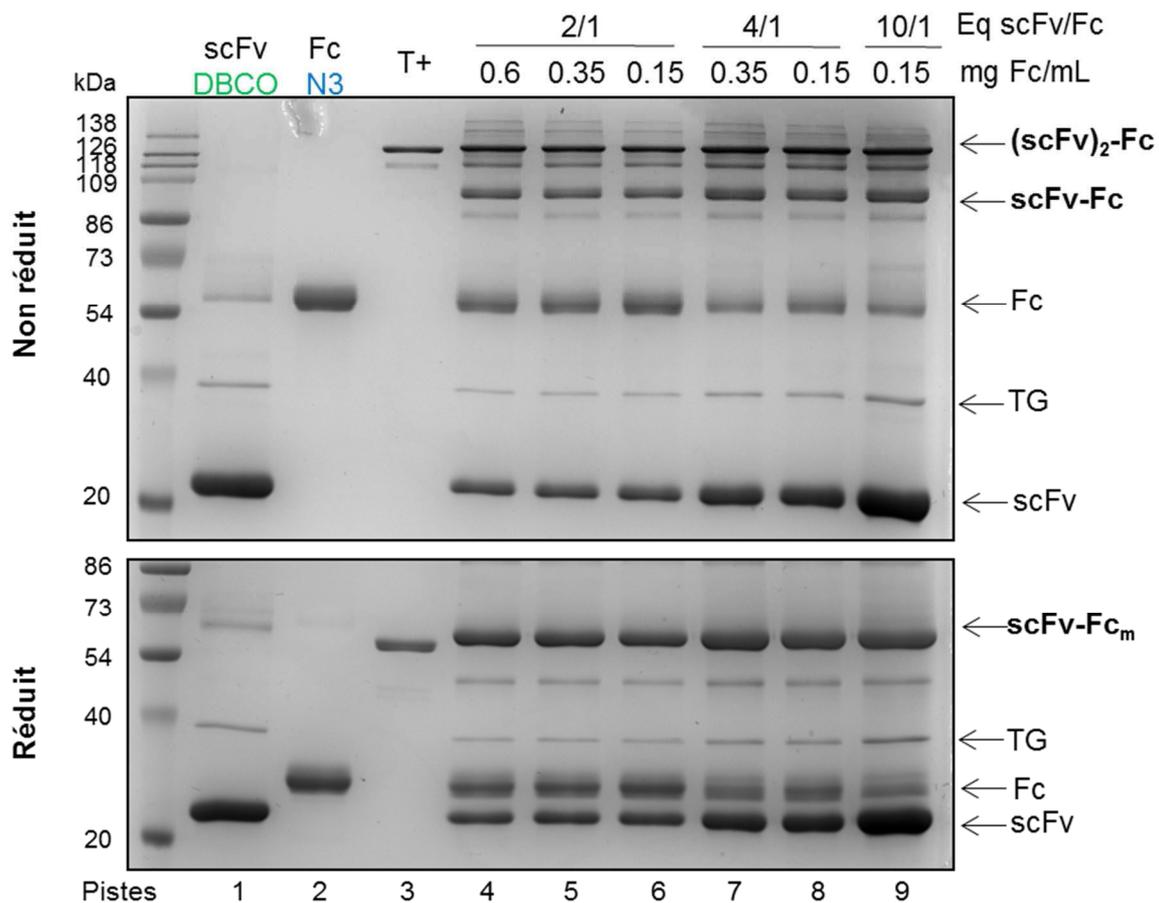


Figure 61 : Influence du ratio scFv/Fc et de la concentration en fragment Fc sur le rendement de couplage du scFv 4D5 Qtag His₆ DBCO (10 équivalents molaires) avec le Fc A(HG)₃Q-K222A N₃ préalablement dessalés sur Sephadex G-25. Témoins négatifs : scFv seul (2.2 µg) et Fc seul (2 µg). T+ : témoin positif : (scFv)₂-Fc eucaryote (0.5µg). Après 24h à 37°C, les mélanges scFv + Fc sont déposés à hauteur de 2 µg de Fc initial en conditions non réductrices (haut) et réductrices (bas) sur SDS-PAGE coloré ensuite au bleu de Coomassie.

La réaction de chimie click est visiblement plus efficace en présence d'un excès de scFv. Il n'est pas envisageable d'ajouter plus de 10 équivalents de scFv par Fc car cela diluerait de façon importante ce fragment Fc. De plus, il n'est pas non plus envisageable de concentrer la solution du scFv 4D5 Qtag His₆ dérivé au DBCO car sa solubilité est limitée à environ 2.5 mg/mL. Cependant, ajouter progressivement le Fc au volume final de scFv permet au Fc de se retrouver en présence d'un net excès de scFv au moment de chaque ajout (en considérant qu'une majorité de Fc aura réagi au moment où l'ajout suivant sera réalisé). Pour mettre en présence 10 équivalents molaires de scFv par Fc sans diluer les protéines dès le départ, la démarche inverse peut être effectuée en ajoutant progressivement le scFv au volume final de Fc. Ces deux nouvelles stratégies ont été mises en place avec 5 ajouts de scFv ou Fc séparés chacun de 2h de réaction à 37°C. Elles ont été comparées avec le mélange direct de la totalité

des fragments. Après un total de 24h à 37°C, le DBCO fluorescent a été ajouté à chacune des conditions pour détecter le Fc azide non couplé au scFv (Figure 62).

En bleu de Coomassie, on observe deux populations de Fc après dérivation par l'azide en conditions réduites (piste 12). La plus haute correspond certainement au Fc couplé à cet azide puis au DBCO fluorescent et la plus basse à du Fc non conjugué. En effet, en superposant les révélations en bleu de Coomassie et en fluorescence, on remarque que seul la population la plus lourde présente de la fluorescence. Le rapport de ces deux bandes montre une conjugaison globale de 60 à 70% par l'azide (sans différencier les bi- ou mono-conjugués). Lors du couplage entre le scFv et le Fc, il n'y a aucune différence de rendement quelle que soit la façon de mélanger les 2 fragments (pistes 6 à 8). La fluorescence montre que la dérivation du scFv par le DBCO et du Fc par l'azide sont comparables (piste 3 et 5). Le couplage entre le scFv et le Fc donne 15% de (scFv)₂-Fc et 20-25% de scFv-Fc, soit globalement environ 50% des sites de couplages dérivés sur les 2 étapes de dérivation par l'azide ou le DBCO et de couplage scFv + Fc. Seul 70% des Fc azide ont été couplés à des scFv DBCO d'après la fluorescence dans toutes les conditions. On a donc une 1^{ère} étape de dérivation avec un rendement de 60-70% puis une addition avec 70% de rendement ce qui donne globalement 42 à 49% de rendement. Cette valeur est en accord avec les 50% observés sur le bleu de Coomassie en conditions réductrices.

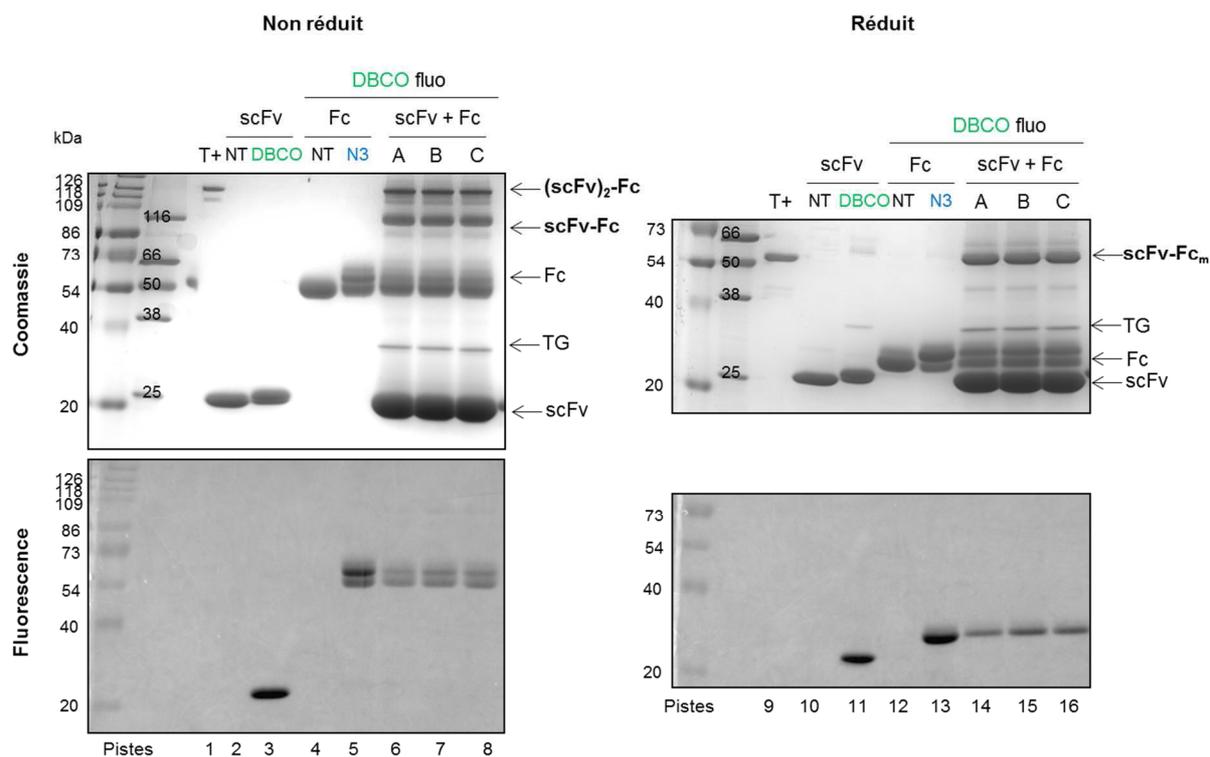


Figure 62 : Influence de l'ajout progressif des fragments lors du couplage de 10 éq de scFv 4D5 Qtag His₆ DBCO par Fc A(HG)₃Q K222A N₃ préalablement dessalés sur Sephadex G-25. A : le scFv et le Fc sont mélangés à T₀. B : le scFv est progressivement ajouté au Fc à T₀, T₀+2h, T₀+4h, T₀+6h et T₀+8h. C : le Fc est progressivement ajouté au scFv à T₀, T₀+2h, T₀+4h, T₀+6h et T₀+8h. Après un total de 24h à 37°C, les mélanges scFv + Fc sont mis en réaction avec 30 éq de DBCO-PEO₄-CR110 par molécule de Fc initialement présent. Le scFv DBCO seul est quant à lui mis en réaction avec l'azide fluor 488. Témoins négatifs : scFv seul (2.2 µg) et Fc seul (2 µg). T+ : témoin positif : (scFv)₂-Fc eucaryote (0.5µg). Les mélanges scFv + Fc sont déposés à hauteur de 2 µg de Fc initial en conditions non réductrices (gauche) et réductrices (droite) sur SDS-PAGE coloré ensuite au bleu de Coomassie.

Finalement, la meilleure stratégie de couplage du scFv 4D5 Qtag His₆ sur le Fc A(HG)₃Q-K222A a été obtenue avec un équivalent molaire de 10 scFv par Fc pendant 24h à 37°C. Suivant les couplages, le rendement de formation du (scFv)₂-Fc se situe entre 10 et 20% et le rendement de formation du scFv-Fc se situe entre 20 et 30%.

3. Fonctionnalité des fragments (scFv)₂-Fc couplés

Il est donc possible de coupler des fragments scFv à un fragment Fc. On obtient alors un mélange de (scFv)₂-Fc et scFv-Fc, ainsi que du Fc et scFv non couplés et/ou non dérivés par l'azide et le DBCO. Dans une démarche de criblage d'anticorps thérapeutiques, le plus simple serait de tester directement ces mélanges *in vitro*, sans chercher à isoler les (scFv)₂-Fc (voire scFv-Fc). Ceci permet de s'affranchir d'une étape supplémentaire de chromatographie d'exclusion stérique ou de filtration sur une membrane perméable aux protéines de faibles poids moléculaires.

Nous avons donc choisi de tester la liaison des mélanges scFv 4D5-DBCO + Fc-azide sur la lignée de cancer du sein SK-BR-3 surexprimant le récepteur HER2 par cytométrie en flux (Gaborit et al., 2011). Le scFv 4D5 restant se fixe sur ce récepteur, mais seuls les (scFv)₍₁₋₂₎-Fc peuvent être détectés par l'anti-IgG humaine spécifique du fragment Fc couplé au FITC. Le Fc seul ne se fixera quant à lui nulle part. Pour démontrer la spécificité de fixation du scFv 4D5 à HER2, nous avons utilisé le scFv anti-β-galactosidase 13R4 Qtag His₆ qui est connu pour sa solubilité dans le cytoplasme d'*E. coli* (Martineau et al., 1998). Ce scFv 13R4 a été couplé au Fc A(HG)₃Q K222A de la même façon que le scFv 4D5 pour servir d'anticorps irrelevant.

La Figure 63A montre que le scFv 13R4 donne moins de (scFv)₂-Fc mais plus de scFv-Fc que le scFv 4D5. Le rendement global de réaction click est au final similaire. Ce SDS-PAGE permet donc d'estimer la concentration en (scFv)₂-Fc dans les 2 mélanges scFv+Fc après réaction. A partir de celle-ci, des dilutions successives ont été réalisées pour arriver à des concentrations situées entre 5 pM et 5 nM de (scFv)₂-Fc puis incubées avec des cellules SK-BR-3. Les mêmes concentrations ont été testées avec le (4D5)₂-Fc produit classiquement en cellules eucaryotes. Cependant, la population de scFv-Fc n'a pas été prise en compte dans les calculs de concentration car leur monovalence leur confère une avidité plus faible que les (scFv)₂-Fc qui sont divalents.

La Figure 63B montre que scFv 4D5 clické au fragment Fc se fixe sur le récepteur HER2 de façon comparable au (scFv)₂-Fc eucaryote. Cette fixation est spécifique jusqu'à 500 pM car le scFv 13R4 couplé au fragment Fc ne donne aucun signal. Pour une concentration en (scFv)₂-Fc donnée, la liaison est même plus importante dans le mélange click. Ceci doit être dû à la présence non négligeable de scFv-Fc, eux aussi capables de se lier au récepteur.

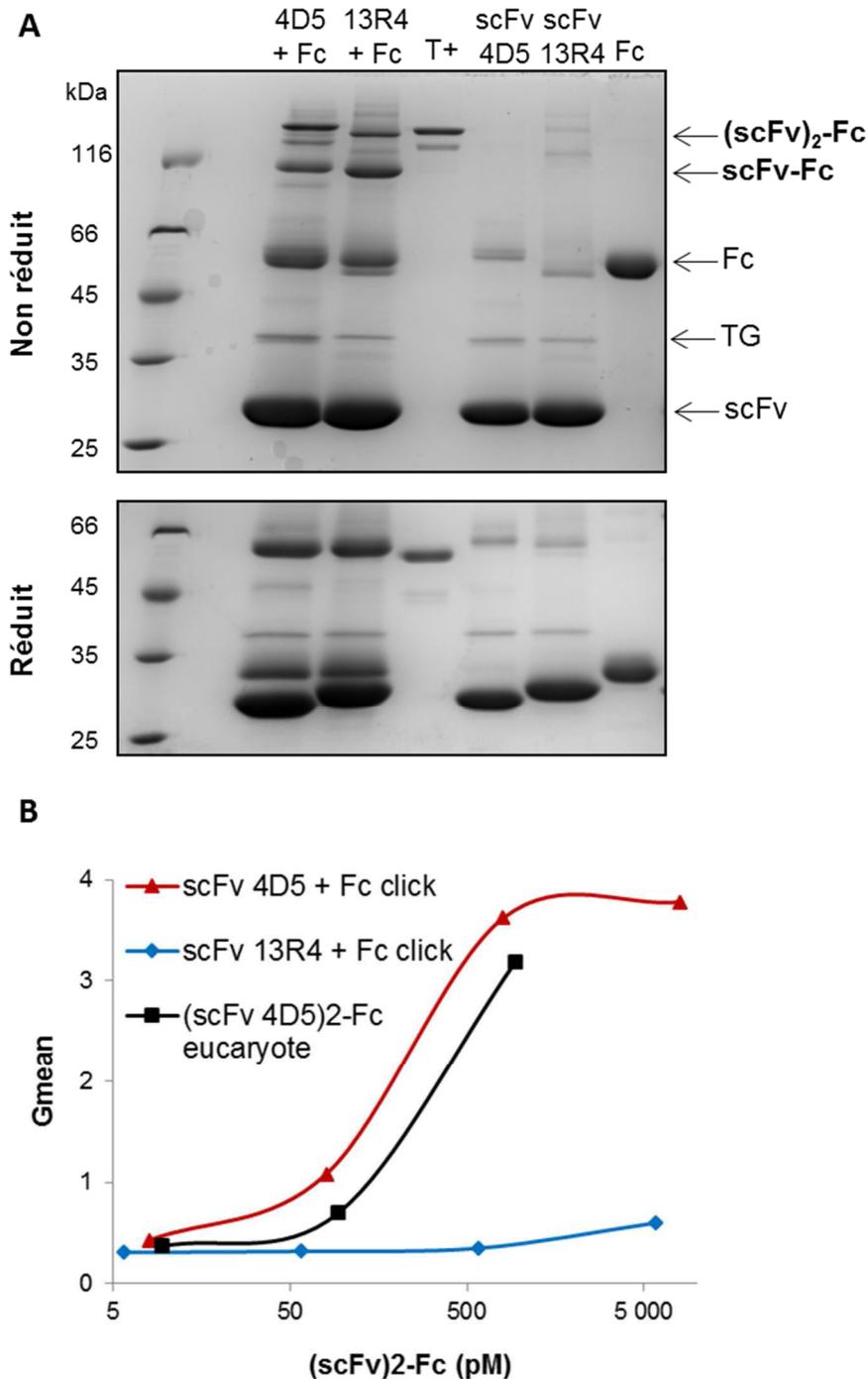


Figure 63 : Liaison du mélange scFv 4D5-DBCO + Fc A(HG)₃Q K222A-N₃ au récepteur HER2. A) Les scFv 4D5 Qtag His₆ et 13R4 Qtag His₆ dérivés par l'amine-PEG₄-DBCO sont mis en présence du Fc A(HG)₃Q K222A dérivé par l'amine-PEG₃-N₃. Témoins négatifs : scFv seuls (5 µg) et Fc seul (2 µg). T+ : (4D5)₂-Fc eucaryote (0.5 µg). Les mélanges scFv + Fc sont déposés à hauteur de 2 µg de Fc initial en conditions non réductrices (haut) et réductrices (bas) sur SDS-PAGE coloré ensuite au bleu de Coomassie. B) Cytométrie en flux sur la lignée SK-BR-3. Les mélanges scFv 4D5-DBCO + Fc A(HG)₃Q K222A-N₃ (en rouge) et scFv 13R4-DBCO + Fc A(HG)₃Q K222A-N₃ (en bleu) sont incubés sur les cellules à des concentrations de (scFv)₂-Fc comprises entre 5 pM et 5 nM. Le (scFv 4D5)₂-Fc produit en cellules eucaryotes (en noir) est utilisé comme témoin positif. La fixation est détectée par un anti-IgG humaine spécifique du fragment Fc couplé au FITC.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La première étape de ce projet consistait à produire à grande échelle des fragments d'anticorps (scFv et Fab) chez *E. coli*. Nous avons comparé l'expression cytoplasmique et périplasmique. L'expression cytoplasmique donne de bien meilleurs rendements. Elle a donc été choisie pour la suite pour produire les fragments scFv. Ceux-ci se sont avérés plutôt bien solubles dans le cytoplasme, et assez peu sujets à l'agrégation, contrairement à ce qui a pu être décrit dans la littérature. Néanmoins, l'absence de formation de ponts disulfures reste critique et conduit à leur précipitation après leur purification lorsqu'ils se trouvent à température ambiante. Ceci est incompatible avec les réactions chimiques ou enzymatiques envisagées par la suite. Pour tenter de remédier à ce problème, nous avons utilisé une souche bactérienne permettant la co-expression du scFv avec l'isomérase de ponts disulfures DsbC et la sulfhydryle oxydase Erv1p, décrites comme permettant d'obtenir un cytoplasme oxydant (Nguyen et al., 2011). Cette technique s'est révélée inefficace dans le cas du scFv 4D5. Ceci est probablement dû au fait que le scFv 4D5 est fortement exprimé dans le cytoplasme bactérien, ce qui sature ce système d'oxydation enzymatique.

L'alternative a donc été de former les ponts disulfures *in vitro* après la purification des scFv, par oxydation au sulfate de cuivre. Malgré cette oxydation, les scFv 4D5 précipitent complètement s'ils sont congelés ou conservés en tampon PBS ou à trop haute concentration. Parmi plusieurs tampons testés, nous avons montré que les conditions optimales de conservation du scFv 4D5 sont : en tampon TBS contenant de l'imidazole, à concentration inférieure à 2.5 mg/mL et à 4°C. Ces 3 conditions combinées ont permis d'empêcher la précipitation des différentes constructions. Grâce à celles-ci, nous avons obtenu des rendements de 100 à 200 mg/L de scFv purs, stables thermiquement, contenant des tags en C-terminal, et capables de se lier à leur récepteur HER2.

Pour se rapprocher au maximum des immunoglobulines naturelles, nous souhaitions également coupler des fragments Fab à un Fc. Le Fab 4D5 présentait un problème de transcription, traduction ou dégradation de la chaîne lourde par rapport à la chaîne légère, à la fois en périplasma et cytoplasme, malgré toutes les différentes conditions d'expression testées. Les rendements étaient relativement faibles (seulement quelques milligrammes par litre de culture), contrairement à ce qui a été décrit précédemment dans le cas du même clone au format Fab' avec un autre promoteur et en fermenteur (Carter et al., 1992). L'introduction d'un second promoteur T7 en amont de la chaîne lourde n'a pas permis d'apporter une solution à ce problème. Faute de temps, nous avons alors choisi de nous focaliser sur l'utilisation de scFv et de ne pas poursuivre l'optimisation de production du fragment Fab. Pour tenter

d'apporter une solution à ce problème, nous aurions pu changer de promoteur ou encore utiliser un scFab pour avoir les deux chaînes sur une même transcrite.

Les différents fragments Fc testés ont quant à eux été produits en cellules eucaryotes HEK 293T et purifiés sur colonne de protéine A avec des rendements de 10 à 20 mg/L. L'introduction de tags en N-terminal n'a pas perturbé la fixation de ces Fc aux récepteurs FcγR I et II.

La seconde étape a consisté à déterminer quelle stratégie donnait le meilleur compromis entre le rendement et la spécificité de couplage pour introduire les fonctions azide et DBCO permettant une réaction de chimie click sans cuivre.

Bien que la surexpression de la FGE avec des protéines contenant l'aldéhyde tag en C-terminal ait conduit à des rendements de conversion en formylglycine *in vivo* de 99% dans la littérature (Carrico et al., 2007), cette stratégie s'est avérée presque inefficace une fois appliquée à notre scFv 4D5. Récemment, il a été montré que l'activité de la FGE (donc la génération de formylglycine) pouvait être améliorée en supplémentant le milieu de culture avec 50 μM de sulfate de cuivre lors de la production d'un anticorps monoclonal en cellules CHO (York et al., 2016). Dans ce cas, c'est la FGE humaine qui est surexprimée, et non la FGE issue de *M. tuberculosis* utilisée lors de nos productions chez *E. coli*. Cependant, cette supplémentation pourrait peut-être avoir un impact positif sur la formation de formylglycine au sein de l'aldéhyde tag du scFv 4D5 cytoplasmique si le sulfate de cuivre est capable de pénétrer dans le cytoplasme bactérien. De plus, celui-ci pourrait éventuellement conduire à une oxydation *in vivo* des ponts disulfures des scFv, ce qui permettrait d'éviter l'oxydation *in vitro*. Comme dans le cas de la co-expression du scFv avec les enzymes DsbC et Erv1p, il est possible que le fort taux d'expression du scFv sature l'activité de la FGE.

Concernant le Fc, nous avons montré à l'aide d'une étude en spectrométrie de masse que les constructions Fc Qtag K222A et Fc A(HG)₃Q K222A ne possédaient pas toujours les résidus N-terminaux attendus. Ceci peut être dû à un problème de dégradation et/ou de clivage du peptide signal.

Pour la dérivation du Fc au PLP, nous n'avons pas vérifié que le Fc AKT(H)₆Q avait la bonne extrémité N-terminale. Or, les résidus AKT permettent de maximiser le rendement de dérivation par le PLP (Witus et al., 2010). Le faible rendement de conversion de l'amine N-terminale en cétone pourrait donc s'expliquer par ce problème de dégradation et/ou clivage des N-termini du Fc recombinant. Nous avons également observé l'apparition de multimères de Fc suite au traitement par le PLP. Pour ces raisons, nous n'avons pas poursuivi l'utilisation

de cette stratégie. On peut également souligner le fait que la dérivation au PLP a été décrite pour des protéines monomériques, alors que notre fragment Fc est dimérique. Le contexte réactionnel est donc différent, ce qui pourrait être à l'origine de ces multimères.

Les bis-sulfones ont été décrites comme permettant de réagir de façon spécifique sur des histidines contenues dans un tag His₆, His₄ ou His₂ fusionné à un dAb, ou sur un motif His-Xaa-His (Cong et al., 2012). Le seul motif HXH présent sur notre Fc IgG1 humain est le motif HNH aux positions 433-435. Lorsque les bis-sulfones sont mises en présence d'un fragment Fc sans tag dont l'histidine 433 est substituée, elles se fixent sur ce fragment. Il y a donc des histidines autres que celles présentes dans une séquence de type HXH qui sont réactives. Les histidines 435 et 433 sont impliquées respectivement de façon directe et indirecte dans la liaison au FcRn. L'histidine 433 substituée par une alanine n'affecte pas la liaison du C1q à une IgG1 anti-CD20 immobilisée de façon aléatoire. En revanche, lorsque des cellules sont opsonisées par ces IgG1, cette mutation diminue l'avidité apparente du C1q pour le fragment Fc et la CDC est alors réduite de façon non négligeable (Diebolder et al., 2014). Même si la substitution H433A avait rendu le couplage des bis-sulfones spécifiques du tag (His-Gly)₃, on aurait risqué de perdre la capacité à déclencher efficacement l'ADCC et la CDC. Les bis-sulfones ne permettent donc pas de dériver spécifiquement les extrémités N-terminales du fragment Fc. Elles ne sont pas non plus applicables au scFv 4D5 car la présence d'imidazole, crucial pour empêcher la précipitation du scFv, inhibe totalement la réactivité des bis-sulfones. C'est pourquoi nous avons écarté cette stratégie.

La cystéine libre introduite sur le scFv 4D5 a quant à elle pu être dérivée de façon spécifique par le maléimide-PEG₄-DBCO ou par l'APN-BCN, respectivement à pH 6.5 et 7.5. Dans nos mains, l'APN a donné des rendements légèrement plus faibles que le maléimide.

Dans le cas de la transglutaminase, la présence d'une lysine au voisinage du Qtag entraîne la formation de multimères de Fc ou de dimères de scFv. Pour cette raison, la présence des 2 tags Qtag et c-myc en C-terminal d'un scFv est incompatible. Trois constructions contenant le Qtag, le c-myc WT ou le c-myc K3F ont été testées. C'est le Qtag qui a été conservé car le peptide myc WT conduit à des traces de dimères à cause de la présence d'une glutamine et d'une lysine voisines, et le myc K3F conduit à une conjugaison plus faible.

Au niveau du fragment Fc, la lysine 222 a dû être substituée par une alanine pour éviter la formation de multimères et de liaisons intra-Fc qui empêchaient sa réduction et rendaient le Qtag non réactif vis à vis des amines des linkers. Ce type de dimérisation via un couplage lysine-glutamine proches en terme de séquence primaire a été décrit et exploité dans le cadre de la dimérisation de VHH via le S-tag (Plagmann et al., 2009). Suite au problème de clivage et/ou dégradation de l'extrémité N-terminale du Fc Qtag K222A, nous avons conservé par la

suite le Fc A(HG)₃Q K222A, en émettant l'hypothèse que ses 6 résidus supplémentaires ne perturberaient pas la structure finale du (scFv)₂-Fc.

La présence d'imidazole (200 mM) et de cuivre (environ 1 mM) dans le tampon de conservation des scFv s'est avérée compatible avec l'utilisation de la transglutaminase. Les conditions de couplage ont été optimisées en terme d'équivalents d'amine et de TG par Qtag, de durée de réaction, de pH et de force ionique du tampon de réaction, ainsi que de longueur du linker. A partir de 16h à 37°C et de 15 U TG / μmol / Qtag, on atteint une saturation. Un linker de 12 PEG et un large excès d'amines (40 éq / Qtag) ont tous deux un effet négatif sur le rendement. Ceci peut s'expliquer par la tendance à la précipitation des linkers malgré la présence de motifs PEG supposés augmenter leur hydrophilie. La diminution de l'efficacité lors de l'utilisation de substrat lysine (cadavérine DY547) en excès a déjà été observée sur la glutamine 295 du chCE7 aglycosylé dès 3.75 à 4.5 équivalents molaires par glutamine réactive (Mindt et al., 2008). Dans notre cas, nous sommes à 10 équivalents molaires par glutamine réactive, donc la diminution de rendement au-delà de cet excès n'est pas aberrante. Ils observent également une diminution de couplage à partir d'une certaine quantité de TG mais celle-ci ne provient pas du même fournisseur, donc son activité n'est pas comparable à la nôtre.

Finalement, un rendement global d'insertion d'azide ou de DBCO d'environ 60% a été estimé sur le Fc A(HG)₃Q K222A, sans pouvoir distinguer le pourcentage de Fc ayant été dérivé sur ces 2 chaînes ou sur une seule. Ce rendement est plus faible que les rendements quantitatifs décrits dans le cas du Qtag présent en C-terminal d'anticorps entiers (Strop et al., 2013). Cependant, cet article a aussi montré que ce tag était dérivé plus ou moins efficacement suivant sa position au sein de l'immunoglobuline et le Qtag n'avait jamais été introduit en N-terminal d'un Fc ou en C-terminal d'un scFv auparavant.

Il existe d'autres types de réactions chimiques ou enzymatiques qui auraient pu être testées et aboutir à de meilleurs rendements. Parmi elles, on peut citer l'utilisation de la trypsiligase (Liebscher et al., 2014), de la sortase (Alt et al., 2015) et des processus d'EPL (*expressed protein ligation*) et PTS (*protein trans-splicing*) (Möhlmann et al., 2011). Une autre alternative pourrait être d'effectuer des conjugaisons en phase solide. Un anticorps fixé sur une colonne de protéine A a ainsi pu être dérivé sur une cystéine libre par du maléimide ainsi que par une amine sur la glutamine 295 de la chaîne lourde après déglycosylation (Puthenveetil et al., 2016).

Enfin, la dernière étape avait pour but de coupler un scFv à chaque extrémité N-terminale du Fc. L'utilisation du scFv 4D5 Cys-myc dérivé au maléimide DBCO a conduit à un moins bon rendement de couplage au Fc A(HG)₃Q K222A dérivé par l'amine azide que le scFv 4D5 Qtag

His₆ dérivé à l'amine DBCO. Le scFv dérivé par l'APN-BCN n'a donc pas été testé en terme de couplage au Fc azide car son greffage au scFv est légèrement moins bon que le maléimide. De plus, cette molécule ne contient pas de PEG donc il risque d'y avoir un encombrement stérique entre le scFv et le Fc.

Pour coupler le scFv 4D5 Qtag His₆ et le Fc A(HG)₃Q K222A, il restait alors la possibilité de dériver le scFv au DBCO et le Fc à l'azide et inversement. C'est cette combinaison qui a donné le meilleur rendement de formation de (scFv)₂-Fc et scFv-Fc. Ceci s'explique par le fait que généralement, la conjugaison de l'amine azide est plus efficace que la conjugaison de l'amine DBCO (Dennler et al., 2015). Or, dans le cas d'un couplage entre 2 scFv et un Fc, le scFv est ajouté en excès. C'est donc la fonctionnalisation du fragment Fc qui est limitante. Nous ne disposons pas des équipements chromatographiques nécessaires à la séparation des Fc bi-conjugués, mono-conjugués et non conjugués par l'azide. De plus, l'idée était de développer un outil relativement simple à mettre en place, sans opérations complexes de purification. Nous souhaitons donc travailler avec ce mélange qui contient la population de scFv-Fc qui se forme en plus des (scFv)₂-Fc, ainsi que des scFv et Fc restants.

Les meilleures conditions de couplages ont été obtenues en mettant en réaction 10 scFv par Fc (donc un excès de 5 par site de couplage) pendant 24h à 37°C. Malgré cet excès, la réaction de chimie click a un rendement d'environ 70%. Un temps de réaction plus long ne permet pas d'augmenter ce rendement.

Ainsi, malgré le fait que la chimie click sans cuivre est décrite dans la littérature comme pouvant atteindre des rendements quasi quantitatifs, il semblerait que ce ne soit le cas que lors de couplages entre une protéine et une molécule comme un fluorophore, une drogue, un radionucléide, etc, mais pas lors d'un couplage protéine-protéine. Par exemple, un Fab a été dérivé sur un tag myc avec les mêmes amines azide ou DBCO que celles utilisées ici (Dennler et al., 2015). La dérivation au DBCO est 2 fois moins efficace que celle avec l'azide (50% contre presque 100%). Ces deux Fab ont alors été mis en présence de façon équimolaire. Un homodimère ne se forme qu'à hauteur de 25%, montrant que la réaction de chimie click n'a fonctionné qu'à environ 50%. Les auteurs expliquent ce résultat par une gêne stérique qui pourrait être éventuellement diminuée par le design de linkers différents. Néanmoins, dans notre cas nous avons montré qu'augmenter la longueur du linker amine azide avait pour effet de réduire le taux de conjugaison. De plus, plus les linkers sont longs, plus la molécule de (scFv)₂-Fc va avoir une structure éloignée de celles des (scFv)₂-Fc obtenus sans couplage click.

Sachant que du cuivre a déjà été utilisé pour oxyder les scFv, il aurait pu être envisageable d'utiliser la réaction de chimie click catalysée au cuivre qui est plus rapide que la chimie click

sans cuivre. Cependant, cela nécessiterait une étape de dessalage suite à l'addition des scFv sur le Fc, pour éliminer totalement ce cuivre cytotoxique. De plus, la CuAAC n'est pas toujours synonyme de bons rendements de couplages inter-protéiques. Par exemple, un scFv a été dérivé par du maléimide-PEG₂-azide ou du maléimide-PEG₃-alcyne (Natarajan et al., 2007). Seulement 30% d'hétérodimérisation ont été obtenus avec un excès de 5 en azide par rapport à l'alcyne. Comme dans notre cas, un plus grand nombre de PEG dans les linkers n'a pas permis d'améliorer la dimérisation. Encore une fois, cette mauvaise réactivité est expliquée par le fait que le scFv est une macromolécule donc cela réduit la probabilité de rencontre entre l'azide et l'alcyne par rapport à la rencontre avec une molécule qui serait plus petite, à cause des différences de diffusion moléculaire. Les auteurs ont donc synthétisé un linker tri-alcyne capable de s'ajouter à l'azide. Ce linker est introduit au niveau de la cystéine libre du scFv. Avec celui-ci, le di-scFv se forme à 74%, et il y a très peu de trimérisation. Ainsi, l'efficacité de la CuAAC est limitée par la dynamique moléculaire, mais ceci peut être partiellement surmonté en introduisant de façon spécifique une molécule polyfonctionnelle pour augmenter la probabilité de rencontre entre les 2 espèces. Ce principe aurait éventuellement pu être appliqué à notre problématique, mais cela aurait nécessité de synthétiser de nouveaux linkers, ce qui était impossible faute de temps.

Les conditions optimisées de chimie click permettent donc d'obtenir des rendements de formation de 10 à 20% en (scFv)₂-Fc et de 20 à 30% en scFv-Fc. Les mélanges réactionnels contenant les (scFv)₂-Fc et scFv-Fc, ainsi que le Fc et le scFv restants ont directement été incubés sur des cellules SK-BR-3 surexprimant le récepteur HER2 pour tester leur liaison, sans purification préalable. Nous avons alors démontré que les (scFv)₂-Fc (voire scFv-Fc) reconstitués par chimie click se fixent de façon spécifique à ce récepteur, à des concentrations du même ordre de grandeur que le (scFv)₂-Fc produit classiquement en cellules eucaryotes.

Désormais, il reste à évaluer la capacité du (scFv)₂-Fc clické à inhiber la prolifération de cette lignée SK-BR-3 par un test de viabilité cellulaire. Le Fab' 4D5 (monovalent) a été décrit comme se fixant sur cette lignée avec la même affinité que le F(ab')₂ (divalent), mais sans affecter sa croissance, contrairement au F(ab')₂ (Carter et al., 1992). Nous émettons donc l'hypothèse que le scFv 4D5 seul et le scFv-Fc n'auront aucun effet sur cette viabilité. Le Fc seul n'aura lui non plus aucune activité.

Enfin, l'objectif final est de comparer la capacité du (scFv)₂-Fc (voire du scFv-Fc) à inhiber la croissance tumorale d'une xénogreffe de la lignée cellulaire de cancer de l'ovaire SK-OV-3. Deux scFv anti-HER2 sélectionnés grâce à la banque de phages développée par l'équipe pour exprimer des scFv solubles dans le cytoplasme de *E. coli* (Philibert et al., 2007) ont été produits avec le tag Qtag His₆ en C-terminal. Après purification, ils seront eux aussi clickés au Fc puis

testés *in vivo* en parallèle du scFv 4D5. Si les tests se révèlent concluants, nous aurons alors fait la preuve de concept qu'il est possible de produire des scFv en cytoplasme d'*E. coli*, puis de les coupler chimiquement à un fragment Fc en vue d'obtenir des (scFv)₂-Fc fonctionnels chez la souris, tout ceci dans une démarche de criblage d'anticorps thérapeutiques. La chimie click permettra alors de changer rapidement de fragment Fc, si l'on souhaite par exemple obtenir des interactions avec différentes cellules immunitaires. Par la suite, il serait envisageable de produire également le fragment Fc en cytoplasme d'*E. coli*, en restaurant l'interaction avec les récepteurs au Fc grâce à l'introduction de mutations ponctuelles ou de glycosylations *in vitro* ou dans des souches manipulées génétiquement. En effet, des premiers tests réalisés au laboratoire par le Dr Marianne le Gall nous ont montré que ce fragment pouvait être produit à haut rendement et de façon soluble en cytoplasme puis oxydé *in vitro* au sulfate de cuivre, au même titre que les scFv.

Au cours de ces travaux, nous avons également démontré qu'il était possible d'empêcher la dissociation du fragment Fc en présence d'agent réducteur, grâce à la formation de liaisons covalentes lysine-glutamine interchaines catalysée par la transglutaminase. Cette propriété a déjà été décrite dans le cas de l'introduction d'une séquence reconnue par la TG en C-terminal d'une immunoglobuline entière (Siegmond et al., 2015). Dans ce cas, c'est la lysine 447, le dernier résidu de la chaîne lourde, qui est impliquée. Sa délétion rend les chaînes lourdes totalement dissociables en présence d'agent réducteur. Dans notre cas, la proximité du Qtag, de la lysine 222 et des cystéines interchaines de la région charnière rendent possible une stabilisation du Fc en l'absence de ces ponts. Ces cystéines sont aussi conjugables au maléimide, sans perdre la liaison du fragment Fc aux FcγRI et II. Nous souhaitons donc appliquer cette propriété à une immunoglobuline entière. La séquence Qtag-RSDK va donc dans un premier temps être introduite en amont des cystéines de la charnière reliant les chaînes lourdes. Par la suite, nous souhaitons également appliquer cette technique à la stabilisation du pont disulfure entre la chaîne lourde et la chaîne légère. La possibilité de dériver les cystéines réduites tout en conservant la structure d'immunoglobuline dimérique ainsi que la fonctionnalité de l'anticorps seront évaluées. Si les résultats sont positifs, ils pourraient faire l'objet d'un dépôt de brevet pour la construction d'ADC.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. Construction des vecteurs contenant les tags de chimie click

1. Construction des vecteurs

Les vecteurs pET23NN et pAB1 sont digérés par l'enzyme de restriction Not I suivant le protocole de la fiche technique de cette enzyme. Le vecteur pFUSE est quant à lui digéré par les enzymes de restriction EcoRI et BglII. Après dépôt sur gel d'agarose, la bande correspondant au vecteur linéarisé est purifiée (kit Macherey Nagel *gel and PCR clean-up*). Les primers phosphorylés (Eurofins MWG) subissent une dénaturation pendant 2 min à 98°C puis une diminution relativement lente de la température 0.5°C/s jusqu'à 10°C pour permettre leur hybridation. Le vecteur digéré et les primers sont alors assemblés par ligation avec un ratio vecteur/insert de 1/3 puis transformés par choc thermique chez *E. coli* (Figure 64). Les clones obtenus sont validés par séquençage (Eurofins MWG).



Figure 64 : Principe de l'insertion d'un tag (en bleu) composé de deux oligonucléotides phosphorylés contenant des extrémités cohésives dans un vecteur préalablement digéré. Ici : digestion du pET23NN par Not I.

Les vecteurs d'expression sont schématisés dans la Figure 65. Le vecteur pFUSE est utilisé pour l'expression des Fc contenant un tag ou pour l'expression du (scFv)₂-Fc (Moutel et al., 2009). Le pAB1 et le pET23NN sont utilisés pour l'expression bactérienne (respectivement périplasmique et cytoplasmique) des scFv et Fab. Le scFv ou Fab est introduit dans tous ces vecteurs entre les sites de restriction Nco I et Not I par digestion suivant la fiche technique du fournisseur.

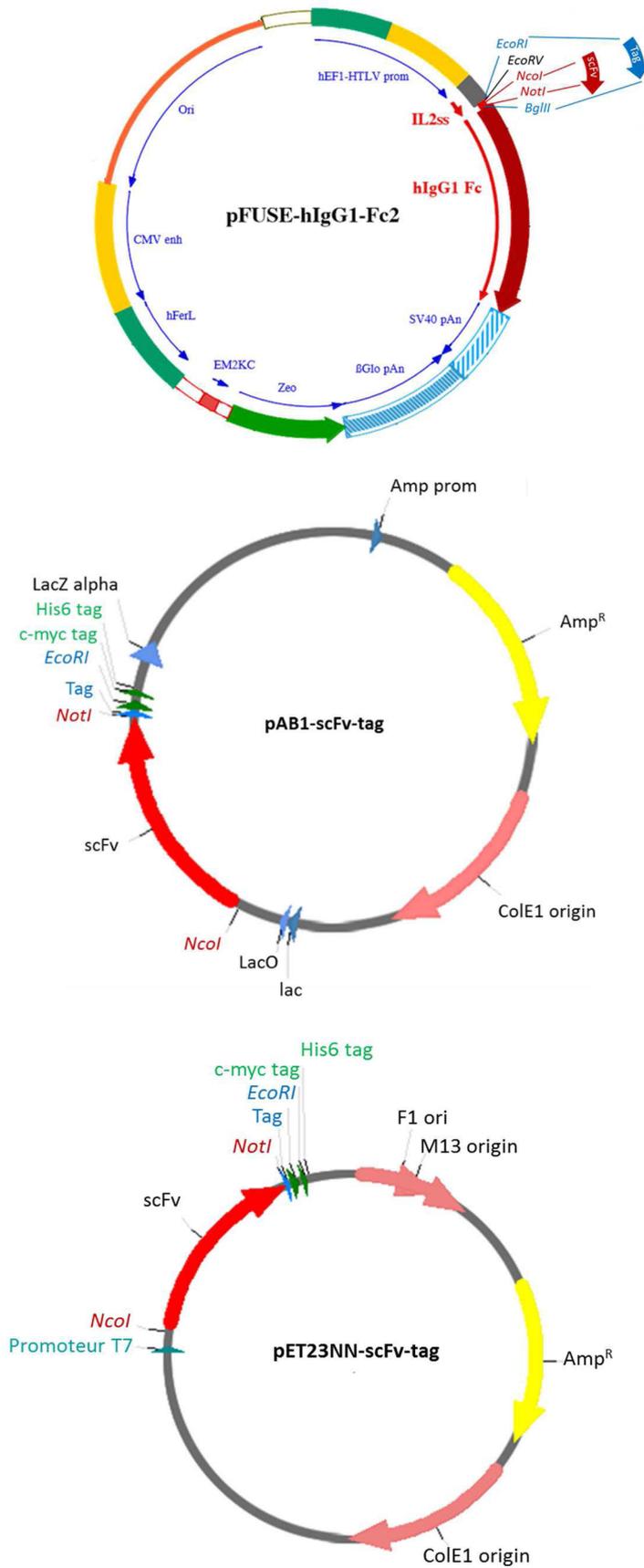


Figure 65 : Schéma des vecteurs d'expression des fragments d'anticorps. pFUSE : fragment Fc en cellules eucaryotes. pAB1 et pET23NN : fragments scFv et Fab chez *E. coli*.

2. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée a permis d'introduire une délétion, une insertion ou une mutation ponctuelle dans les plasmides. Le kit Thermo Scientific *Phusion Site-Directed mutagenesis* a été utilisé. La première étape consiste à amplifier l'ADN par PCR en utilisant des oligonucléotides phosphorylés (Eurofins MWG) suivant le mode opératoire du kit. Ces primers sont construits pour contenir une mutation ponctuelle ou une insertion par rapport au plasmide de départ, ou alors pour s'hybrider de telle sorte que l'amplification permettra de déléter une région du plasmide (Figure 66). La seconde étape est la ligation de l'ADN amplifié pour permettre de circulariser le vecteur qui est alors transformé dans *E. coli* et validé par séquençage.

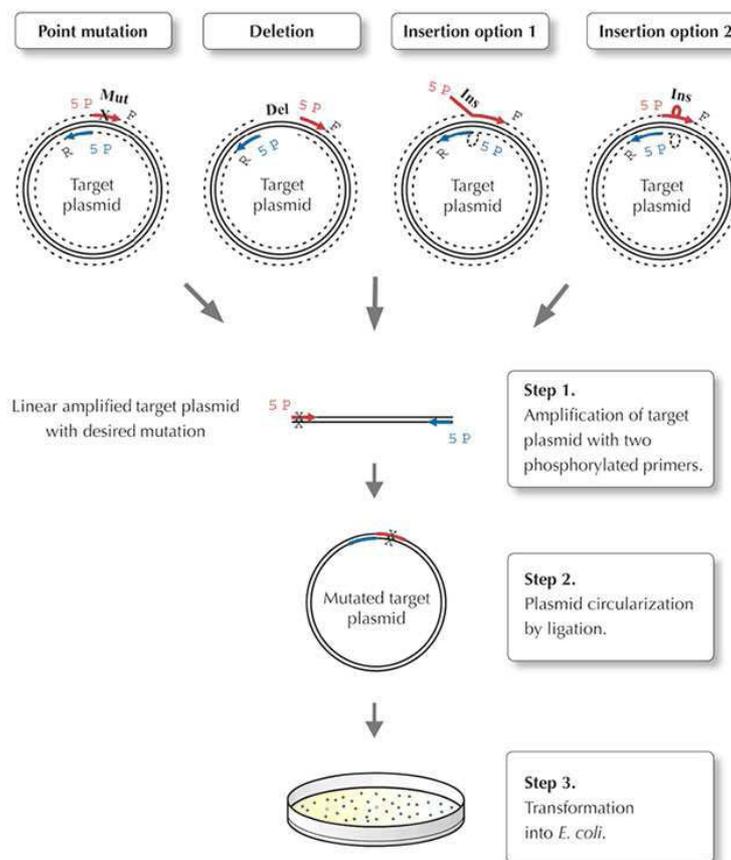


Figure 66 : Principe de la mutagenèse dirigée. D'après thermofisher.com

Cas particulier : PCR assembly

Deux oligonucléotides sont dessinés pour chevaucher la région entre la LC et la HC du pET23NN-Fab 4D5 Qtag-myc où l'on souhaite introduire le second promoteur T7. Ils contiennent les nucléotides correspondant à celui-ci à leurs extrémités. Deux PCR sont effectuées, chacune avec une amorce d'insertion et une amorce externe. Les 2 produits de PCR possèdent des extrémités qui sont complémentaires. Ils sont purifiés grâce au kit

Macherey Nagel *gel and PCR clean-up*. La dernière PCR, dite d'assemblage, est effectuée avec les 2 amorces externes (Figure 67). Toutes les PCR sont effectuées avec la Phusion polymérase (Thermo Scientific) selon les instructions du fabricant. Le produit de PCR est alors digéré par les enzymes de restriction HindIII et SspDI et inséré par ligation dans le plasmide pET23NN-Fab 4D5 Qtag-myc préalablement digéré de la même façon. Après transformation dans *E. coli*, la construction est validée par séquençage.

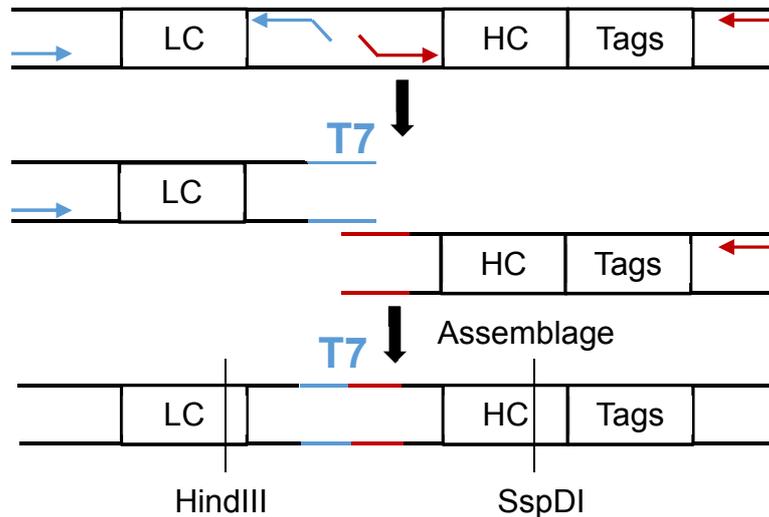


Figure 67 : Principe du *PCR assembly*.

3. Séquences protéiques des fragments construits

scFv 4D5 tag-myc

MADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQOKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS 65
GSRSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQOHYTPPTFGQGTKVELKRATPSHNSHQVPSAGGPTANS 130
GEVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFNIDTYIHVWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV 195
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT 254
Tag-AAEQKLISEEDLNAAHHHHHHH 278/282

Nom du scFv	Tag	<u>VL</u> , <u>linker</u> , <u>VH</u> , <u>c-myc</u> , <u>His tag</u>
scFv Ald tag-myc	LCTPSR	
scFv Cys-myc	CS	
scFv Qtag-myc	LLQG	

scFv 4D5 Qtag

MADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQOKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS 65
GSRSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQOHYTPPTFGQGTKVELKRATPSHNSHQVPSAGGPTANS 130

GEVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFNICKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV 195
KGRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGOGTTVTVSSAAALLQGA 260
HHHHHH 266

VL, linker, VH, **Qtag**, His tag

scFv 4D5 myc

MADIQMTOSPSSLSASVGDRTITCRASODVNTAVAWYQOKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS 65
GSRSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCOOHYTPPTFGOGTKVELKRATPSHNSHQVPSAGGPTANS 130
GEVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFNICKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV 195
KGRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGOGTTVTVSSAAAEQXLIS 260
EEDLNAAHHHHHH 274

Nom du scFv	X
scFv myc WT His ₆	K
scFv myc K3F His ₆	F

VL, linker, VH, c-myc, His tag

Fc (IgG1 humaine) + tag (vecteur pFU5E)

MYRMQLLSICIALSLALVTNS - **Tag** - RSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR 63/71
TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEOYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE 125/133
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVE 187/195
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLS 249/257
LSPGK 254/262

Nom du Fc	Tag
Fc AKT(H) ₆ Q	AKTHHHHHHLLQGA
Fc A(HG) ₃ Q	AHGHGHGLLQGA
Fc Qtag	ALLQGA

Séquence signal IL-2 clivée

Hinge inférieur (appartenant au fragment Fc)

Lysine mutée en alanine dans les constructions nommées K222A

CH2

CH3

Histidine mutée en alanine dans les constructions nommées H433A

Fc sans tag : vecteur ps878 (Germain et al., 2008)

MAIIYLILLFTAVRGLERSLQEFGSVDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV 65
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV 130
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ 195
ENYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHINHYTQKSLSLSPGK 253

Séquence signal HA clivée

Hinge inférieur (appartenant au fragment Fc)

CH2

CH3

Histidine mutée en alanine dans la construction nommée H433A

Fab 4D5 Qtag-myc

LC (kappa)

MDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQOKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG 65
SRSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQOHYTTPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT 130
ASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYAC 195
EVTHQGLSSPVTKSFNRGE**C** 215

VL, CL, **Cystéine** reliant les deux chaînes

HC

MEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV 65
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVF 130
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS 195
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKS**C**AAAL**LQGA**AEQKLISEEDLNGAAHHHHHH 253

VH, CH1, Hinge supérieur, **Cystéine** reliant les deux chaînes, **Qtag**, c-myc, His tag

B. Expression des fragments d'anticorps

1. Transfection transitoire de cellules HEK 293T

2 à 3 millions de cellules HEK 293T sont mises en culture en boîtes de Petri (diamètre 150mm) en DMEM/F-12 + glutamax, SVF 10%, antibiotique-antimycotique 1x (Gibco) (20mL par boîte). Après 48h, les cellules sont transfectées à hauteur de 30µg d'ADN par boîte avec un ratio ADN/PEI de 1/8 (soit 240 µg par boîte). Le PEI linéaire provient de Polysciences. L'ADN est dilué dans du NaCl 0.9% pour avoir un volume final de 500 µL par boîte. Le PEI en solution à 1mg/mL pH 7 est dilué dans du NaCl 0.9% pour avoir un volume final de 500 µL par boîte. Le PEI est ajouté à l'ADN puis le mélange est homogénéisé. Après 10-15 min d'incubation à TA, 1 mL de ce mélange est déposé goutte à goutte par boîte, en mélangeant. Après 4h en culture, le milieu est changé par du DMEM/F-12 + glutamax, antibiotique-antimycotique 1x. Le surnageant de culture est récupéré 5 jours plus tard. Les cellules en suspension ainsi que les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation de 15 min à 3000 rpm.

2. Préparation de bactéries compétentes au RbCl

- Pré-culture des bactéries dans 3 mL de LB sur la nuit à 37°C sous agitation.
- Ensemencement dans 250 mL de LB + MgSO₄ 20 mM , jusqu'à D₀₆₀₀ = 0,4-0,6
- Centrifugation à 4000 rpm 10 min à 4°C.
- La suite des étapes doit être réalisée avec du matériel à 4°C (tampons, pipettes, tubes,...)
- Resuspension du culot dans 100 mL de TFB1 froid (soit 1/2,5 du volume de départ)
- Incubation 5 min sur glace
- Centrifugation à 4000 rpm 10 min à 4°C
- Resuspension du culot dans 10 mL de TFB2 froid (soit 1/25 du volume de départ)
- Incubation sur glace entre 15 et 60 min avant d'aliqoter en 100 µL/tube.
- Stockage des bactéries compétentes à -80°C.

Composition des solutions :

Milieu Luria-Bertani (LB) :

par litre : 10g tryptone

5 d'extrait de levure

5g NaCl

2 mL NaOH 1N

TFB1 :

pour 500 mL : 1,48 g KOAc → 30 mM
6 g RbCl → 100 mM
0,92 g CaCl₂ → 10 mM
4,95 g MnCl₂ → 50 mM
75 mL glycerol → 15 %

Le pH est ajusté à 5,8 avec de l'acide acétique et la solution est filtrée.

TFB2 :

Pour 100 mL : 0,21 g MOPS → 10 mM
1,37 g CaCl₂ → 75 mM
0,12 g RbCl → 10 mM
15 mL glycerol → 15 %

Le pH est ajusté à 6,5 avec du KOH et la solution est filtrée.

3. Production de scFv en périplasme de BL21(DE3)

Le milieu 2x TY est utilisé (tryptone 16 g/L, extrait de levure 10 g/L, NaCl 5 g/L).

- Ensemencement d'un clone en 2xTY, ampicilline 100 µg/mL, glucose 2% à 37°C
- Culture sur la nuit à 37°C sous agitation.
- Le lendemain, dilution au dixième dans 2xTY, ampicilline 100µg/mL, glucose 0.1%. Culture à 37°C sous agitation jusqu'à une DO₆₀₀ d'environ 0.8. A ce moment tout le glucose a été consommé.
- Induction à l'IPTG 1mM final, sauf mention contraire
- Incubation à 30°C 230rpm pendant 4h sauf mention contraire
- Refroidissement de la culture sur glace
- Centrifugation 10 min à 4000 rpm à 4°C. Surnageant : fraction milieu de culture

Il y a ensuite 3 types de lyses possibles :

a. Lyse par choc osmotique

- Resuspension du culot dans 1/20 volume de Tris-HCl 30mM pH 8, EDTA 1mM, saccharose 20%. Ce milieu hypertonique va faire gonfler la membrane bactérienne.
- Incubation 20min sur glace
- Centrifugation 10 min-6000g-4°C. Normalement les membranes n'ont pas encore été lysées donc il ne devrait pas y avoir de protéines dans le surnageant.

- Resuspension du culot dans 1/20 volume de MgSO₄ ou MgCl₂ 5mM dissout dans l'eau et préalablement refroidi. Homogénéisation jusqu'à bien resuspendre tout le culot.
- Incubation 20 min sur glace. Le périplasme est alors libéré.
- Centrifugation 10 min-6000g-4°C
- Le surnageant correspond au périplasme (*fraction périplasmique*)
- Le culot contient des « sphéroplastés » qui sont constitués par le cytoplasme et la membrane interne de la bactérie.
- Si l'on souhaite séparer le cytoplasme et la fraction insoluble, on peut congeler le culot à -20°C, le reprendre en tampon de lyse : HEPES, NaCl, EDTA, lysozyme, NP40 (voir le protocole de production en cytoplasme) puis centrifuger.

b. Lyse par le lysozyme

Ce fractionnement est basé sur le protocole décrit par Osborn (Osborn et al., 1972).

- Resuspension du culot dans 1/10 volume de Tris-HCl 20mM pH 8, saccharose 0.7M = 24% (w/v) Les bactéries obtenues sont appelées plasmocytes.
- Ajout de lysozyme de blanc d'oeuf de poule (Sigma Aldrich) à 2 mg/mL dans une solution d'EDTA 4.5 mM pH 8. 125µL de ce mélange est ajouté par mL de plasmocytes
- Incubation 30 min sur glace
- Centrifugation 10 min-13 400rpm-4°C
- Le surnageant correspond à la *fraction périplasmique*
- Congélation du culot qui correspond aux sphéroplastés
- Resuspension dans du Tris-HCl 20mM pH8 (dans le même volume que celui contenant les plasmocytes + lysozymes)
- Sonication pendant 5s pour compléter la lyse
- Centrifugation 10 min-13 400rpm-4°C
- Le surnageant correspond à la *fraction cytoplasmique soluble*. Le culot est repris dans le même volume de Tris-HCl 20mM pH 8 et correspond aux membranes et aux protéines insolubles comme les agrégats : *fraction insoluble*.

c. Lyse par la polymyxine B

- Reprise du culot dans 1/50 volume de sulfate de polymyxine B (Sigma Aldrich) à 1 mg/mL dissoute en Tris 20mM pH8
- Incubation 30 min sur glace
- Centrifugation 10 min-13 400rpm-4°C
- Le surnageant correspond à la *fraction périplasmique*
- Congélation du culot qui correspond aux sphéroplastés
- Resuspension dans du Tris-HCl 20mM pH8

- Sonication pendant 5s pour compléter la lyse
- Centrifugation 10 min-13 400rpm-4°C
- Le surnageant correspond à la *fraction cytoplasmique soluble*. Le culot est repris dans le même volume de Tris-HCl 20mM pH 8 et correspond aux membranes et aux protéines insolubles comme les agrégats : *fraction insoluble*.

4. Production de scFv en cytoplasme de BL21(DE3)

Lorsque les scFv ont été induits à l'IPTG, le même protocole que celui de la production périplasmique a été utilisé. Seul la lyse des culots bactériens diffère.

a. Auto-induction

Le milieu auto-inductible utilisé a été développé par F.W. Studier (Studier, 2005). La solution M (1x) est composée de PO₄ 50mM, NH₄Cl 50mM et Na₂SO₄ 5mM. Les 50mM de phosphate sont apportés par 25mM de Na₂HPO₄ et 25mM de KH₂PO₄. La solution 5052 (1x) est composée de glycérol 0.5 % (w/v), glucose 0.05% (w/v) et α-lactose 0.2% (w/v). L'auto-induction est réalisée suivant les étapes suivantes :

- Ensemencement de 1 à 5 clones en LB ampicilline 100 µg/mL
- Culture à 37°C sous agitation jusqu'à ce que la DO₆₀₀ soit de 0.4-0.6 (phase exponentielle de croissance)
- Dilution au centième dans du milieu auto-inductible : LB, M 1x, 5052 1x, MgSO₄ 2 mM, ampicilline 100 µg/mL
- Culture pendant 1 à 2h à 37°C sous agitation
- Culture pendant une vingtaine d'heures à 20°C sous agitation 230 rpm
- Centrifugation 10 min à 4000 rpm puis congélation et conservation des culots à -20°C

b. Lyse des bactéries

- Reprise du culot dans du tampon de lyse (même volume que le volume de culture dont le culot est issu) : (HEPES 10mM, EDTA 0.5mM, NaCl 30mM) pH 8 ; Nonidet P-40 0.65% (w/v) ; lysozyme de blanc d'oeuf de poule (Sigma Aldrich) 0.1mg/mL ; Benzonase® Nuclease (Merck Millipore) 2U/mL
- Incubation 1h à 4°C sous agitation
- Ajout de NaCl 100mM pour arriver à une concentration physiologique de 130mM
- Centrifugation à 10 000 rpm pendant 30min à 4°C
- Récupération du surnageant qui correspond à la *fraction soluble* (cytoplasme + périplasma). Le culot correspond à la *fraction insoluble* (agrégats de protéines et membranes)

c. Cas particulier : production de scFv avec une surexpression de la FGE

Le plasmide pBAD/myc-his A Rv0712 (FGE) a été acheté chez Addgene. Il a été digéré par les enzymes de restriction PflFI et BspHI. Le promoteur *ara*, le gène régulateur AraC et le gène Rv0712 ont alors été transférés dans un plasmide pACYC184 préalablement digéré par PflFI et NcoI, grâce à la compatibilité des extrémités de digestion par NcoI et BspHI. Après transformation chez *E.coli*, un clone a été validé par séquençage.

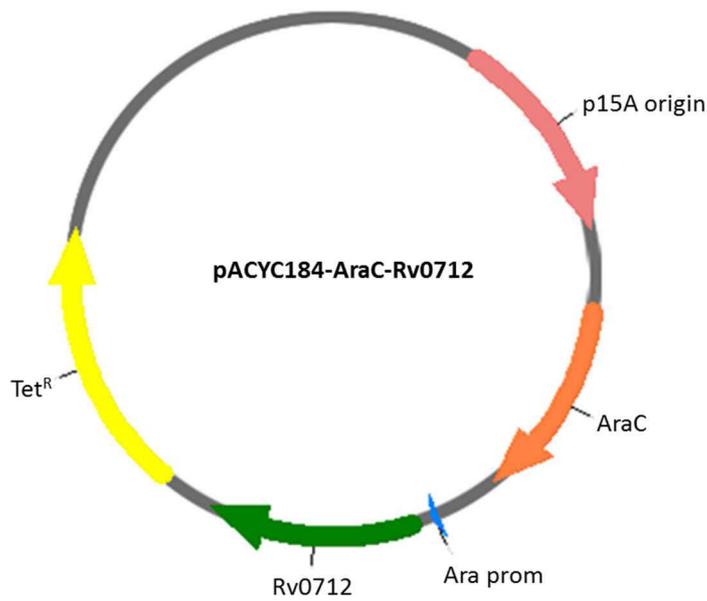


Figure 68 : Schéma du plasmide pACYC184-AraC-Rv0712.

La souche BL21(DE3) transformée par pACYC184-AraC-Rv0712 est rendue compétente au RbCl (voir B.2). Cette souche a alors été transformée par le vecteur pET23NN-scFv 4D5 Ald tag myc. Un clone isolé est mis en préculture en LB, glucose 1%, ampicilline 100µg/mL, tétracycline 12µg/mL à 37°C sous agitation jusqu'à obtenir une DO_{600} d'environ 1.

Cette préculture est conservée à 4°C. Le lendemain, elle est centrifugée pour éliminer le glucose du milieu puis diluée au centième en LB, ampicilline 100 µg/mL, tétracycline 12 µg/mL. Les bactéries sont cultivées à 37°C sous agitation jusqu'à obtenir une DO_{600} de 0.4-0.6. L'expression de la FGE est induite avec 0.25% d'arabinose pendant 1h à 37°C sous agitation. La culture est refroidie à 20°C pendant une trentaine de minutes puis l'expression du scFv est induite avec 400 µM d'IPTG pendant environ 24h à 20°C sous agitation. Les bactéries sont alors récupérées par centrifugation puis lysées comme dans le cas d'une auto-induction.

5. Production de scFv en cytoplasme pseudo-oxydant de BL21(DE3)/pFH255

La souche BL21(DE3) utilisée habituellement a été transformée par le plasmide pFH255 (Nguyen et al., 2011) qui nous a été fourni par le Dr. Lloyd Ruddock de l'Université de Oulu en Finlande. Un clone a été rendu compétent au RbCl suivant le protocole B.2. Cette souche a alors été transformée par le pET23NN-scFv et l'induction des enzymes Erv1 et DsbC contenues dans le pFH255 ainsi que du scFv a été réalisée suivant ces étapes :

- Préculture : ensemencement de 1 à 5 clones en LB, chloramphénicol 25 µg/mL, ampicilline 100 µg/mL. Incubation à 37°C sous agitation jusqu'à une DO₆₀₀ d'environ 1.
- Culture : dilution de la préculture au 1/100 en LB, chloramphénicol 25 µg/mL, ampicilline 100 µg/mL. Incubation à 37°C sous agitation jusqu'à une DO₆₀₀ de 0.4-0.6
- Induction des enzymes Erv1 et DsbC à l'arabinose 0.5% pendant 30min à 30°C sous agitation
- Induction du scFv à l'IPTG 1mM pendant 20h à 20°C à 230-250 rpm.
- Centrifugation 10 min à 4000rpm
- Congélation des culots
- Lyse : voir le protocole A.1.b

C. Purification des fragments d'anticorps

1. Purification sur protéine A

Le surnageant de culture de HEK 293T est dilué au demi avec du phosphate de sodium (NaP) 40 mM pH 8 puis filtré sur 0.45µm. Une colonne HiTrap Protein A HP 1 mL (GE Healthcare) est équilibrée par 10 mL de NaP 20mM pH 7. Le surnageant dilué est placé sous agitation. Il est passé sur cette colonne à la pompe péristaltique à un débit de 1mL/min à 4°C pendant une durée permettant le passage d'au moins 2 fois le volume de ce surnageant dilué. La colonne est ensuite lavée par 10 mL de NaP 20 mM pH 7. La DO₂₈₀, qui doit être nulle, est contrôlée au NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). La fragment Fc est élué par fractions de 500 µL avec une solution de glycine 0.1 M pH 2.7 dans des tubes contenant au préalable 50 µL de Tris 1M pH 9 pour neutraliser l'acidité. Les DO₂₈₀ sont mesurées au NanoDrop 2000 en faisant le blanc avec une mélange de 50 µL de Tris et 500 µL de glycine. Les fractions de concentrations suffisantes sont alors mises en tampon PBS suivant le protocole C.3. Les concentrations sont calculées à partir des DO₂₈₀ en utilisant la loi de Beer-Lambert et des coefficients d'extinctions molaires déterminés *in silico* par analyse des séquences protéiques.

2. Purification sur colonne de nickel

Le lysat bactérien est dilué par deux avec du TBS 2x pH 7.5 (Tris 100mM, NaCl 300mM) puis filtré sur 0.45µm. 10mM de MgSO₄ sont ajoutés pour être chélaté par l'EDTA qui pourrait décrocher les cations divalents de la résine lors de la purification, ainsi que 10 mM d'imidazole pour que la fixation sur le nickel soit plus spécifique. Une colonne His Trap HP 1 mL (GE Healthcare) est équilibrée par 10 mL de TBS 1x imidazole 10 mM pH 7.5. Le lysat est injecté sur la colonne à la pompe péristaltique à 4°C à 1 mL/min sous agitation pendant une durée permettant le passage d'au moins 2 fois le volume de ce surnageant dilué. La colonne est alors lavée par 10-15 mL de TBS 1x imidazole 20 mM pH 7.5. La DO₂₈₀, qui doit être nulle, est contrôlée au NanoDrop 2000 en faisant le blanc avec le tampon de lavage car l'imidazole est susceptible d'absorber à 280 nm. Les fragments sont alors élués en fractions de 1 mL par du TBS 1x imidazole 200 mM pH 7.5. Les fractions sont dosées au NanoDrop 2000 et mélangées de telle sorte que le mélange ait une concentration de 2 à 2.5 mg/mL.

Dans le cas des scFv cytoplasmiques, une oxydation par 20 équivalents molaires de sulfate de cuivre est réalisée pendant 16h à TA. Ils sont alors conservés à 4°C.

3. Dessalage/changement de tampon

Cette méthode est utilisée soit pour changer de tampon, par exemple après une purification, soit pour éliminer les réactifs en excès après les réactions chimiques ou enzymatiques.

Les colonnes ou Zeba™ Spin 7k MWCO (Thermo Scientific) ont servi pour les dessalages par centrifugation. Elles ont été utilisées suivant les instructions du fabricant.

Des colonnes contenant la résine Sephadex™ G-25 ont permis des dessalages par gravité en retenant les composés de masse inférieure à 5 kDa. En fonction des volumes à déposer, les PD MiniTrap G-25, PD MidiTrap G-25 ou PD-10 desalting columns (GE Healthcare) ont été utilisées suivant les instructions du fabricant.

D. Fonctionnalisation et couplage des fragments scFv et Fc

1. Fonctionnalisation par le PLP

Le PLP est dissout à 50 mM extemporanément en PBS pH 6.5. Le pH est ajusté avec de la soude 1 M pour rester à un pH d'environ 6.5 après dissolution. Le Fc AKT(H)₆Q (initialement en PBS pH 7.2) est mélangé au PLP et dilué avec du PBS pH 6.5 pour obtenir une concentration finale de 1 mg/mL en Fc et 5mM en PLP. Après 18h à 37°C, le PLP est éliminé et le Fc est passé en tampon acétate de potassium 100 mM pH 4.6 sur Zeba Spin. La cétone

est détectée par couplage de 30 équivalents molaires d'hydroxylamine Alexa Fluor 488 (Invitrogen) par Fc (donc 15 eq par cétone potentiellement formée). L'acétate de potassium est le tampon dans lequel le meilleur rendement de formation d'oxime a été obtenu dans ce contexte (Hudak et al., 2012). Après 20h à température ambiante à l'obscurité, la réaction est stoppée par ajout du volume de Tris 1M pH 7.5 approprié pour avoir une concentration finale de 160 mM. Les échantillons sont alors déposés sur SDS-PAGE et analysés par fluorescence.

2. Fonctionnalisation par les bis-sulfones

Les bis-sulfones ont été synthétisées par le Dr. Nicolas Joubert (GICC Tours, UMR 7292) et sont schématisées dans la Figure 69. Elles sont reprises à 100 mM en DMSO. Le Fc est mis en réaction avec 8 équivalents molaires de bis-sulfone par Fc (donc 4 eq par tag poly-His) en PBS, DMSO 10%, EDTA 10 mM pendant 6h à température ambiante. Le DMSO permet de minimiser la précipitation des bis-sulfones. L'EDTA améliore les rendements de réaction, probablement par chélation de cation métalliques. L'excès de sulfone est éliminé par dessalage sur Zeba Spin. Le Fc est alors couplé au DBCO-PEO₄-CR110 ou à l'azide-fluor 488 puis déposé sur SDS-PAGE. La fluorescence est détectée puis le gel est coloré au bleu de Coomassie.

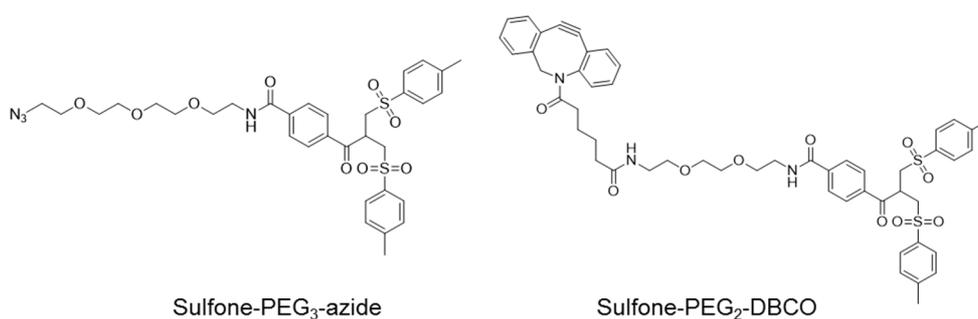


Figure 69 : Structure des bis-sulfones azide et DBCO.

3. Fonctionnalisation sur la/les cystéine(s) libre(s)

a. Couplage du maléimide

i scFv

Le scFv 4D5 Cys-myc produit dans le cytoplasme d'*E. coli* est oxydé par 20 équivalents molaires de sulfate de cuivre pendant 16h à TA. Le cuivre est éliminé par dessalage sur Zeba Spin et le scFv est mis en tampon TBS imidazole 200 mM pH 6.5. Il est ensuite réduit pendant 1h à 37°C par 20 équivalents molaires de TCEP-HCl (Sigma Aldrich) dont la solution stock est à 50 mM en eau et dont le pH a été ajusté à 6.5 par ajout de soude. Le maléimide-PEG₄-DBCO (Figure 70A, Jena Bioscience ou Sigma Aldrich) dissout en DMSO est ajouté pour avoir

20 équivalents molaires pendant 1h à TA. Après réaction, le TCEP et l'excès de maléimide sont éliminés par dessalage sur Zeba Spin et passage du scFv en TBS imidazole 200 mM pH 7.5 éventuellement supplémenté par 10 mM d'EDTA pour éviter la réoxydation des ponts disulfures par des traces de métaux divalents.

ii Fc

Le Fc A(HG)₃Q est stabilisé par couplage des lysines et glutamines N-terminales catalysé par 30 U TG/ μ mol de Fc pendant une nuit à 37°C. Les ponts interchaines sont réduits par 200 équivalents molaires de TCEP-HCl par Fc pendant 1h30 à 37°C. Le pH est ajusté à 5-6 par ajout de soude au moment de l'ajout du TCEP. Après cette réduction, 80 équivalents molaires de maléimide-PEG₄-DBCO par Fc sont mis en réaction pendant 1h à TA, soit 20 équivalents par cystéine libre. L'excès de maléimide ainsi que le TCEP sont éliminés par dessalage sur Zeba Spin 7k MWCO équilibrée en PBS.

b. Couplage de l'APN

Le scFv 4D5 Cys-myc produit dans le cytoplasme d'*E. coli* est oxydé par 20 équivalents molaires de sulfate de cuivre pendant 16h à TA. Le cuivre est éliminé par dessalage sur Zeba Spin et le scFv est passé en TBS imidazole 200 mM EDTA 10 mM pH 7.5. Il est ensuite réduit pendant 1h à 37°C par 20 équivalents molaires de TCEP HCl (Sigma Aldrich) dont la solution stock est à 50 mM en eau et dont le pH a été ajusté à 7 par ajout de soude. L'APN-BCN (Figure 70B, Sigma Aldrich) dissout en DMSO est ajouté pour avoir entre 5 et 20 équivalents molaires pendant 2 à 22 h à TA. Après réaction, le TCEP et l'excès d'APN sont éliminés par dessalage sur Zeba Spin et passage du scFv en TBS imidazole 200 mM pH 7.5.

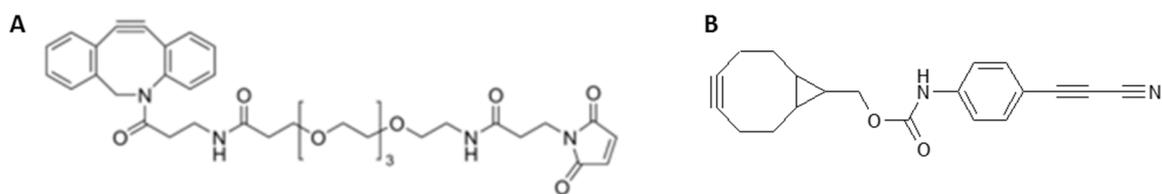


Figure 70 : Structure des linkers couplés sur des cystéines. A : maléimide-PEG₄-DBCO. B : APN-BCN.

4. Fonctionnalisation par la transglutaminase

Les composés amine-PEG₃-azide et amine-PEG₄-DBCO proviennent de Jena Bioscience (Jena, Allemagne), la transglutaminase microbienne de Zedira (Darmstadt, Allemagne), et le fragment Fc d'IgG humaine utilisé comme témoin sans tag de Merck (référence AG100). L'amine-PEG₁₂-azide a été synthétisée par le Dr Sylvain Ursuegui (Université de Strasbourg). Les composés sont schématisés dans la Figure 71.

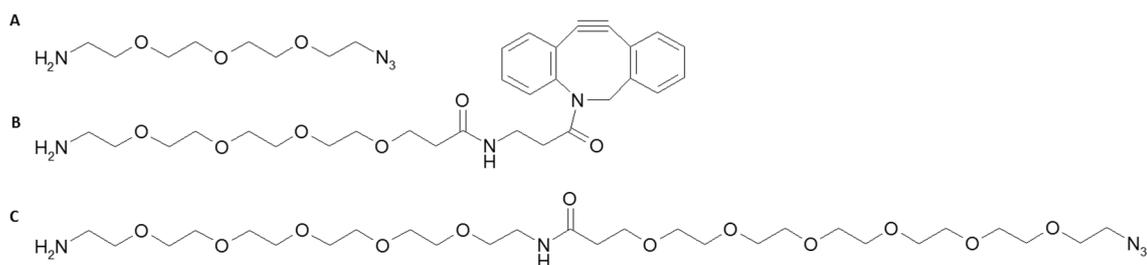


Figure 71 : Structures des amines. A : amine-PEG₃-azide. B : amine-PEG₄-DBCO. C : amine-PEG₁₂-azide.

Les amines sont en stock dans 50 mM de DMSO et la TG est reprise à 0.1 U/ μ L par de l'eau comme indiquée sur la fiche technique du fabricant. Les scFv ou Fc sont mis en présence de 10 équivalents molaires d'amine par glutamine réactive (donc 20 équivalents par Fc) et 15 unités de TG par μ mol de fragment et par glutamine réactive (donc 30 U/ μ mol de Fc) pendant une nuit à 37°C. La réaction se fait en PBS pH 7.2-7.4 pour les fragments Fc et en TBS imidazole 200 mM pH 7.5 CuSO₄ 1-1.5 mM pour les fragments scFv. La concentration finale en protéines est d'au moins 1 mg/mL. L'excès d'amine est éliminé par dessalage.

5. Détection des fonctions de chimie click par fluorescence

Les composés chimiques permettant d'introduire les fonctions azide et DBCO (linkers) sont couplés aux fragments d'anticorps comme indiqué dans chaque stratégie. L'excès de linker est éliminé par dessalage suivant le protocole C.3. Les composés dérivés par N₃ sont mis en réaction avec le CR110-PEO₄-DBCO (Interchim Fluoprobes) à raison de 15 éq molaires par N₃ introduit pendant 4h à température ambiante et à l'obscurité. Les composés dérivés par DBCO sont traités dans les mêmes conditions par de l'azide-fluor 488 (Sigma Aldrich). Ces deux composés sont appelés différemment mais leur fluorophore est le même, il est donc possible de comparer leurs intensités de fluorescence (Figure 72).

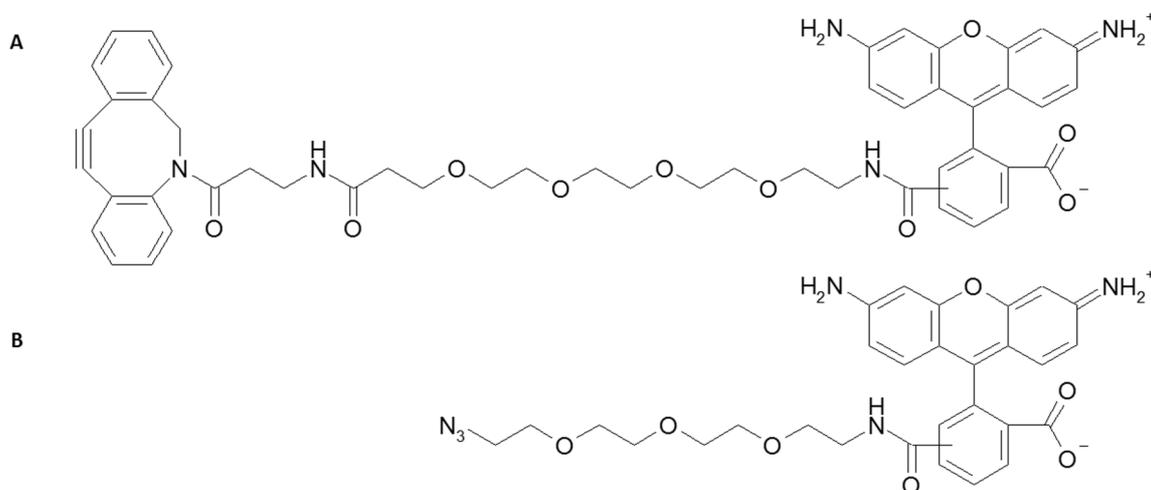


Figure 72 : Structure des fluorophores. A : DBCO-PEO₄-CR110. B : azide fluor 488.

Une fois la réaction achevée, les échantillons sont mis en tampon Laemmli réducteur (100 mM de DTT final) ou non réducteur pendant 5min à 95°C puis déposés sur SDS-PAGE. Après migration, la fluorescence au sein du gel est détectée sur une G:Box (Syngene) en excitant les fluorophores par un module Epi Green LED (540nm) et en détectant leur émission avec le filtre 565 nm qui couvre une gamme de longueurs d'onde de 556 à 579nm.

Suite à cette détection, le gel est coloré au bleu de Coomassie.

6. Quantification des couplages entre scFv et Fc

Sur SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie, l'intensité des bandes est proportionnelle à la masse de protéines déposée. Cette intensité (*i*) est mesurée par intégration de l'air des pics sur ImageJ ou par mesure des volumes bruts des bandes sur Gene Tools. Dans les formules suivantes, *i* correspond à l'intensité des bandes, *M* à la masse molaire des fragments d'anticorps. Grâce aux SDS-PAGE en conditions non réductrices, le rendement de formation de (scFv)₂-Fc est calculé avec :

$$\% (\text{scFv})_2 - \text{Fc} = \frac{n((\text{scFv})_2 - \text{Fc})}{n((\text{scFv})_2 - \text{Fc})_{\text{max}}} * 100 \text{ avec :}$$

$$n((\text{scFv})_2 - \text{Fc}) = \frac{i((\text{scFv})_2 - \text{Fc})}{M((\text{scFv})_2 - \text{Fc})} \text{ et } n((\text{scFv})_2 - \text{Fc})_{\text{max}} = \frac{i((\text{scFv})_2 - \text{Fc})}{M((\text{scFv})_2 - \text{Fc})} + \frac{i(\text{scFv} - \text{Fc})}{M(\text{scFv} - \text{Fc})} + \frac{i(\text{Fc})}{M(\text{Fc})}$$

Le rendement de formation de scFv-Fc est calculé de la même façon.

Grâce aux SDS-PAGE en conditions réductrices, le rendement global de la réaction de chimie click, qui correspond au rendement de formation du scFv-Fc_m (Fc_m = Fc monomérique), est calculé par :

$$\% \text{scFv} - \text{Fc}_m = \frac{n(\text{scFv} - \text{Fc}_m)}{n(\text{scFv} - \text{Fc}_m)_{\text{max}}} * 100 \text{ avec : } n(\text{scFv} - \text{Fc}_m) = \frac{i(\text{scFv} - \text{Fc}_m)}{M(\text{scFv} - \text{Fc}_m)} \text{ et}$$

$$n(\text{scFv} - \text{Fc}_m)_{\text{max}} = 2 * n(\text{Fc restant}) + n(\text{scFv} - \text{Fc}_m) = 2 * \frac{i(\text{Fc restant})}{M(\text{Fc restant})} + \frac{i(\text{scFv} - \text{Fc}_m)}{M(\text{scFv} - \text{Fc}_m)}$$

E. Tests fonctionnels

1. Test de stabilité thermique

Le scFv à 0.1 mg/mL en tampon TBS imidazole 200 mM pH 7.5 est mélangé au Sypro orange (Thermo Fisher) 5x dans un volume final de 20 µL puis chauffé de 24 à 95°C à une vitesse de 0.03°C/s dans un thermocycleur LightCycler 480 (Roche). Les intensités de fluorescence obtenues sont soustraites par celles du TBS imidazole 200 mM pH 7.5 seul mélangé au Sypro

orange dans les mêmes conditions. Le même protocole est appliqué pour le Fc mais avec du tampon PBS.

2. Détection par western blot

L'anti-polyhistidine HRP (A7058), l'anti IgG humaine (Fc spécifique) HRP (A0170) et l'anti IgG humaine (Fab spécifique) (I5260) proviennent de Sigma Aldrich. L'anti c-myc 9E10 (sc-40), l'anti chèvre HRP (sc-2304) et l'anti souris HRP (sc-2314) proviennent de chez Santa Cruz.

3. Analyse des fragments Fc par spectrométrie de masse

Les fragments Fc (4µg) sont dénaturés dans du tampon Tris 200 mM pH 8.6 contenant 5 M d'urée. Après réduction des ponts disulfures (DTT 10 mM, NH₄HCO₃ 100 mM, 45 min à 55°C) et alkylation des cystéines obtenues (iodoacétamide 55 mM, NH₄HCO₃ 100 mM, 30 min à TA à l'obscurité), l'échantillon est dilué 4 fois avec le tampon de la protéase Glu-C (sequencing grade, Promega). L'enzyme est ajoutée pour obtenir un ratio protéase/substrat de 1/20. La digestion a lieu sur une nuit à 37°C. Après ajout de 0.05% d'acide trifluoroacétique, les échantillons sont dessalés avec des cônes Omix C18 (Agilent Technologies) puis séchés sous vide. Ils sont ensuite dissouts dans 10 µL d'acide formique à 0.1% (FA) et injectés sur le système de chromatographie Ekspert NanoLC 400 (Sciex) équipé d'une colonne C18 (Discovery BIO Wide Pore, 3 µm, 0.5x10 cm, Supelco). Les peptides sont alors séparés par un gradient d'acétonitrile. Cette chromatographie est couplée à un spectromètre de masse TripleTOF 5600 (Sciex). Les peptides sont identifiés par le logiciel ProteinPilot grâce à la base Uniprot/Swissprot supplémentée avec les séquences N-terminales supposées des 2 fragments Fc d'intérêt tronquées à différentes positions. Seuls les peptides correspondant à un score de 99% de probabilité sont présentés.

4. Cytométrie en flux

Les anticorps anti-Histidine tag (AbD Serotec, MCA1396F) et anti IgG humaine (spécifique du fragment Fc) (Sigma Aldrich, F9512) tous deux couplés au fluorophore FITC ont été utilisés pour la détection.

Les cellules sont cultivées dans le milieu approprié puis déposées à hauteur de 500 000 par condition testée. 2 lavages PBS/BSA 1% sont effectués (1 mL par tube). Entre chaque lavage, les cellules sont culotées par centrifugation pendant 5 min à 1100 rpm. L'anticorps primaire dilué en PBS/BSA 1% pour avoir un volume final de 100 µL est incubé pendant 1h à 4°C à la concentration mentionné pour chaque cas. Il est éliminé par 2 lavages PBS/BSA 1%. Entre chaque lavage, les cellules sont culotées par centrifugation pendant 5 min à 1100 rpm.

L'anticorps secondaire couplé au FITC dilué en PBS/BSA 1% à la concentration indiquée par le fabricant pour avoir un volume final de 100 µL est incubé pendant 50 min à 4°C à l'obscurité. Il est éliminé par 3 lavages PBS/BSA 1%. Entre chaque lavage, les cellules sont culotées par centrifugation pendant 5 min à 1100 rpm. Les cellules sont reprises dans 500 µL de PBS. Le tri cellulaire et la détection de la fluorescence sont réalisés sur un cytomètre Gallios™ (Beckman-Coulter).

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, G.P., McCartney, J.E., Tai, M.-S., Oppermann, H., Huston, J.S., Stafford, W.F., Bookman, M.A., Fand, I., Houston, L.L., and Weiner, L.M. (1993). Highly Specific in Vivo Tumor Targeting by Monovalent and Divalent Forms of 741F8 Anti-c-erbB-2 Single-Chain Fv. *Cancer Res.* *53*, 4026–4034.
- Adams, G.P., Schier, R., McCall, A.M., Simmons, H.H., Horak, E.M., Alpaugh, R.K., Marks, J.D., and Weiner, L.M. (2001). High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. *Cancer Res.* *61*, 4750–4755.
- Adlersberg, J.B. (1976). The immunoglobulin hinge (interdomain) region. *Ric. Clin. Lab.* *6*, 191–205.
- Agard, N.J., Prescher, J.A., and Bertozzi, C.R. (2004). A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 15046–15047.
- Agarwal, P., van der Weijden, J., Sletten, E.M., Rabuka, D., and Bertozzi, C.R. (2013a). A Pictet-Spengler ligation for protein chemical modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 46–51.
- Agarwal, P., Kudirka, R., Albers, A.E., Barfield, R.M., de Hart, G.W., Drake, P.M., Jones, L.C., and Rabuka, D. (2013b). Hydrazino-Pictet-Spengler ligation as a biocompatible method for the generation of stable protein conjugates. *Bioconjug. Chem.* *24*, 846–851.
- Alewine, C., Hassan, R., and Pastan, I. (2015). Advances in Anticancer Immunotoxin Therapy. *The Oncologist* *20*, 176–185.
- Almagro, J.C. (2012). Natural and man-made V-gene repertoires for antibody discovery. *B Cell Biol.* *3*, 342.
- Alt, K., Paterson, B.M., Westein, E., Rudd, S.E., Poniger, S.S., Jagdale, S., Ardipradja, K., Connell, T.U., Krippner, G.Y., Nair, A.K.N., et al. (2015). A versatile approach for the site-specific modification of recombinant antibodies using a combination of enzyme-mediated bioconjugation and click chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *54*, 7515–7519.
- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H., and Motoki, M. (1989). Purification and Characteristics of a Novel Transglutaminase Derived from Microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* *53*, 2613–2617.
- Axup, J.Y., Bajjuri, K.M., Ritland, M., Hutchins, B.M., Kim, C.H., Kazane, S.A., Halder, R., Forsyth, J.S., Santidrian, A.F., Stafin, K., et al. (2012). Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 16101–16106.
- Baldi, L., Hacker, D.L., Adam, M., and Wurm, F.M. (2007). Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnol. Lett.* *29*, 677–684.
- Baldo, B.A. (2013). Adverse events to monoclonal antibodies used for cancer therapy. *Oncoimmunology* *2*.
- Baldwin, A.D., and Kiick, K.L. (2011). Tunable Degradation of Maleimide–Thiol Adducts in Reducing Environments. *Bioconjug. Chem.* *22*, 1946–1953.

- Beck, A. (2011). Biosimilar, biobetter and next generation therapeutic antibodies. *mAbs* 3, 107–110.
- Beck, A., and Reichert, J.M. (2012). Marketing approval of mogamulizumab. *mAbs* 4, 419–425.
- Berteau, O., Guillot, A., Benjdia, A., and Rabot, S. (2006). A new type of bacterial sulfatase reveals a novel maturation pathway in prokaryotes. *J. Biol. Chem.* 281, 22464–22470.
- Bibeau, F., Lopez-Crapez, E., Di Fiore, F., Thezenas, S., Ychou, M., Blanchard, F., Lamy, A., Penault-Llorca, F., Frébourg, T., Michel, P., et al. (2009). Impact of Fc{gamma}RIIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 1122–1129.
- Blackman, M.L., Royzen, M., and Fox, J.M. (2008). Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 13518–13519.
- Blomquist, A.T., and Liu, L.H. (1953). Many-membered Carbon Rings. VII. Cycloöctyne. *J. Am. Chem. Soc.* 75, 2153–2154.
- Borrok, M.J., Jung, S.T., Kang, T.H., Monzingo, A.F., and Georgiou, G. (2012). Revisiting the role of glycosylation in the structure of human IgG Fc. *ACS Chem. Biol.* 7, 1596–1602.
- Boyd, P.N., Lines, A.C., and Patel, A.K. (1995). The effect of the removal of sialic acid, galactose and total carbohydrate on the functional activity of Campath-1H. *Mol. Immunol.* 32, 1311–1318.
- Boylan, N.J., Zhou, W., Proos, R.J., Tolbert, T.J., Wolfe, J.L., and Laurence, J.S. (2013). Conjugation Site Heterogeneity Causes Variable Electrostatic Properties in Fc Conjugates. *Bioconjug. Chem.* 24, 1008–1016.
- Bregeon, D., Dennler, P., Belmont, C., Gauthier, L., Romagné, F., Fischer, E., and Schibli, R. (2013). Enzymatic Conjugation of Polypeptides.
- Brotzel, F., and Mayr, H. (2007). Nucleophilicities of amino acids and peptides. *Org. Biomol. Chem.* 5, 3814–3820.
- Brown, L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R., and Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 620–630.
- Bryden, F., Maruani, A., Savoie, H., Chudasama, V., Smith, M.E.B., Caddick, S., and Boyle, R.W. (2014). Regioselective and stoichiometrically controlled conjugation of photodynamic sensitizers to a HER2 targeting antibody fragment. *Bioconjug. Chem.* 25, 611–617.
- Caporale, A., Selis, F., Sandomenico, A., Jotti, G.S., Tonon, G., and Ruvo, M. (2015). The LQSP tetrapeptide is a new highly efficient substrate of microbial transglutaminase for the site-specific derivatization of peptides and proteins. *Biotechnol. J.* 10, 154–161.
- Carlson, B.L., Ballister, E.R., Skordalakes, E., King, D.S., Breidenbach, M.A., Gilmore, S.A., Berger, J.M., and Bertozzi, C.R. (2008). Function and Structure of a Prokaryotic Formylglycine-generating Enzyme. *J. Biol. Chem.* 283, 20117–20125.

- Carrico, I.S., Carlson, B.L., and Bertozzi, C.R. (2007). Introducing genetically encoded aldehydes into proteins. *Nat. Chem. Biol.* 3, 321–322.
- Carter, P. (2001). Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* 1, 118–129.
- Carter, P., Kelley, R.F., Rodrigues, M.L., Snedecor, B., Covarrubias, M., Velligan, M.D., Wong, W.L.T., Rowland, A.M., Kotts, C.E., Carver, M.E., et al. (1992). High Level Escherichia coli Expression and Production of a Bivalent Humanized Antibody Fragment. *Nat. Biotechnol.* 10, 163–167.
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., and Watier, H. (2002). Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 99, 754–758.
- Chan, C.E.Z., Lim, A.P.C., Chan, A.H.Y., MacAry, P.A., and Hanson, B.J. (2010). Optimized expression of full-length IgG1 antibody in a common E. coli strain. *PloS One* 5, e10261.
- Chan, C.E.Z., Chan, A.H.Y., Lim, A.P.C., and Hanson, B.J. (2011). Comparison of the efficiency of antibody selection from semi-synthetic scFv and non-immune Fab phage display libraries against protein targets for rapid development of diagnostic immunoassays. *J. Immunol. Methods* 373, 79–88.
- Chan, C.E.Z., Lim, A.P.C., MacAry, P.A., and Hanson, B.J. (2014). The role of phage display in therapeutic antibody discovery. *Int. Immunol.* 26, 649–657.
- Chapman, A.P., Antoniw, P., Spitali, M., West, S., Stephens, S., and King, D.J. (1999). Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half-lives. *Nat. Biotechnol.* 17, 780–783.
- Cho, H., and Jaworski, J. (2014). Enzyme directed formation of un-natural side-chains for covalent surface attachment of proteins. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 122, 846–850.
- Cong, Y., Pawlisz, E., Bryant, P., Balan, S., Laurine, E., Tommasi, R., Singh, R., Dubey, S., Peciak, K., Bird, M., et al. (2012). Site-Specific PEGylation at Histidine Tags. *Bioconjug. Chem.* 23, 248–263.
- Cosma, M.P., Pepe, S., Annunziata, I., Newbold, R.F., Grompe, M., Parenti, G., and Ballabio, A. (2003). The multiple sulfatase deficiency gene encodes an essential and limiting factor for the activity of sulfatases. *Cell* 113, 445–456.
- Coulter, A., and Harris, R. (1983). Simplified preparation of rabbit Fab fragments. *J. Immunol. Methods* 59, 199–203.
- Dall'Acqua, W.F., Cook, K.E., Damschroder, M.M., Woods, R.M., and Wu, H. (2006). Modulation of the Effector Functions of a Human IgG1 through Engineering of Its Hinge Region. *J. Immunol.* 177, 1129–1138.
- Damasceno, L.M., Anderson, K.A., Ritter, G., Cregg, J.M., Old, L.J., and Batt, C.A. (2006). Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 381–389.
- Damodaran, S. (2000). WO2000070026 - A novel transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraens*.

Debets, M.F., Berkel, S.S. van, Schoffelen, S., Rutjes, F.P.J.T., Hest, J.C.M. van, and Delft, F.L. van (2010). Aza-dibenzocyclooctynes for fast and efficient enzyme PEGylation via copper-free (3+2) cycloaddition. *Chem. Commun.* *46*, 97–99.

Dennler, P., Chiotellis, A., Fischer, E., Brégeon, D., Belmont, C., Gauthier, L., Lhospice, F., Romagne, F., and Schibli, R. (2014). Transglutaminase-based chemo-enzymatic conjugation approach yields homogeneous antibody-drug conjugates. *Bioconjug. Chem.* *25*, 569–578.

Dennler, P., Bailey, L.K., Spycher, P.R., Schibli, R., and Fischer, E. (2015). Microbial transglutaminase and c-myc-tag: a strong couple for the functionalization of antibody-like protein scaffolds from discovery platforms. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* *16*, 861–867.

Detalle, L., Stohr, T., Palomo, C., Piedra, P.A., Gilbert, B.E., Mas, V., Millar, A., Power, U.F., Stortelers, C., Allosery, K., et al. (2015). Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* *60*, 6–13.

Dhodapkar, K.M., Kaufman, J.L., Ehlers, M., Banerjee, D.K., Bonvini, E., Koenig, S., Steinman, R.M., Ravetch, J.V., and Dhodapkar, M.V. (2005). Selective blockade of inhibitory Fcγ receptor enables human dendritic cell maturation with IL-12p70 production and immunity to antibody-coated tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 2910–2915.

Di Giacomo, A.M., Danielli, R., Guidoboni, M., Calabrò, L., Carlucci, D., Miracco, C., Volterrani, L., Mazzei, M.A., Biagioli, M., Altomonte, M., et al. (2009). Therapeutic efficacy of ipilimumab, an anti-CTLA-4 monoclonal antibody, in patients with metastatic melanoma unresponsive to prior systemic treatments: clinical and immunological evidence from three patient cases. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *58*, 1297–1306.

Diebold, C.A., Beurskens, F.J., de Jong, R.N., Koning, R.I., Strumane, K., Lindorfer, M.A., Voorhorst, M., Ugurlar, D., Rosati, S., Heck, A.J.R., et al. (2014). Complement Is Activated by IgG Hexamers Assembled at the Cell Surface. *Science* *343*, 1260–1263.

Dierks, T., Miech, C., Hummerjohann, J., Schmidt, B., Kertesz, M.A., and Figura, K. von (1998). Posttranslational Formation of Formylglycine in Prokaryotic Sulfatases by Modification of Either Cysteine or Serine. *J. Biol. Chem.* *273*, 25560–25564.

Dierks, T., Schmidt, B., Borissenko, L.V., Peng, J., Preusser, A., Mariappan, M., and Figura, K. von (2003). Multiple Sulfatase Deficiency Is Caused by Mutations in the Gene Encoding the Human α -Formylglycine Generating Enzyme. *Cell* *113*, 435–444.

Dijstelbloem, H.M., van de Winkel, J.G., and Kallenberg, C.G. (2001). Inflammation in autoimmunity: receptors for IgG revisited. *Trends Immunol.* *22*, 510–516.

DiLillo, D.J., and Ravetch, J.V. (2015). Fc-Receptor Interactions Regulate Both Cytotoxic and Immunomodulatory Therapeutic Antibody Effector Functions. *Cancer Immunol. Res.* *3*, 704–713.

Dommerholt, J., Schmidt, S., Temming, R., Hendriks, L.J.A., Rutjes, F.P.J.T., van Hest, J.C.M., Lefeber, D.J., Friedl, P., and van Delft, F.L. (2010). Readily Accessible Bicyclononynes for Bioorthogonal Labeling and Three-Dimensional Imaging of Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* *49*, 9422–9425.

Drake, P.M., Albers, A.E., Baker, J., Banas, S., Barfield, R.M., Bhat, A.S., de Hart, G.W., Garofalo, A.W., Holder, P., Jones, L.C., et al. (2014). Aldehyde Tag Coupled with HIPS

Chemistry Enables the Production of ADCs Conjugated Site-Specifically to Different Antibody Regions with Distinct in Vivo Efficacy and PK Outcomes. *Bioconjug. Chem.* **25**, 1331–1341.

Dumont, J., Ewart, D., Mei, B., Estes, S., and Kshirsagar, R. (2015). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit. Rev. Biotechnol.* 1–13.

Ecker, D.M., Jones, S.D., and Levine, H.L. (2015). The therapeutic monoclonal antibody market. *mAbs* **7**, 9–14.

Eldin, P., Pauza, M.E., Hieda, Y., Lin, G., Murtaugh, M.P., Pentel, P.R., and Pennell, C.A. (1997). High-level secretion of two antibody single chain Fv fragments by *Pichia pastoris*. *J. Immunol. Methods* **201**, 67–75.

English, D.P., Bellone, S., Schwab, C.L., Roque, D.M., Lopez, S., Bortolomai, I., Cocco, E., Bonazzoli, E., Chatterjee, S., Ratner, E., et al. (2015). Solitomab, an epithelial cell adhesion molecule/CD3 bispecific antibody (BiTE), is highly active against primary chemotherapy-resistant ovarian cancer cell lines in vitro and fresh tumor cells ex vivo. *Cancer* **121**, 403–412.

Farias, S.E., Strop, P., Delaria, K., Galindo Casas, M., Dorywalska, M., Shelton, D.L., Pons, J., and Rajpal, A. (2014). Mass Spectrometric Characterization of Transglutaminase Based Site-Specific Antibody–Drug Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **25**, 240–250.

Feige, M.J., Nath, S., Catharino, S.R., Weinfurter, D., Steinbacher, S., and Buchner, J. (2009). Structure of the murine unglycosylated IgG1 Fc fragment. *J. Mol. Biol.* **391**, 599–608.

von Figura, K., Schmidt, B., Selmer, T., and Dierks, T. (1998). A novel protein modification generating an aldehyde group in sulfatases: its role in catalysis and disease. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **20**, 505–510.

Filpula, D. (2007). Antibody engineering and modification technologies. *Biomol. Eng.* **24**, 201–215.

Fontaine, S.D., Reid, R., Robinson, L., Ashley, G.W., and Santi, D.V. (2015). Long-term stabilization of maleimide-thiol conjugates. *Bioconjug. Chem.* **26**, 145–152.

Fontana, A., Spolaore, B., Mero, A., and Veronese, F.M. (2008). Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 13–28.

Forero-Torres, A., de Vos, S., Pohlman, B.L., Pashkevich, M., Cronier, D.M., Dang, N.H., Carpenter, S.P., Allan, B.W., Nelson, J.G., Slapak, C.A., et al. (2012). Results of a phase 1 study of AME-133v (LY2469298), an Fc-engineered humanized monoclonal anti-CD20 antibody, in FcγRIIIa-genotyped patients with previously treated follicular lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18**, 1395–1403.

Frenzel, A., Hust, M., and Schirrmann, T. (2013). Expression of recombinant antibodies. *Front. Immunol.* **4**, 217.

Gaborit, N., Larbouret, C., Vallaghe, J., Peyrusson, F., Bascoul-Mollevi, C., Crapez, E., Azria, D., Chardès, T., Poul, M.-A., Mathis, G., et al. (2011). Time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) to analyze the disruption of EGFR/HER2 dimers: a new method to evaluate the efficiency of targeted therapy using monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* **286**, 11337–11345.

- Gasser, B., Maurer, M., Gach, J., Kunert, R., and Mattanovich, D. (2006). Engineering of *Pichia pastoris* for improved production of antibody fragments. *Biotechnol. Bioeng.* *94*, 353–361.
- Gaughan, C.L. (2015). The present state of the art in expression, production and characterization of monoclonal antibodies. *Mol. Divers.*
- Gerdes, C.A., Nicolini, V.G., Herter, S., van Puijenbroek, E., Lang, S., Roemmele, M., Moessner, E., Freytag, O., Friess, T., Ries, C.H., et al. (2013). GA201 (RG7160): a novel, humanized, glycoengineered anti-EGFR antibody with enhanced ADCC and superior in vivo efficacy compared with cetuximab. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 1126–1138.
- Germain, C., Campigna, E., Salhi, I., Morisseau, S., Navarro-Teulon, I., Mach, J.-P., Pèlerin, A., and Robert, B. (2008). Redirecting NK cells mediated tumor cell lysis by a new recombinant bifunctional protein. *Protein Eng. Des. Sel.* *21*, 665–672.
- Ghetie, V., Hubbard, J.G., Kim, J.K., Tsen, M.F., Lee, Y., and Ward, E.S. (1996). Abnormally short serum half-lives of IgG in beta 2-microglobulin-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* *26*, 690–696.
- Gilmore, J.M., Scheck, R.A., Esser-Kahn, A.P., Joshi, N.S., and Francis, M.B. (2006). N-Terminal Protein Modification through a Biomimetic Transamination Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* *45*, 5307–5311.
- Goede, V., Fischer, K., Busch, R., Engelke, A., Eichhorst, B., Wendtner, C.M., Chagorova, T., de la Serna, J., Dilhuydy, M.-S., Illmer, T., et al. (2014). Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N. Engl. J. Med.* *370*, 1101–1110.
- Graff, C.P., Chester, K., Begent, R., and Wittrup, K.D. (2004). Directed evolution of an anti-carcinoembryonic antigen scFv with a 4-day monovalent dissociation half-time at 37 degrees C. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* *17*, 293–304.
- Green, L.L., Hardy, M.C., Maynard-Currie, C.E., Tsuda, H., Louie, D.M., Mendez, M.J., Abderrahim, H., Noguchi, M., Smith, D.H., Zeng, Y., et al. (1994). Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat. Genet.* *7*, 13–21.
- Grevys, A., Bern, M., Foss, S., Bratlie, D.B., Moen, A., Gunnarsen, K.S., Aase, A., Michaelsen, T.E., Sandlie, I., and Andersen, J.T. (2015). Fc Engineering of Human IgG1 for Altered Binding to the Neonatal Fc Receptor Affects Fc Effector Functions. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *194*, 5497–5508.
- Griebenow, N., Dilmaç, A.M., Greven, S., and Bräse, S. (2016). Site-Specific Conjugation of Peptides and Proteins via Rebridging of Disulfide Bonds Using the Thiol-Yne Coupling Reaction. *Bioconjug. Chem.* *27*, 911–917.
- Griffin, R.J. (1994). The medicinal chemistry of the azido group. *Prog. Med. Chem.* *31*, 121–232.
- Grinna, L.S., and Tschopp, J.F. (1989). Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast* *5*, 107–115.
- Gundersen, M.T., Keillor, J.W., and Pelletier, J.N. (2014). Microbial transglutaminase displays broad acyl-acceptor substrate specificity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *98*, 219–230.

- Gurkan, C., Symeonides, S.N., and Ellar, D.J. (2004). High-level production in *Pichia pastoris* of an anti-p185HER-2 single-chain antibody fragment using an alternative secretion expression vector. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **39**, 115–122.
- Hamilton, S.R., Bobrowicz, P., Bobrowicz, B., Davidson, R.C., Li, H., Mitchell, T., Nett, J.H., Rausch, S., Stadheim, T.A., Wischniewski, H., et al. (2003). Production of Complex Human Glycoproteins in Yeast. *Science* **301**, 1244–1246.
- Hamilton, S.R., Davidson, R.C., Sethuraman, N., Nett, J.H., Jiang, Y., Rios, S., Bobrowicz, P., Stadheim, T.A., Li, H., Choi, B.-K., et al. (2006). Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science* **313**, 1441–1443.
- Harding, F.A., Stickler, M.M., Razo, J., and DuBridge, R.B. (2010). The immunogenicity of humanized and fully human antibodies. *mAbs* **2**, 256–265.
- Hassan, S.B., Sørensen, J.F., Olsen, B.N., and Pedersen, A.E. (2014). Anti-CD40-mediated cancer immunotherapy: an update of recent and ongoing clinical trials. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **36**, 96–104.
- Heider, K.-H., Kiefer, K., Zenz, T., Volden, M., Stilgenbauer, S., Ostermann, E., Baum, A., Lamche, H., Küpcü, Z., Jacobi, A., et al. (2011). A novel Fc-engineered monoclonal antibody to CD37 with enhanced ADCC and high proapoptotic activity for treatment of B-cell malignancies. *Blood* **118**, 4159–4168.
- Henricks, L.M., Schellens, J.H.M., Huitema, A.D.R., and Beijnen, J.H. (2015). The use of combinations of monoclonal antibodies in clinical oncology. *Cancer Treat. Rev.* **41**, 859–867.
- Higel, F., Seidl, A., Sörgel, F., and Friess, W. (2016). N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **100**, 94–100.
- Hilpert, K., Hansen, G., Wessner, H., Küttner, G., Welfle, K., Seifert, M., and Höhne, W. (2001). Anti-c-myc antibody 9E10: epitope key positions and variability characterized using peptide spot synthesis on cellulose. *Protein Eng.* **14**, 803–806.
- Hinton, P.R., Johlfs, M.G., Xiong, J.M., Hanestad, K., Ong, K.C., Bullock, C., Keller, S., Tang, M.T., Tso, J.Y., Vásquez, M., et al. (2004). Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. *J. Biol. Chem.* **279**, 6213–6216.
- Hinton, P.R., Xiong, J.M., Johlfs, M.G., Tang, M.T., Keller, S., and Tsurushita, N. (2006). An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life. *J. Immunol. Baltim. Md* **176**, 346–356.
- Hodoniczky, J., Zheng, Y.Z., and James, D.C. (2005). Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc N-glycan remodeling in vitro. *Biotechnol. Prog.* **21**, 1644–1652.
- Hong, V., Steinmetz, N.F., Manchester, M., and Finn, M.G. (2010). Labeling Live Cells by Copper-Catalyzed Alkyne–Azide Click Chemistry. *Bioconjug. Chem.* **21**, 1912–1916.
- Hoogenboom, H.R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1105–1116.
- Hosono, M., Endo, K., Sakahara, H., Watanabe, Y., Saga, T., Nakai, T., Kawai, C., Matsumori, A., Yamada, T., and Watanabe, T. (1992). Human/mouse chimeric antibodies show low reactivity with human anti-murine antibodies (HAMA). *Br. J. Cancer* **65**, 197–200.

Hudak, J.E., Yu, H.H., and Bertozzi, C.R. (2011). Protein Glycoengineering Enabled by the Versatile Synthesis of Aminoxy Glycans and the Genetically Encoded Aldehyde Tag. *J. Am. Chem. Soc.* *133*, 16127–16135.

Hudak, J.E., Barfield, R.M., de Hart, G.W., Grob, P., Nogales, E., Bertozzi, C.R., and Rabuka, D. (2012). Synthesis of Heterobifunctional Protein Fusions Using Copper-Free Click Chemistry and the Aldehyde Tag. *Angew. Chem. Int. Ed.* *51*, 4161–4165.

Hudis, C.A. (2007). Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *N. Engl. J. Med.* *357*, 39–51.

Huisgen, R. (1963). 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *2*, 565–598.

Idusogie, E.E., Wong, P.Y., Presta, L.G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Ultsch, M., and Mulkerrin, M.G. (2001). Engineered Antibodies with Increased Activity to Recruit Complement. *J. Immunol.* *166*, 2571–2575.

Jeger, S. (2009). Site-specific conjugation of tumour-targeting, antibodies using transglutaminase. ETH <http://dx.doi.org/10.3929/ethz-a-005963273>.

Jeger, S., Zimmermann, K., Blanc, A., Grünberg, J., Honer, M., Hunziker, P., Struthers, H., and Schibli, R. (2010). Site-Specific and Stoichiometric Modification of Antibodies by Bacterial Transglutaminase. *Angew. Chem. Int. Ed.* *49*, 9995–9997.

Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S., and Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* *321*, 522–525.

Jong, R.N. de, Beurskens, F.J., Verploegen, S., Strumane, K., Kampen, M.D. van, Voorhorst, M., Horstman, W., Engelberts, P.J., Oostindie, S.C., Wang, G., et al. (2016). A Novel Platform for the Potentiation of Therapeutic Antibodies Based on Antigen-Dependent Formation of IgG Hexamers at the Cell Surface. *PLOS Biol* *14*, e1002344.

Josten, A., Haalck, L., Spener, F., and Meusel, M. (2000). Use of microbial transglutaminase for the enzymatic biotinylation of antibodies. *J. Immunol. Methods* *240*, 47–54.

Junttila, T.T., Parsons, K., Olsson, C., Lu, Y., Xin, Y., Theriault, J., Crocker, L., Pabonan, O., Baginski, T., Meng, G., et al. (2010). Superior in vivo efficacy of afucosylated trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. *Cancer Res.* *70*, 4481–4489.

Junutula, J.R., Raab, H., Clark, S., Bhakta, S., Leipold, D.D., Weir, S., Chen, Y., Simpson, M., Tsai, S.P., Dennis, M.S., et al. (2008a). Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nat. Biotechnol.* *26*, 925–932.

Junutula, J.R., Bhakta, S., Raab, H., Ervin, K.E., Eigenbrot, C., Vandlen, R., Scheller, R.H., and Lowman, H.B. (2008b). Rapid identification of reactive cysteine residues for site-specific labeling of antibody-Fabs. *J. Immunol. Methods* *332*, 41–52.

Junutula, J.R., Flagella, K.M., Graham, R.A., Parsons, K.L., Ha, E., Raab, H., Bhakta, S., Nguyen, T., Dugger, D.L., Li, G., et al. (2010). Engineered Thio-Trastuzumab-DM1 Conjugate with an Improved Therapeutic Index to Target Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* *16*, 4769–4778.

Kalia, J., and Raines, R.T. (2008). Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. *Angew. Chem. Int. Ed.* *47*, 7523–7526.

Kanaji, T., Ozaki, H., Takao, T., Kawajiri, H., Ide, H., Motoki, M., and Shimonishi, Y. (1993). Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* sp. strain s-8112. *J. Biol. Chem.* *268*, 11565–11572.

Kashiwagi, T., Yokoyama, K.-I., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H., and Suzuki, E. (2002). Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. *J. Biol. Chem.* *277*, 44252–44260.

Kele, P., Li, X., Link, M., Nagy, K., Herner, A., Lorincz, K., Béni, S., and Wolfbeis, O.S. (2009). Clickable fluorophores for biological labeling—with or without copper. *Org. Biomol. Chem.* *7*, 3486–3490.

Khalili, H., Godwin, A., Choi, J., Lever, R., and Brocchini, S. (2012). Comparative Binding of Disulfide-Bridged PEG-Fabs. *Bioconjug. Chem.* *23*, 2262–2277.

Kim, J.Y., Kim, Y.-G., and Lee, G.M. (2011). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *93*, 917–930.

Kim, M.T., Chen, Y., Marhoul, J., and Jacobson, F. (2014). Statistical modeling of the drug load distribution on trastuzumab emtansine (Kadcyla), a lysine-linked antibody drug conjugate. *Bioconjug. Chem.* *25*, 1223–1232.

King, M., and Wagner, A. (2014). Developments in the Field of Bioorthogonal Bond Forming Reactions—Past and Present Trends. *Bioconjug. Chem.* *25*, 825–839.

Kipriyanov, S.M., Moldenhauer, G., and Little, M. (1997). High level production of soluble single chain antibodies in small-scale *Escherichia coli* cultures. *J. Immunol. Methods* *200*, 69–77.

Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhöfer, G., Hoess, A., Wölle, J., Plückthun, A., and Virnekäs, B. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J. Mol. Biol.* *296*, 57–86.

Koerber, J.T., Hornsby, M.J., and Wells, J.A. (2015). An improved single-chain fab platform for efficient display and recombinant expression. *J. Mol. Biol.* *427*, 576–586.

Köhler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* *256*, 495–497.

Kolb, H.C., Finn, M.G., and Sharpless, K.B. (2001). Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *40*, 2004–2021.

Koniev, O., and Wagner, A. (2015). Developments and recent advancements in the field of endogenous amino acid selective bond forming reactions for bioconjugation. *Chem. Soc. Rev.* *44*, 5495–5551.

Koniev, O., Leriche, G., Nothisen, M., Remy, J.-S., Strub, J.-M., Schaeffer-Reiss, C., Van Dorsselaer, A., Baati, R., and Wagner, A. (2014). Selective Irreversible Chemical Tagging of Cysteine with 3-Arylpropionitriles. *Bioconjug. Chem.* *25*, 202–206.

de Kruif, J., Boel, E., and Logtenberg, T. (1995). Selection and application of human single chain Fv antibody fragments from a semi-synthetic phage antibody display library with designed CDR3 regions. *J. Mol. Biol.* *248*, 97–105.

- Kubetzko, S., Balic, E., Waibel, R., Zangemeister-Wittke, U., and Plückthun, A. (2006). PEGylation and Multimerization of the Anti-p185HER-2 Single Chain Fv Fragment 4D5 EFFECTS ON TUMOR TARGETING. *J. Biol. Chem.* *281*, 35186–35201.
- Kumar, A., Blum, K.A., Fung, H.C., Smith, M.R., Foster, P.A., and Younes, A. (2015). A phase 1 dose-escalation study of XmAb®2513 in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Br. J. Haematol.* *168*, 902–904.
- Kunert, R., and Reinhart, D. (2016). Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *100*, 3451–3461.
- Kuzmin, A., Poloukhine, A., Wolfert, M.A., and Popik, V.V. (2010). Surface Functionalization Using Catalyst-Free Azide–Alkyne Cycloaddition. *Bioconjug. Chem.* *21*, 2076–2085.
- Kwak, E.-A., and Jaworski, J. (2013). Controlled surface immobilization of viruses via site-specific enzymatic modification. *J. Mater. Chem. B* *1*, 3486–3493.
- Lazar, G.A., Chirino, A.J., Dang, W., Desjarlais, J.R., Doberstein, S.K., Hayes, R.J., Karki, S.B., and Vafa, O. (2010). United States Patent: 7662925 - Optimized Fc variants and methods for their generation.
- Lee, E.M., Yee, D., Busfield, S.J., McManus, J.F., Cummings, N., Vairo, G., Wei, A., Ramshaw, H.S., Powell, J.A., Lopez, A.F., et al. (2015). Efficacy of an Fc-modified anti-CD123 antibody (CSL362) combined with chemotherapy in xenograft models of acute myelogenous leukemia in immunodeficient mice. *Haematologica* *100*, 914–926.
- Lee, J.-H., Song, C., Kim, D.-H., Park, I.-H., Lee, S.-G., Lee, Y.-S., and Kim, B.-G. (2013). Glutamine (Q)-peptide screening for transglutaminase reaction using mRNA display. *Biotechnol. Bioeng.* *110*, 353–362.
- Leung, K.-M., Batey, S., Rowlands, R., Isaac, S.J., Jones, P., Drewett, V., Carvalho, J., Gaspar, M., Weller, S., Medcalf, M., et al. (2015). A HER2-specific Modified Fc Fragment (Fcab) Induces Antitumor Effects Through Degradation of HER2 and Apoptosis. *Mol. Ther.* *23*, 1722–1733.
- Lhospice, F., Brégeon, D., Belmant, C., Dennler, P., Chiotellis, A., Fischer, E., Gauthier, L., Boëdec, A., Rispaud, H., Savard-Chambard, S., et al. (2015). Site-Specific Conjugation of Monomethyl Auristatin E to Anti-CD30 Antibodies Improves Their Pharmacokinetics and Therapeutic Index in Rodent Models. *Mol. Pharm.*
- Li, J., Zhang, C., Jostock, T., and Dübel, S. (2007). Analysis of IgG heavy chain to light chain ratio with mutant Encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site. *Protein Eng. Des. Sel.* *20*, 491–496.
- Li, S., Schmitz, K.R., Jeffrey, P.D., Wiltzius, J.J.W., Kussie, P., and Ferguson, K.M. (2005). Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* *7*, 301–311.
- Liang, S.I., McFarland, J.M., Rabuka, D., and Gartner, Z.J. (2014). A modular approach for assembling aldehyde-tagged proteins on DNA scaffolds. *J. Am. Chem. Soc.* *136*, 10850–10853.
- Liebscher, S., Kornberger, P., Fink, G., Trost-Gross, E.-M., Höss, E., Skerra, A., and Bordusa, F. (2014). Derivatization of antibody fab fragments: a designer enzyme for native protein modification. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* *15*, 1096–1100.

- Lim, R.K.V., and Lin, Q. (2011). Photoinducible bioorthogonal chemistry: a spatiotemporally controllable tool to visualize and perturb proteins in live cells. *Acc. Chem. Res.* *44*, 828–839.
- Lipovsek, D., and Plückthun, A. (2004). In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display. *J. Immunol. Methods* *290*, 51–67.
- Liu, H., Bulseco, G.-G., and Sun, J. (2006). Effect of posttranslational modifications on the thermal stability of a recombinant monoclonal antibody. *Immunol. Lett.* *106*, 144–153.
- Liu, H., Ponniah, G., Zhang, H.-M., Nowak, C., Neill, A., Gonzalez-Lopez, N., Patel, R., Cheng, G., Kita, A.Z., and Andrien, B. (2014a). In vitro and in vivo modifications of recombinant and human IgG antibodies. *mAbs* *6*, 1145–1154.
- Liu, J., Wei, D., Qian, F., Zhou, Y., Wang, J., Ma, Y., and Han, Z. (2003). pPIC9-Fc: A Vector System for the Production of Single-Chain Fv-Fc Fusions in *Pichia pastoris* as Detection Reagents In Vitro. *J. Biochem. (Tokyo)* *134*, 911–917.
- Liu, S.D., Chalouni, C., Young, J.C., Junttila, T.T., Sliwkowski, M.X., and Lowe, J.B. (2015). Afucosylated antibodies increase activation of FcγRIIIa-dependent signaling components to intensify processes promoting ADCC. *Cancer Immunol. Res.* *3*, 173–183.
- Liu, X., Pop, L.M., and Vitetta, E.S. (2008). Engineering therapeutic monoclonal antibodies. *Immunol. Rev.* *222*, 9–27.
- Liu, Z., Gunasekaran, K., Wang, W., Razinkov, V., Sekirov, L., Leng, E., Sweet, H., Foltz, I., Howard, M., Rousseau, A.-M., et al. (2014b). Asymmetrical Fc engineering greatly enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) effector function and stability of the modified antibodies. *J. Biol. Chem.* *289*, 3571–3590.
- Lizak, C., Fan, Y.-Y., Weber, T.C., and Aebi, M. (2011). N-Linked Glycosylation of Antibody Fragments in *Escherichia coli*. *Bioconjug. Chem.* *22*, 488–496.
- Lonberg, N., Taylor, L.D., Harding, F.A., Trounstine, M., Higgins, K.M., Schramm, S.R., Kuo, C.-C., Mashayekh, R., Wymore, K., McCabe, J.G., et al. (1994). Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* *368*, 856–859.
- Lyons, A., King, D.J., Owens, R.J., Yarranton, G.T., Millican, A., Whittle, N.R., and Adair, J.R. (1990). Site-specific attachment to recombinant antibodies via introduced surface cysteine residues. *Protein Eng.* *3*, 703–708.
- Martineau, P., and Betton, J.M. (1999). In vitro folding and thermodynamic stability of an antibody fragment selected in vivo for high expression levels in *Escherichia coli* cytoplasm. *J. Mol. Biol.* *292*, 921–929.
- Martineau, P., Jones, P., and Winter, G. (1998). Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm. *J. Mol. Biol.* *280*, 117–127.
- Masuda, K., Kubota, T., Kaneko, E., Iida, S., Wakitani, M., Kobayashi-Natsume, Y., Kubota, A., Shitara, K., and Nakamura, K. (2007). Enhanced binding affinity for FcγRIIIa of fucose-negative antibody is sufficient to induce maximal antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Mol. Immunol.* *44*, 3122–3131.
- Mateo, J., Berlin, J., Bono, J.S. de, Cohen, R.B., Keedy, V., Mugundu, G., Zhang, L., Abbattista, A., Davis, C., Stampino, C.G., et al. (2014). A first-in-human study of the anti-α5β1 integrin monoclonal antibody PF-04605412 administered intravenously to patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *74*, 1039–1046.

- McKay, C.S., and Finn, M.G. (2014). Click Chemistry in Complex Mixtures: Bioorthogonal Bioconjugation. *Chem. Biol.* *21*, 1075–1101.
- Melmed, G.Y., Targan, S.R., Yasothan, U., Hanicq, D., and Kirkpatrick, P. (2008). Certolizumab pegol. *Nat. Rev. Drug Discov.* *7*, 641–642.
- Mero, A., Spolaore, B., Veronese, F.M., and Fontana, A. (2009). Transglutaminase-mediated PEGylation of proteins: direct identification of the sites of protein modification by mass spectrometry using a novel monodisperse PEG. *Bioconjug. Chem.* *20*, 384–389.
- Messens, J., and Collet, J.-F. (2006). Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *38*, 1050–1062.
- Michael, A. (1893). Ueber die Einwirkung von Diazobenzolimid auf Acetylendicarbonsäuremethylester. *J. Für Prakt. Chem.* *48*, 94–95.
- Michnick, S.W., and Sidhu, S.S. (2008). Submitting antibodies to binding arbitration. *Nat. Chem. Biol.* *4*, 326–329.
- Mindt, T.L., Jungi, V., Wyss, S., Friedli, A., Pla, G., Novak-Hofer, I., Grünberg, J., and Schibli, R. (2008). Modification of Different IgG1 Antibodies via Glutamine and Lysine using Bacterial and Human Tissue Transglutaminase. *Bioconjug. Chem.* *19*, 271–278.
- Möhlmann, S., Bringmann, P., Greven, S., and Harrenga, A. (2011). Site-specific modification of ED-B-targeting antibody using intein-fusion technology. *BMC Biotechnol.* *11*, 76.
- Molineux, G., and Newland, A. (2010). Development of romiplostim for the treatment of patients with chronic immune thrombocytopenia: from bench to bedside. *Br. J. Haematol.* *150*, 9–20.
- Moore, G.L., Chen, H., Karki, S., and A, G. (2010). Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *mAbs* *2*, 181–189.
- Morrison, S.L., Johnson, M.J., Herzenberg, L.A., and Oi, V.T. (1984). Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 6851–6855.
- Mössner, E., Brünker, P., Moser, S., Püntener, U., Schmidt, C., Herter, S., Grau, R., Gerdes, C., Nopora, A., van Puijenbroek, E., et al. (2010). Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* *115*, 4393–4402.
- Moutel, S., El Marjou, A., Vielemeyer, O., Nizak, C., Benaroch, P., Dubel, S., and Perez, F. (2009). A multi-Fc-species system for recombinant antibody production. *BMC Biotechnol.* *9*, 14.
- Musolino, A., Naldi, N., Bortesi, B., Pezzuolo, D., Capelletti, M., Missale, G., Laccabue, D., Zerbini, A., Camisa, R., Bisagni, G., et al. (2008). Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *26*, 1789–1796.
- Muyldermans, S. (2001). Single domain camel antibodies: current status. *Rev. Mol. Biotechnol.* *74*, 277–302.
- Nadkarni, A., Kelley, L.-L.C., and Momany, C. (2007). Optimization of a mouse recombinant antibody fragment for efficient production from *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* *52*, 219–229.

- Natarajan, A., Du, W., Xiong, C.-Y., DeNardo, G.L., DeNardo, S.J., and Gervay-Hague, J. (2007). Construction of di-scFv through a trivalent alkyne-azide 1,3-dipolar cycloaddition. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 695–697.
- Nguyen, V.D., Hatahet, F., Salo, K.E.H., Enlund, E., Zhang, C., and Ruddock, L.W. (2011). Pre-expression of a sulfhydryl oxidase significantly increases the yields of eukaryotic disulfide bond containing proteins expressed in the cytoplasm of E.coli. *Microb. Cell Factories* 10, 1.
- Nielsen, U., Huhlov, A., Harms, B., Paragas, V., Adams, S., Gu, J., Nguyen, S., Luus, L., Oyama, S., Razlog, M., et al. (2009). MM-111: a novel bispecific antibody targeting ErbB3 with potent anti-tumor activity in ErbB2 over-expressing malignancies. *Cancer Res.* 69, 4166.
- Nimmerjahn, F., Gordan, S., and Lux, A. (2015). FcγR dependent mechanisms of cytotoxic, agonistic, and neutralizing antibody activities. *Trends Immunol.* 36, 325–336.
- Niwa, R., Hatanaka, S., Shoji-Hosaka, E., Sakurada, M., Kobayashi, Y., Uehara, A., Yokoi, H., Nakamura, K., and Shitara, K. (2004). Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 Is independent of FcγRIIIa functional polymorphism. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 6248–6255.
- Nordstrom, J.L., Gorlatov, S., Zhang, W., Yang, Y., Huang, L., Burke, S., Li, H., Ciccarone, V., Zhang, T., Stavenhagen, J., et al. (2011). Anti-tumor activity and toxicokinetics analysis of MGAH22, an anti-HER2 monoclonal antibody with enhanced Fcγ receptor binding properties. *Breast Cancer Res. BCR* 13, R123.
- Nossal, G.J.V., and Lederberg, J. (1958). Antibody Production by Single Cells. *Nature* 181, 1419–1420.
- Noto, A., De Vitis, C., Roscilli, G., Fattore, L., Malpicci, D., Marra, E., Luberto, L., D'Andrilli, A., Coluccia, P., Giovagnoli, M.R., et al. (2013). Combination therapy with anti-ErbB3 monoclonal antibodies and EGFR TKIs potently inhibits non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 4, 1253–1265.
- Novotný, J., Bruccoleri, R., Newell, J., Murphy, D., Haber, E., and Karplus, M. (1983). Molecular anatomy of the antibody binding site. *J. Biol. Chem.* 258, 14433–14437.
- Ober, R.J., Radu, C.G., Ghetie, V., and Ward, E.S. (2001). Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *Int. Immunol.* 13, 1551–1559.
- Ohtsuka, T., Umezawa, Y., Nio, N., and Kubota, K. (2001). Comparison of Deamidation Activity of Transglutaminases. *J. Food Sci.* 66, 25–29.
- Osborn, M.J., Gander, J.E., Parisi, E., and Carson, J. (1972). Mechanism of Assembly of the Outer Membrane of Salmonella typhimurium ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CYTOPLASMIC AND OUTER MEMBRANE. *J. Biol. Chem.* 247, 3962–3972.
- Ota, M., Sawa, A., Nio, N., and Ariyoshi, Y. (1999). Enzymatic ligation for synthesis of single-chain analogue of monellin by transglutaminase. *Biopolymers* 50, 193–200.
- Parameswaran, K.N., Cheng, X.-F., Chen, E.C., Velasco, P.T., Wilson, J.H., and Lorand, L. (1997). Hydrolysis of γ:ε Isopeptides by Cytosolic Transglutaminases and by Coagulation Factor XIIIa. *J. Biol. Chem.* 272, 10311–10317.

- Pasternack, R., Laurent, H.P., R uth, T., Kaiser, A., Sch on, N., and Fuchsbauer, H.L. (1997). A fluorescent substrate of transglutaminase for detection and characterization of glutamine acceptor compounds. *Anal. Biochem.* **249**, 54–60.
- Patel, D., Bassi, R., Hooper, A., Prewett, M., Hicklin, D.J., and Kang, X. (2009). Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab inhibits EGFR/HER-2 heterodimerization and activation. *Int. J. Oncol.* **34**, 25–32.
- Petkova, S.B., Akilesh, S., Sproule, T.J., Christianson, G.J., Al Khabbaz, H., Brown, A.C., Presta, L.G., Meng, Y.G., and Roopenian, D.C. (2006). Enhanced half-life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease. *Int. Immunol.* **18**, 1759–1769.
- Philibert, P., Stoessel, A., Wang, W., Sibler, A.-P., Bec, N., Larroque, C., Saven, J.G., Court ete, J., Weiss, E., and Martineau, P. (2007). A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm. *BMC Biotechnol.* **7**, 81.
- Phillips, G.D.L., Li, G., Dugger, D.L., Crocker, L.M., Parsons, K.L., Mai, E., Bl attler, W.A., Lambert, J.M., Chari, R.V.J., Lutz, R.J., et al. (2008). Targeting HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab-DM1, an Antibody–Cytotoxic Drug Conjugate. *Cancer Res.* **68**, 9280–9290.
- Plagmann, I., Chalaris, A., Kruglov, A.A., Nedospasov, S., Rosenstiel, P., Rose-John, S., and Scheller, J. (2009). Transglutaminase-catalyzed covalent multimerization of camelidae anti-human TNF single domain antibodies improves neutralizing activity. *J. Biotechnol.* **142**, 170–178.
- Potgieter, T.I., Kersey, S.D., Mallem, M.R., Nyl en, A.C., and d’Anjou, M. (2010). Antibody expression kinetics in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* **106**, 918–927.
- Prescher, J.A., Dube, D.H., and Bertozzi, C.R. (2004). Chemical remodelling of cell surfaces in living animals. *Nature* **430**, 873–877.
- Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A., and Beckwith, J. (1997). The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **272**, 15661–15667.
- Puthenveetil, S., Musto, S., Loganzo, F., Tumey, L.N., O’Donnell, C.J., and Graziani, E. (2016). Development of Solid-Phase Site-Specific Conjugation and Its Application toward Generation of Dual Labeled Antibody and Fab Drug Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **27**, 1030–1039.
- Rabinovich, G.A., Gabrilovich, D., and Sotomayor, E.M. (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 267–296.
- Raju, T.S. (2008). Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 471–478.
- Raju, T.S. (2010). Impact of Fc Glycosylation on Monoclonal Antibody Effector Functions and Degradation by Proteases. In *Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing*, S.J. Shire, W. Gombotz, K. Bechtold-Peters, and J. Andya, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 249–269.
- Ramsland, P.A., Farrugia, W., Bradford, T.M., Sardjono, C.T., Esparon, S., Trist, H.M., Powell, M.S., Tan, P.S., Cendron, A.C., Wines, B.D., et al. (2011). Structural basis for Fc gammaRIIa recognition of human IgG and formation of inflammatory signaling complexes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187**, 3208–3217.

- Reiter, Y., Brinkmann, U., Webber, K.O., Jung, S.H., Lee, B., and Pastan, I. (1994). Engineering interchain disulfide bonds into conserved framework regions of Fv fragments: improved biochemical characteristics of recombinant immunotoxins containing disulfide-stabilized Fv. *Protein Eng.* 7, 697–704.
- Renaut, L., Monnet, C., Dubreuil, O., Zaki, O., Crozet, F., Bouayadi, K., Kharrat, H., and Mondon, P. (2012). Affinity maturation of antibodies: optimized methods to generate high-quality ScFv libraries and isolate IgG candidates by high-throughput screening. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 907, 451–461.
- Reslan, L., Dalle, S., and Dumontet, C. (2009). Understanding and circumventing resistance to anticancer monoclonal antibodies. *mAbs* 1, 222–229.
- Richards, J.O., Karki, S., Lazar, G.A., Chen, H., Dang, W., and Desjarlais, J.R. (2008). Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* 7, 2517–2527.
- Rispens, T., Ooijevaar-de Heer, P., Bende, O., and Aalberse, R.C. (2011). Mechanism of immunoglobulin G4 Fab-arm exchange. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 10302–10311.
- Rita Costa, A., Elisa Rodrigues, M., Henriques, M., Azeredo, J., and Oliveira, R. (2010). Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV* 74, 127–138.
- Ritz, D., Lim, J., Reynolds, C.M., Poole, L.B., and Beckwith, J. (2001). Conversion of a peroxiredoxin into a disulfide reductase by a triplet repeat expansion. *Science* 294, 158–160.
- Robbie, G.J., Criste, R., Dall'Acqua, W.F., Jensen, K., Patel, N.K., Losonsky, G.A., and Griffin, M.P. (2013). A Novel Investigational Fc-Modified Humanized Monoclonal Antibody, Motavizumab-YTE, Has an Extended Half-Life in Healthy Adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 6147–6153.
- Robinson, M.-P., Ke, N., Lobstein, J., Peterson, C., Szkodny, A., Mansell, T.J., Tuckey, C., Riggs, P.D., Colussi, P.A., Noren, C.J., et al. (2015). Efficient expression of full-length antibodies in the cytoplasm of engineered bacteria. *Nat. Commun.* 6, 8072.
- Roguska, M.A., Pedersen, J.T., Keddy, C.A., Henry, A.H., Searle, S.J., Lambert, J.M., Goldmacher, V.S., Blättler, W.A., Rees, A.R., and Guild, B.C. (1994). Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 969–973.
- Rostovtsev, V.V., Green, L.G., Fokin, V.V., and Sharpless, K.B. (2002). A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 2596–2599.
- Rudnick, S.I., Lou, J., Shaller, C.C., Tang, Y., Klein-Szanto, A.J.P., Weiner, L.M., Marks, J.D., and Adams, G.P. (2011). Influence of affinity and antigen internalization on the uptake and penetration of Anti-HER2 antibodies in solid tumors. *Cancer Res.* 71, 2250–2259.
- Rush, J.S., and Bertozzi, C.R. (2008). New Aldehyde Tag Sequences Identified by Screening Formylglycine Generating Enzymes in Vitro and in Vivo. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 12240–12241.
- Saxon, E., and Bertozzi, C.R. (2000). Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science* 287, 2007–2010.

Saxon, E., Armstrong, J.I., and Bertozzi, C.R. (2000). A “Traceless” Staudinger Ligation for the Chemoselective Synthesis of Amide Bonds. *Org. Lett.* **2**, 2141–2143.

Sazinsky, S.L., Ott, R.G., Silver, N.W., Tidor, B., Ravetch, J.V., and Wittrup, K.D. (2008). Aglycosylated immunoglobulin G1 variants productively engage activating Fc receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 20167–20172.

Scallon, B.J., Tam, S.H., McCarthy, S.G., Cai, A.N., and Raju, T.S. (2007). Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Mol. Immunol.* **44**, 1524–1534.

Scheck, R.A., Dedeo, M.T., Iavarone, A.T., and Francis, M.B. (2008). Optimization of a Biomimetic Transamination Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 11762–11770.

Schlapschy, M., Gruber, H., Gresch, O., Schäfer, C., Renner, C., Pfreundschuh, M., and Skerra, A. (2004). Functional humanization of an anti-CD30 Fab fragment for the immunotherapy of Hodgkin’s lymphoma using an in vitro evolution approach. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* **17**, 847–860.

Schmidt, B., Selmer, T., Ingendoh, A., and Figurat, K. von (1995). A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell* **82**, 271–278.

Schroff, R.W., Foon, K.A., Beatty, S.M., Oldham, R.K., and Morgan, A.C. (1985). Human Anti-Murine Immunoglobulin Responses in Patients Receiving Monoclonal Antibody Therapy. *Cancer Res.* **45**, 879–885.

Schumacher, D., Hackenberger, C.P.R., Leonhardt, H., and Helma, J. (2016). Current Status: Site-Specific Antibody Drug Conjugates. *J. Clin. Immunol.* **36 Suppl 1**, 100–107.

Schumacher, F.F., Nunes, J.P.M., Maruani, A., Chudasama, V., Smith, M.E.B., Chester, K.A., Baker, J.R., and Caddick, S. (2014). Next generation maleimides enable the controlled assembly of antibody–drug conjugates via native disulfide bond bridging. *Org. Biomol. Chem.* **12**, 7261–7269.

Schwarz, F., Huang, W., Li, C., Schulz, B.L., Lizak, C., Palumbo, A., Numao, S., Neri, D., Aebi, M., and Wang, L.-X. (2010). A combined method for producing homogeneous glycoproteins with eukaryotic N-glycosylation. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 264–266.

Scott, A.M., Wolchok, J.D., and Old, L.J. (2012). Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 278–287.

Selis, F., Focà, G., Sandomenico, A., Marra, C., Di Mauro, C., Sacconi Jotti, G., Scaramuzza, S., Politano, A., Sanna, R., Ruvo, M., et al. (2016). Pegylated Trastuzumab Fragments Acquire an Increased in Vivo Stability but Show a Largely Reduced Affinity for the Target Antigen. *Int. J. Mol. Sci.* **17**.

Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., and D’Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol.* **189**, 8746–8749.

Shen, B.-Q., Xu, K., Liu, L., Raab, H., Bhakta, S., Kenrick, M., Parsons-Repointe, K.L., Tien, J., Yu, S.-F., Mai, E., et al. (2012). Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody–drug conjugates. *Nat. Biotechnol.* **30**, 184–189.

Shi, X., Jung, Y., Lin, L.-J., Liu, C., Wu, C., Cann, I.K.O., and Ha, T. (2012). Quantitative fluorescence labeling of aldehyde-tagged proteins for single-molecule imaging. *Nat. Methods* **9**, 499–503.

Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., et al. (2001). High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J. Biol. Chem.* *276*, 6591–6604.

Siegmund, V., Schmelz, S., Dickgiesser, S., Beck, J., Ebenig, A., Fittler, H., Frauendorf, H., Piater, B., Betz, U.A.K., Avrutina, O., et al. (2015). Locked by Design: A Conformationally Constrained Transglutaminase Tag Enables Efficient Site-Specific Conjugation. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*

Simmons, L.C., Reilly, D., Klimowski, L., Shantha Raju, T., Meng, G., Sims, P., Hong, K., Shields, R.L., Damico, L.A., Rancatore, P., et al. (2002). Expression of full-length immunoglobulins in *Escherichia coli*: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies. *J. Immunol. Methods* *263*, 133–147.

Sletten, E.M., and Bertozzi, C.R. (2009). Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *48*, 6974–6998.

Smith, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* *228*, 1315–1317.

Smith, S.A., and Crowe, J.E. (2015). Use of Human Hybridoma Technology To Isolate Human Monoclonal Antibodies. In *Antibodies for Infectious Diseases*, D. Boraschi, J.E. Crowe, and R. Rappuoli, eds. (American Society of Microbiology), pp. 141–156.

Smith, E.L., Giddens, J.P., Iavarone, A.T., Godula, K., Wang, L.-X., and Bertozzi, C.R. (2014). Chemoenzymatic Fc Glycosylation via Engineered Aldehyde Tags. *Bioconjug. Chem.*

Sondermann, P., and Szymkowski, D.E. (2016). Harnessing Fc receptor biology in the design of therapeutic antibodies. *Curr. Opin. Immunol.* *40*, 78–87.

Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V., and Jacob, U. (2000). The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature* *406*, 267–273.

Sonoda, H., Kumada, Y., Katsuda, T., and Yamaji, H. (2011). Effects of cytoplasmic and periplasmic chaperones on secretory production of single-chain Fv antibody in *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* *111*, 465–470.

Soriano del Amo, D., Wang, W., Jiang, H., Besanceney, C., Yan, A.C., Levy, M., Liu, Y., Marlow, F.L., and Wu, P. (2010). Biocompatible Copper(I) Catalysts for in Vivo Imaging of Glycans. *J. Am. Chem. Soc.* *132*, 16893–16899.

Spadiut, O., Capone, S., Krainer, F., Glieder, A., and Herwig, C. (2014). Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. *Trends Biotechnol.* *32*, 54–60.

Spiekermann, G.M., Finn, P.W., Ward, E.S., Dumont, J., Dickinson, B.L., Blumberg, R.S., and Lencer, W.I. (2002). Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung. *J. Exp. Med.* *196*, 303–310.

Spiess, C., Zhai, Q., and Carter, P.J. (2015). Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. *Mol. Immunol.* *67*, 95–106.

Spolaore, B., Raboni, S., Ramos Molina, A., Satwekar, A., Damiano, N., and Fontana, A. (2012). Local unfolding is required for the site-specific protein modification by transglutaminase. *Biochemistry (Mosc.)* *51*, 8679–8689.

Stimmel, J.B., Merrill, B.M., Kuyper, L.F., Moxham, C.P., Hutchins, J.T., Fling, M.E., and Kull, F.C. (2000). Site-specific Conjugation on Serine → Cysteine Variant Monoclonal Antibodies. *J. Biol. Chem.* **275**, 30445–30450.

Strop, P., Dorywalska, M.G., Rajpal, A., Shelton, D., Liu, S.-H., Pons, J., and Dushin, R. (2012). Engineered Polypeptide Conjugates and Methods for Making Thereof Using Transglutaminase, WO patent 2012059882.

Strop, P., Liu, S.-H., Dorywalska, M., Delaria, K., Dushin, R.G., Tran, T.-T., Ho, W.-H., Farias, S., Casas, M.G., Abdiche, Y., et al. (2013). Location Matters: Site of Conjugation Modulates Stability and Pharmacokinetics of Antibody Drug Conjugates. *Chem. Biol.* **20**, 161–167.

Strop, P., Delaria, K., Foletti, D., Witt, J.M., Hasa-Moreno, A., Poulsen, K., Casas, M.G., Dorywalska, M., Farias, S., Pios, A., et al. (2015). Site-specific conjugation improves therapeutic index of antibody drug conjugates with high drug loading. *Nat. Biotechnol.* **33**, 694–696.

Studier, F.W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* **41**, 207–234.

Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130.

Sugimura, Y., Yokoyama, K., Nio, N., Maki, M., and Hitomi, K. (2008). Identification of preferred substrate sequences of microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* using a phage-displayed peptide library. *Arch. Biochem. Biophys.* **477**, 379–383.

Sun, M.M.C., Beam, K.S., Cerveny, C.G., Hamblett, K.J., Blackmore, R.S., Torgov, M.Y., Handley, F.G.M., Senter, P.D., and Alley, S.C. (2005). Reduction-Alkylation Strategies for the Modification of Specific Monoclonal Antibody Disulfides. *Bioconjug. Chem.* **16**, 1282–1290.

Takazawa, T., Kamiya, N., Ueda, H., and Nagamune, T. (2004). Enzymatic labeling of a single chain variable fragment of an antibody with alkaline phosphatase by microbial transglutaminase. *Biotechnol. Bioeng.* **86**, 399–404.

Tao, M.H., Smith, R.I., and Morrison, S.L. (1993). Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation. *J. Exp. Med.* **178**, 661–667.

Terme, M., Pernot, S., Marcheteau, E., Sandoval, F., Benhamouda, N., Colussi, O., Dubreuil, O., Carpentier, A.F., Tartour, E., and Taieb, J. (2013). VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. *Cancer Res.* **73**, 539–549.

Ternant, D., Arnoult, C., Pugnère, M., Dhommée, C., Drocourt, D., Perouzel, E., Passot, C., Baroukh, N., Mulleman, D., Tiraby, G., et al. (2016). IgG1 Allotypes Influence the Pharmacokinetics of Therapeutic Monoclonal Antibodies through FcRn Binding. *J. Immunol.* **196**, 607–613.

Tonegawa, S. (1988). Somatic generation of immune diversity. *Biosci. Rep.* **8**, 3–26.

Tornøe, C.W., Christensen, C., and Meldal, M. (2002). Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **67**, 3057–3064.

- Van Roy, M., Ververken, C., Beirnaert, E., Hoefman, S., Kolkman, J., Vierboom, M., Breedveld, E., 't Hart, B., Poelmans, S., Bontinck, L., et al. (2015). The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody® ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *17*, 135.
- Veggiani, G., and de Marco, A. (2011). Improved quantitative and qualitative production of single-domain intrabodies mediated by the co-expression of Erv1p sulfhydryl oxidase. *Protein Expr. Purif.* *79*, 111–114.
- Venturi, M., Seifert, C., and Hunte, C. (2002). High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm. *J. Mol. Biol.* *315*, 1–8.
- Vidarsson, G., Stemerding, A.M., Stapleton, N.M., Spliethoff, S.E., Janssen, H., Rebers, F.E., de Haas, M., and van de Winkel, J.G. (2006). FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Blood* *108*, 3573–3579.
- Vugts, D.J., Vervoort, A., Stigter-van Walsum, M., Visser, G.W.M., Robillard, M.S., Versteegen, R.M., Vulders, R.C.M., Herscheid, J.K.D.M., and van Dongen, G.A.M.S. (2011). Synthesis of phosphine and antibody-azide probes for in vivo Staudinger ligation in a pretargeted imaging and therapy approach. *Bioconjug. Chem.* *22*, 2072–2081.
- Wakankar, A.A., Feeney, M.B., Rivera, J., Chen, Y., Kim, M., Sharma, V.K., and Wang, Y.J. (2010). Physicochemical stability of the antibody-drug conjugate Trastuzumab-DM1: changes due to modification and conjugation processes. *Bioconjug. Chem.* *21*, 1588–1595.
- Wang, L., Amphlett, G., Blättler, W.A., Lambert, J.M., and Zhang, W. (2005). Structural characterization of the maytansinoid–monoclonal antibody immunoconjugate, huN901–DM1, by mass spectrometry. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *14*, 2436–2446.
- Wang, Y., Tian, Z., Thirumalai, D., and Zhang, X. (2014). Neonatal Fc receptor (FcRn): a novel target for therapeutic antibodies and antibody engineering. *J. Drug Target.* *22*, 269–278.
- Weng, W.-K., and Levy, R. (2003). Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *21*, 3940–3947.
- West, A.P., and Bjorkman, P.J. (2000). Crystal structure and immunoglobulin G binding properties of the human major histocompatibility complex-related Fc receptor(γ). *Biochemistry (Mosc.)* *39*, 9698–9708.
- Williams, A.F., and Barclay, A.N. (1988). The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* *6*, 381–405.
- Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E., and Hoogenboom, H.R. (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 433–455.
- Wittig, G., and Krebs, A. (1961). Zur Existenz niedergliedriger Cycloalkine, I. *Chem. Ber.* *94*, 3260–3275.
- Witus, L.S., Moore, T., Thuronyi, B.W., Esser-Kahn, A.P., Scheck, R.A., Iavarone, A.T., and Francis, M.B. (2010). Identification of Highly Reactive Sequences For PLP-Mediated Bioconjugation Using a Combinatorial Peptide Library. *J. Am. Chem. Soc.* *132*, 16812–16817.
- Wong, R., Pepper, C., Brennan, P., Nagorsen, D., Man, S., and Fegan, C. (2013). Blinatumomab induces autologous T-cell killing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* *98*, 1930–1938.

- Wörn, A., and Plückthun, A. (1998). An intrinsically stable antibody scFv fragment can tolerate the loss of both disulfide bonds and fold correctly. *FEBS Lett.* *427*, 357–361.
- Woyach, J.A., Awan, F., Flinn, I.W., Berdeja, J.G., Wiley, E., Mansoor, S., Huang, Y., Lozanski, G., Foster, P.A., and Byrd, J.C. (2014). A phase 1 trial of the Fc-engineered CD19 antibody XmAb5574 (MOR00208) demonstrates safety and preliminary efficacy in relapsed CLL. *Blood* *124*, 3553–3560.
- Wu, H., Nie, Y., Huse, W.D., and Watkins, J.D. (1999). Humanization of a murine monoclonal antibody by simultaneous optimization of framework and CDR residues. *J. Mol. Biol.* *294*, 151–162.
- Wu, P., Shui, W., Carlson, B.L., Hu, N., Rabuka, D., Lee, J., and Bertozzi, C.R. (2009). Site-specific chemical modification of recombinant proteins produced in mammalian cells by using the genetically encoded aldehyde tag. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 3000–3005.
- Wurz, G.T., Kao, C.-J., and DeGregorio, M.W. (2016). Novel cancer antigens for personalized immunotherapies: latest evidence and clinical potential. *Ther. Adv. Med. Oncol.* *8*, 4–31.
- Yamane-Ohnuki, N., and Satoh, M. (2009). Production of therapeutic antibodies with controlled fucosylation. *mAbs* *1*, 230–236.
- Yeung, Y.A., Leabman, M.K., Marvin, J.S., Qiu, J., Adams, C.W., Lien, S., Starovasnik, M.A., and Lowman, H.B. (2009). Engineering human IgG1 affinity to human neonatal Fc receptor: impact of affinity improvement on pharmacokinetics in primates. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *182*, 7663–7671.
- Ying, T., Gong, R., Ju, T.W., Prabakaran, P., and Dimitrov, D.S. (2014). Engineered Fc based antibody domains and fragments as novel scaffolds. *Biochim. Biophys. Acta* *1844*, 1977–1982.
- York, D., Baker, J., Holder, P.G., Jones, L.C., Drake, P.M., Barfield, R.M., Bleck, G.T., and Rabuka, D. (2016). Generating aldehyde-tagged antibodies with high titers and high formylglycine yields by supplementing culture media with copper(II). *BMC Biotechnol.* *16*, 23.
- Zalevsky, J., Chamberlain, A.K., Horton, H.M., Karki, S., Leung, I.W.L., Sproule, T.J., Lazar, G.A., Roopenian, D.C., and Desjarlais, J.R. (2010). Enhanced antibody half-life improves in vivo activity. *Nat. Biotechnol.* *28*, 157–159.
- Zeglis, B.M., Davis, C.B., Aggeler, R., Kang, H.C., Chen, A., Agnew, B.J., and Lewis, J.S. (2013). Enzyme-mediated methodology for the site-specific radiolabeling of antibodies based on catalyst-free click chemistry. *Bioconjug. Chem.* *24*, 1057–1067.
- Zhang, H. (2013). Empowering scFv with effector cell functions for improved anticancer therapeutics. *Oncoimmunology* *2*.
- Zhang, N., Liu, L., Dumitru, C.D., Cummings, N.R.H., Cukan, M., Jiang, Y., Li, Y., Li, F., Mitchell, T., Mallem, M.R., et al. (2011). Glycoengineered *Pichia* produced anti-HER2 is comparable to trastuzumab in preclinical study. *mAbs* *3*, 289–298.
- Zhou, Y., Goenaga, A.-L., Harms, B.D., Zou, H., Lou, J., Conrad, F., Adams, G.P., Schoeberl, B., Nielsen, U.B., and Marks, J.D. (2012). Impact of intrinsic affinity on functional binding and biological activity of EGFR antibodies. *Mol. Cancer Ther.* *11*, 1467–1476.

Zimmerman, E.S., Heibeck, T.H., Gill, A., Li, X., Murray, C.J., Madlansacay, M.R., Tran, C., Uter, N.T., Yin, G., Rivers, P.J., et al. (2014). Production of Site-Specific Antibody–Drug Conjugates Using Optimized Non-Natural Amino Acids in a Cell-Free Expression System. *Bioconjug. Chem.*

RÉSUMÉ

Les anticorps monoclonaux anti-tumoraux sont produits en cellules eucaryotes. Pour des raisons de temps et de cout, peu de candidats sont sélectionnés après des tests *in vitro* pour être produits à large échelle et testés *in vivo*. Pour tester plus d'anticorps plus rapidement, nous souhaitons produire des fragments variables simple chaîne (scFv) chez *E. coli*. et les coupler à un fragment constant Fc par chimie click pour reconstituer des mimes d'immunoglobulines naturelles. Cette production indépendante des fragments est aussi un outil modulaire permettant de combiner rapidement un grand nombre scFv et de Fc différents.

La chimie click est basée sur une réaction spécifique et de haut rendement entre un azide et un cyclooctyne. Les fragments ont donc été fonctionnalisés sur des résidus spécifiques (tags) par des composés chimiques pour introduire ces fonctions à leur extrémité. La première étape a consisté à introduire des tags en C-terminal du scFv anti-HER2 4D5 et en N-terminal du Fc d'IgG1 humaine. Les scFv ont été produits en cytoplasme d'*E. coli* à hauteur d'au moins 100 mg/L puis oxydés *in vitro* au sulfate de cuivre. Le fragment Fc a été produit classiquement en cellules humaines. Cinq réactions chimiques ou enzymatiques ont été optimisées et comparées en termes de spécificité et de rendement. La conjugaison d'une amine sur un tag glutamine catalysée par la transglutaminase microbienne a donné les meilleurs résultats. Le scFv a ainsi été dérivé par l'azadibenzocyclooctyne et le Fc par l'azide à hauteur de 60-70%. Lorsqu'ils sont mélangés, ces fragments forment un (scFv)₂-Fc et un scFv-Fc avec des rendements globaux respectifs de 10-20% et 20-30% après optimisation.

Les mélanges scFv + Fc après réaction de chimie click se fixent de la même façon que le (scFv)₂-Fc eucaryote au récepteur HER2. Il reste désormais à montrer que leur capacité à inhiber la prolifération d'une lignée exprimant ce récepteur est similaire. L'objectif final est d'obtenir une inhibition de croissance tumorale similaire sur des xénogreffes.

Mots-clés : anticorps monoclonaux, criblage, chimie click, transglutaminase

ABSTRACT

Click chemistry assembly of bacteria-produced antibodies for an *in vivo* quick functional screening

Anti-tumoral monoclonal antibodies are currently produced in eukaryotic cells. For cost and time reasons, a limited number of potential candidates are selected after *in vitro* tests. They are produced at large scale and then tested *in vivo*. To test more antibodies and more rapidly, we chose to produce single chain variable fragments (scFv) in bacteria, and to couple them to the eukaryotic constant fragment (Fc) thanks to click chemistry to reconstitute immunoglobulin-like compounds. For a given cost, this enables to produce and test *in vivo* a larger number of clones. This independent production of fragments is also a flexible tool allowing the combination of different Fc isotypes/allotypes with different scFvs.

Click chemistry is based on a specific and high-yield reaction between an azide and a cyclooctyne. Therefore, antibody fragments were functionalised on specific residues (tags) by chemical linker so that each part will contain one of these chemical moieties at their extremity. The first step consisted in introducing tags into the anti-HER2 scFv 4D5 C-terminus and human IgG1 Fc N-termini sequences. The scFvs were produced with yields higher than 100 mg/L in the *E. coli* cytoplasm and *in vitro* oxidized with copper sulfate. The Fc fragment was classically produced in human cells. Five chemical or enzymatical reactions were optimised and compared in terms of specificity and yield. The coupling between an amine and a glutamine tag catalysed by microbial transglutaminase gave the best results. The scFv fragment was thus functionalised with an azadibenzocyclooctyne and the Fc fragment with an azide at 60-70%. When mixed together, these fragments formed a (scFv)₂-Fc and a scFv-Fc with global yields respectively of 10-20% and 20-30% after optimisation.

After the click reaction, the scFv + Fc mix binds to the HER2 receptor on the same way as the eukaryotic (scFv)₂-Fc in terms of HER2-binding and proliferation inhibition capacity. Now, it must be demonstrated that their proliferation inhibition of a HER2-positive cell line is similar. The final aim is to get a similar tumour growth inhibition on murine xenografts.