



**HAL**  
open science

# Antibody-Drug Conjugates (ADCs) : apport du double marquage tritium et carbone 14 et de la radio-imagerie duale pour la production de données quantitatives in vivo.

Héloïse Cahuzac

## ► To cite this version:

Héloïse Cahuzac. Antibody-Drug Conjugates (ADCs) : apport du double marquage tritium et carbone 14 et de la radio-imagerie duale pour la production de données quantitatives in vivo.. Chimie thérapeutique. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASQ004 . tel-03286976

**HAL Id: tel-03286976**

**<https://theses.hal.science/tel-03286976>**

Submitted on 15 Jul 2021

**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.

Antibody-Drug Conjugates (ADCs) :  
apport du double marquage tritium et  
carbone 14 et de la radio-imagerie  
duale pour la production de données  
quantitatives in vivo

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

**ECOLE DOCTORALE N°569**

Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : chimie thérapeutique

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Médicaments et Technologies  
pour la Santé, 91191, Gif-sur-Yvette, France.

Référent : Faculté de pharmacie

**Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 29 janvier 2021, par**

**Héloïse CAHUZAC**

**Composition du Jury**

**Jean-Pierre MAHY**

PU, Université Paris-Saclay

Président

**Nicolas JOUBERT**

MCU HDR, Université de Tours

Rapporteur & examinateur

**Alain WAGNER**

DR, Université de Strasbourg

Rapporteur & examinateur

**Sébastien PAPOT**

PU, Université de Poitiers

Examineur

**Dr. Laurent DEVEL**

DR, Université Paris-Saclay

Directeur de thèse

**Dr. Davide AUDISIO**

DR, Université Paris-Saclay

Invité

# REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée au sein du Service d'Ingénierie Moléculaire pour la Santé (SIMoS) au CEA de Saclay, et a été financée par une bourse CEA "amont-aval".

Récemment, dans un article publié dans Sciences Humaines consacré au doctorat, j'ai lu : « Comme le coureur de fond, le doctorant doit tenir la distance. Mais à la différence du marathonien, personne n'a tracé pour lui de ligne d'arrivée ». Aujourd'hui, je m'apprête à franchir cette ligne d'arrivée, et bien que la thèse s'apparente à une épreuve personnelle, j'ai eu la chance d'être entourée tout au long de cette aventure. Certains ont fait un morceau du chemin avec moi, d'autres sont restés à mes côtés lorsque je faisais du surplace ou m'ont tendu la main quand je commençais à ralentir. Ce sont ces personnes que j'aimerais mettre en avant dans ces remerciements.

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de thèse, Laurent Devel. Malgré la première année difficile pour nous deux, tu as su m'écouter et tenir compte de mes demandes. Je te remercie de m'avoir accordé une grande confiance sur ce projet, tu m'as donné la liberté de faire des propositions et des choix déterminants. Merci de n'avoir jamais douté de mes capacités et d'avoir supporté mon implication émotionnelle parfois trop présente. Je te suis également reconnaissante de m'avoir laissée te convaincre de poursuivre le projet au-delà des objectifs qui étaient fixés. J'espère que je ne t'ai pas déçu et que j'ai été à la hauteur de tes espérances.

Je voudrais remercier nos différents collaborateurs du Service de Chimie Bioorganique et de Marquage (SCBM, CEA Saclay) qui ont été des acteurs clé de ce projet. Merci à Davide et Antoine du laboratoire de marquage au carbone 14 pour votre aide précieuse et votre patience à toute épreuve pour obtenir cette molécule marquée. Merci également à Grégory, Alberto et Sébastien du laboratoire de marquage au tritium pour m'avoir permis d'accéder aux labos chauds et d'assister au marquage de l'Auristatine. Je tiens également à remercier Xin

(Université de Californie à Riverside) pour nous avoir permis de travailler avec son anticorps 3A2.

Un grand merci à tous ceux qui m'ont aidée, formée et soutenue tout au long de ma thèse. À Robert/Boby pour m'avoir formée à la spectrométrie de masse. Merci d'avoir été la personne à la fois la plus drôle et la plus pénible du service, ta joie de vivre quotidienne et ton humour ont égayé plus d'une de mes journées. À Carole, pour toutes les coupes d'organes que tu as faites pour moi, pour ta bonne humeur et pour toutes les discussions que nous avons pu avoir, merci. À Fabrice/Fabz, l'homme aux mille casquettes, merci pour ton aide en informatique et pour m'avoir formée à l'enzymologie, à la radio-imagerie et aux blagounettes pourries. Merci à Sarah pour tes conseils avisés et pour toutes les discussions scientifiques que nous avons pu avoir. Peggy et Mathilde, merci pour toutes les manipulations en expérimentation animale, vous avez été d'une gentillesse et d'une disponibilité à toute épreuve. Merci également pour votre soutien et pour les dégustations de Paris-Brest qui m'ont toujours remonté le moral. À Hervé et Steven, qui ont été d'une aide précieuse pour la production de protéines. Merci également Steven pour tous ces moments de rigolade et pour les sorties course à pied du midi qui m'ont permis de m'aérer le cerveau. À Alain, le grizzly du bout du couloir, pour tes précieux conseils de chimiste et pour être passé me voir quotidiennement pour vérifier que je respirais toujours, merci. Merci également à Gilles et Pascal pour vos conseils en synthèse peptidique, et à Sylviane, notre secrétaire, pour ton aide avec les démarches administratives et pour ta gentillesse.

Je voudrais aussi dire merci à l'ensemble des personnes avec qui j'ai partagé le laboratoire, le bureau, les repas du midi ou une pause-café et qui ont contribué à rendre ces trois années agréables à vivre. Au Petit Pierrick/PP, pour m'avoir supportée pendant deux ans sans jamais perdre ce calme qui te caractérise, merci. À Alexandra, merci pour avoir mis l'ambiance au labo en écoutant FIP Rock et merci pour tous les Schneeballen que tu as ramenés à chaque fois que tu rentrais en Allemagne. Merci à Anna d'avoir été ma partenaire de bêtise, j'espère que tu continueras d'emballer les bureaux des gens dans du papier aluminium et à semer des chips de polystyrène. À Annabelle/Nanou, merci pour m'avoir amenée faire du poney pour me faire faire une pause au milieu de la rédaction. Bon courage pour ta thèse, je t'ai transmis toutes mes astuces de thésard, fais-en bon usage ! À Mélissa, la dernière arrivée, ça a été un plaisir de partager le bureau avec toi pendant quelques mois, ton accent chantant a ramené le soleil de

notre sud-ouest en Île-de-France. Aux personnes du premier étage, Nicolo, Marion, Steve et Tania, et aux champignons du sous-sol, Lucie, Gautier, Rémi, Yann et Florian, merci pour les moments que nous avons passés ensemble.

Je tiens également à remercier profondément ceux qui ont été d'un soutien inébranlable pendant ces années. Mon gros Pavelito, tu as été là dès le premier jour pour m'accueillir et me prendre sous ton aile et tu ne m'as jamais lâchée. Pour tous nos moments de complicité, je te dis "spasiba balchoya", en revanche, pour toutes les fois où tu as mangé mon goûter et caché mon téléphone, je te dis "pashol nahui pizdiouk" ! Merci également à mes copines d'amour, les SIMoS bitches, je ne sais pas ce que j'aurais fait sans vous. Margot, tout le monde devrait avoir quelqu'un comme toi dans son entourage, tu fais rayonner ta folie et ta joie de vivre autour de toi. Marinette, tu trouves toujours les mots pour reconforter les gens, ce n'est pas pour rien que la chaise de la PLS était placée dans ton bureau. Vous avez laissé un grand vide derrière vous à votre départ. Anne-Cé, tu es mon binôme, je sais tout et tu sais tout, j'arrive même à reconnaître le bruit de ton pas dans le couloir quand tu arrives. N'oublie pas que si tu as besoin, je serai toujours là pour boire des bières, manger des frites et refaire le monde avec toi.

Mes remerciements vont aussi à ma famille que j'ai quelque peu délaissée ces dernières années en partant faire ma thèse à 800 km de la maison. Merci à mes parents Jean et Ghislaine, vous avez su me donner toutes les chances pour réussir, la réalisation de ce travail est aussi l'aboutissement de vos efforts. Merci à ma grand-mère Gilberte, qui n'a jamais manqué l'appel téléphonique du samedi, de m'avoir soutenue et encouragée à tout donner jusqu'à la fin. Et enfin, merci à ma sœur Clélia, pas une seule journée ne s'est passée depuis ces trois dernières années sans que tu vérifies que je sois toujours en vie. Merci d'avoir accepté de lire les centaines de pages incompréhensibles de ce manuscrit à la recherche des fautes d'orthographe.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**A/Ala** : Acide aminé alanine

**AcOEt** : Acétate d'éthyle

**AcOH** : Acide acétique

**ADA** : Anti-Drug Antibody

**ADAM** : A Disintegrin And Metalloproteinases

**ADAMTS** : A Disintegrin And Metalloproteinases with Thrombospondin Motifs

**ADC** : Antibody-Drug Conjugate

**ADME** : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADCC** : Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity

**ADCP** : Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis

**AF** : Acide formique

**Ahx** : Acide aminohexanoïque

**AP2** : Adaptor Protein 2

**AzAb** : Azidoéthoxycarbonyl lysine

**Bis-NPC** : Bis(4-nitrophényl)carbonate

**Boc** : Groupement protecteur tert-Butoxycarbonyle

**BsAb** : Bispecific Antibody

**BTG** : Transglutaminase bactérienne

**C/Cys** : Acide aminé cystéine

**CDC** : Complement-Dependent Cytotoxicity, cytotoxicité dépendante du complément

**CDR** : Complementary-Determining Region

**Cellule NK** : lymphocyte Natural Killer

**CH** : Constant Heavy, domaine constant de la chaîne lourde

**CHO** : Chinese Hamster Ovary

**CHX** : Cyclohexane

**Cit** : Acide aminé non-naturel citrulline

**CL** : Constant Light, domaine constant de la chaîne légère

**COMU** : (1-cyano-2-éthoxy-2-oxoéthylaminoxy)diméthylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate

**cpm** : Coups par minutes

**D/Asp** : Acide aminé acide aspartique

**DAR** : Drug to Antibody Ratio

**DBCO** : Dibenzylcyclooctyne

**DCC** : Dicyclohexylcarbodiimide

**DCU** : Dicyclohexyl-urée

**DHA** : Acide déhydroascorbique

**DIEA** : N,N-Diisopropyléthylamine

**DM1** : Mertansine

**DM4** : Raptansine

**DME** : Diméthoxyéthane

**DMF** : N,N-Diméthylformamide

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**DNP** : Dinitrophényle

**DOTA** : Tetraxetan

**dpm** : Désintégrations par minutes

**DTPA** : Acide diéthylène triamine penta acétique

**E/Glu** : Acide aminé acide glutamique

**EGF** : Epidermal Growth Factor

**ELISA** : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**EPR** : Enhanced Permeability and Retention

**ESI** : Électrospray

**Et<sub>2</sub>O** : Éther diéthylique

**EtOH** : Éthanol

**F/Phe** : Acide aminé phénylalanine

**Fab** : Fragment antigen binding

**Fc** : Fragment cristallisable

**FcRn** : Récepteur Fc néonatal

**FcγR** : Récepteur Fc-gamma

**FDA** : Food and Drug Administration

**FGE** : Formylglycine-Generating Enzyme

**Fmoc** : Groupement protecteur fluorénylméthoxycarbone

**FMT** : Fluorescence Molecular Tomography

**FRET** : Fluorescence Resonance Energy Transfer

**G/Gly** : acide aminé glycine

**Gal-3BP** : Galectin-3-Binding Protein

**GSH** : Glutathion réduit

**GTP** : Guanosine-5'-TriPhosphate

**H/His** : Acide amine histidine

**HATU** : Hexafluorophosphate de (diméthylamino)-N,N-diméthyl(3H-[1,2,3]triazole[4,5b]pyridin-3-yloxy)méthaniminium

**HC** : Heavy Chain, chaîne lourde

**HCAb** : Heavy-Chain Antibody

**HCCA** : Acide α-cyano-4-hydroxycinnamique

**HEK** : Human Embryonic Kidney

**HER-2** : Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

**HOBt** : Hydroxybenzotriazole

**HRMS** : Spectrométrie de masse à haute résolution

**HRP** : Horseradish peroxidase

**I/Ile** : Acide amine isoleucine

**ICy** : N,N-dicyclohexylimidazol-2-ylidene

**IDA** : Iminodiacétique

**Ig** : Immunoglobuline

**IGN** : Indolinobenzodiazépine

**K/Lys** : Acide amine lysine

**L/Leu** : Acide aminé leucine

**LB** : Ligand Binding

**LC** : Light Chain, chaîne légère

**LC-MS/MS** : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

**LESA** : Liquid Extraction Surface Analysis

**LLOQ** : Lower Limit Of Quantification

**M/Met** : Acide amine méthionine

**mAb** : Monoclonal Antibody, anticorps monoclonal

**MAC** : Membrane Attack Complex

**MALDI-TOF** : Spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol

**Mc** : Maléimidocaproïque

**MCA** : 7-méthoxycoumarine-4-acétique acide

**MDap** : Maléimido diaminopropionique

**MDR1** : Multi Drug Resistance 1

**MMAE** : Monométhyle Auristatine E

**MMAF** : Monométhyle Auristatine F

**MMP** : Métalloprotéases matricielles

**Mmt** : Groupement protecteur monométhoxytrityl

**MT1-MMP** : Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase, MMP-14

**MTCBP-1** : Membrane-Type 1 matrix metalloproteinase Cytosplasmic tail-Binding Protein-1

**MW** : Marqueur de poids moléculaire

**N/Asn** : Acide aminé asparagine

**NHC** : Carbène N-hétérocyclique

**NHS** : N-hydroxysuccinimide

**Np** : Nanoparticules

**NPS** : N-(propionyloxy)succinimide

**NTA** : Nitriлотriacétique

**P/Pro** : Acide aminé proline

**PABC** : Espaceur p-aminobenzyl-carbamate

**PABOH** : p-aminobenzyl-alcool

**pAcF** : Para-acétyl phénylalanine

**pAMF** : Para-azidométhyl phénylalanine

**PBD** : Pyrrolobenzodiazépine

**PBS** : Tampon phosphate salin

**PEG** : Polyéthylène glycol

**PEI** : Polyéthylèneimine

**P-gp** : Glycoprotéine P

**PVDF** : Polyfluorure de vinylidène

**Q/Gln** : Acide aminé glutamine

**QWBA** : Autoradiographie quantitative sur corps entier

**R/Arg** : Acide aminé arginine

**RECK** : Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motif

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**S/Ser** : Acide amine sérine

**scFv** : Single-chain variable fragment

**SDS-PAGE** : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

**SEC** : Chromatographie d'exclusion stérique

**SHA** : Semi-Homogeneous Assay

**SI** : Standard Interne

**SPE** : Solid Phase Extraction

**SPPS** : Synthèse peptidique sur support solide

**T/Thr** : Acide aminé thréonine

**tBu** : Groupement protecteur tert-Butyle

**TCEP** : Tris(2-carboxyéthyl)phosphine

**TEMP** : Tomographie par émission monophotonique

**TEP** : Tomographie par émission de positrons

**TG** : Transglutaminase

**TFA** : Acide trifluoroacétique

**THF** : Tétrahydrofurane

**TIMP** : Tissue Inhibitor of Metalloproteinase

**TIPS** : Triisopropylsilyle

**TRAIL** : Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand

**Trt** : Groupement protecteur trityle

**V/Val** : Acide aminé valine

**VEGF-A** : Vascular Endothelial Growth Factor-A

**VEGFR** : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

**VH** : Variable Heavy, domaine variable de la chaîne lourde

**VL** : Variable Light, domaine variable de la chaîne légère

**W/Trp** : Acide aminé tryptophane

**WBA** : Autoradiographie sur corps entier

**Y/Tyr** : Acide aminé tyrosine

**Z/CBz** : Groupement protecteur carbobenzyloxy

# TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>4</b>
<b>PRÉFACE.....</b>	<b>16</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....</b>	<b>17</b>
1 ANTIBODY-DRUG CONJUGATES (ADC) – UNE CLASSE DE PUISSANTES THÉRAPIES CIBLÉES ....	18
1.1 LES ANTICORPS COMME AGENTS THÉRAPEUTIQUES .....	18
1.1.1 Structure et classification.....	18
1.1.2 Modes d'action des anticorps thérapeutiques .....	20
1.1.3 Améliorer l'efficacité des anticorps thérapeutiques anti-cancéreux.....	24
1.2 LES ADC, UN ASSEMBLAGE DE TROIS COMPOSANTS .....	27
1.2.1 Mécanisme d'action des ADC.....	28
1.2.2 L'anticorps et son antigène apparenté .....	30
1.2.3 La molécule cytotoxique .....	31
1.2.4 Le linker synthétique.....	37
1.3 UN DESIGN OPTIMISÉ POUR UN MEILLEUR BÉNÉFICE THÉRAPEUTIQUE.....	43
1.3.1 Les ADC de première génération .....	44
1.3.2 Les ADC de deuxième génération .....	47
1.3.3 Les ADC de troisième génération.....	51
2 LA PHARMACOCINÉTIQUE ET LA BIODISTRIBUTION DES ADC LORS DES ÉTUDES PRÉCLINIQUES .....	61
2.1 LES DIFFÉRENTS ASPECTS À CONSIDÉRER LORS DE LA BIOANALYSE DES ADC.....	61
2.2 L'ÉTUDE PHARMACOCINÉTIQUE DES ADC.....	63
2.2.1 La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS).....	64
2.2.2 Les tests immunologiques .....	65

2.2.3	Les méthodes hybrides où l'immuno-capture est associée à la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LB-LC-MS/MS) .....	68
2.3	<i>L'ÉTUDE DE LA BIODISTRIBUTION DES ADC</i> .....	72
2.3.1	Les méthodes de biodistribution impliquant un marquage de l'ADC.....	74
2.3.2	Les méthodes "label-free" .....	77
2.4	<i>L'APPORT DE LA RADIO-IMAGERIE BÊTA HAUTE RÉOLUTION</i> .....	78
2.4.1	De l'autoradiographie vers la radio-imagerie bêta .....	78
2.4.2	Le BetaMAGER™, un dispositif de radio-imagerie bêta digitale .....	80
2.4.3	Un outil puissant pour la multi détection .....	83
3	<b>MMP-14 – UNE CIBLE THÉRAPEUTIQUE DANS LE TRAITEMENT DE CANCER</b> .....	85
3.1	<i>LES MÉTALLOPROTÉASES MATRICIELLES</i> .....	85
3.1.1	Fonctions biologiques.....	85
3.1.2	Classification.....	86
3.1.3	Structure.....	87
3.2	<i>MMP-14, IMPLIQUÉE DANS LA PROLIFÉRATION MÉTASTATIQUE</i> .....	88
3.2.1	Fonctions biologiques et implications dans le cancer .....	90
3.2.2	Régulation de l'activité de la MMP-14 .....	93
3.3	<i>LES THÉRAPIES ANTI-CANCÉREUSES CIBLANT LA MMP-14</i> .....	99
3.3.1	Les inhibiteurs à large spectre.....	99
3.3.2	Les inhibiteurs spécifiques de la MMP-14.....	105
3.3.3	Les thérapies ciblées .....	111
3.4	<i>DE NOUVEAUX ANTICORPS INSPIRÉS DES CAMÉLIDÉS COMME INHIBITEURS DE PROTÉASES</i> .....	115
3.4.1	Les anticorps de camélidés comme inhibiteurs d'enzymes .....	115
3.4.2	Développement de nouveaux inhibiteurs de la MMP-14.....	117
4	<b>OBJECTIFS</b> .....	124

## **CHAPITRE 2 : IDENTIFICATION DE POSITIONS RÉACTIVES, VERS L'OBTENION DE MÉTHODES DE MARQUAGE RÉGIO-SPÉCIFIQUES ..... 128**

1	<b>LA TRANGLUSTAMINASE BACTÉRIENNE, UN OUTIL POUR LA MODIFICATION DES RÉSIDUS GLUTAMINE ET LYSINE</b> .....	129
---	---	-----

1.1	<i>CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DE LA TRANSGLUTAMINASE BACTÉRIENNE</i> .....	130
1.2	<i>LES DIFFÉRENTES APPLICATIONS DE LA TRANSGLUTAMINASE BACTÉRIENNE POUR LA GÉNÉRATION DE BIOCONJUGUÉS</i> .....	132
1.2.1	La modification des résidus glutamine.....	132
1.2.2	La modification des résidus lysine.....	135
1.2.3	Avantages et limitations de la méthode .....	136
2	<i>L'UTILISATION DE LA TRANSGLUTAMINASE BACTÉRIENNE POUR LE MARQUAGE DU FAB3A2</i> .....	137
2.1	<i>LA MODIFICATION ENZYMATIQUE DES RÉSIDUS GLUTAMINE</i> .....	137
2.1.1	L'identification des positions réactives .....	139
2.1.2	La différence de réactivité entre les résidus glutamine.....	143
2.2	<i>LA MODIFICATION ENZYMATIQUE DES RÉSIDUS LYSINE</i> .....	146
2.2.1	L'identification des positions réactives .....	147
2.2.2	La différence de réactivité entre les résidus lysine .....	149
2.2.3	L'immobilisation sur support solide améliore la régio-spécificité.....	151
3	<i>LA MODIFICATION CHIMIQUE DES RÉSIDUS CYSTÉINE</i> .....	155
3.1	<i>LA PRODUCTION D'UN FAB3A2 PORTANT UN RÉSIDU CYSTÉINE LIBRE</i> .....	155
3.1.1	La production en système bactérien .....	156
3.1.2	La production en système eucaryote .....	156
3.2	<i>LA CONJUGAISON SUR SUPPORT SOLIDE</i> .....	162

## **CHAPITRE 3 : TRITIATION DE LA MONOMÉTHYLE AURISTATINE E (MMAE) ET SYNTHÈSE D'UNE MOLÉCULE MARQUÉE AU CARBONE 14 .....**

1	LES CONSIDÉRATIONS DANS LE CHOIX DES RADIOISOTOPES.....	171
2	LA TRITIATION DE LA MONOMÉTHYLE AURISTATINE E (MMAE).....	173
3	LA SYNTHÈSE D'UNE MOLÉCULE RADIOMARQUÉE AU CARBONE 14 .....	175
3.1	<i>LES URÉES CYCLIQUES</i> .....	176
3.1.1	La preuve de concept : le mono-peptide .....	177
3.1.2	L'élongation de la chaîne peptidique .....	178
3.2	<i>LES URÉES LINÉAIRES</i> .....	180
3.2.1	La synthèse de la molécule marquée .....	181

3.2.2	La conjugaison chémo-enzymatique .....	182
-------	--	-----

## **CHAPITRE 4 : LA PRODUCTION D'ADC DOUBLEMENT MARQUÉS DE MANIÈRE RÉGIO-SPÉCIFIQUE ..... 186**

1	LE CHOIX DES COMBINAISONS DE DOUBLE CONJUGAISON .....	187
2	LA DOUBLE CONJUGAISON ENZYMATIQUE.....	188
2.1	<i>LA MODIFICATION DE LA LYSINE SUIVIE DE CELLES DES GLUTAMINES</i> .....	191
2.2	<i>LA MODIFICATION DES GLUTAMINES SUIVIES DE CELLE DE LA LYSINE</i> .....	193
2.2.1	La preuve de concept avec des molécules modèles.....	193
2.2.2	La double conjugaison des molécules d'intérêt.....	195
2.3	<i>LA MUTATION D'UN RÉSIDU GLUTAMINE RÉACTIF</i> .....	200
3	LA DOUBLE CONJUGAISON CHIMIQUE ET ENZYMATIQUE .....	204
3.1	<i>LA DOUBLE CONJUGAISON CYSTÉINE-GLUTAMINE</i> .....	207
3.2	<i>LA DOUBLE CONJUGAISON CYSTÉINE-LYSINE</i> .....	208

## **CHAPITRE 5 : L'ÉVALUATION *IN VIVO* DES ADC DOUBLEMENT MARQUÉS ... 210**

1	LA DÉTERMINATION DU RATIO $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ .....	211
1.1	<i>LA DOUBLE DÉTECTION PAR SCINTILLATION LIQUIDE</i> .....	212
1.1.1	Principe de la double détection par scintillation liquide .....	212
1.1.2	La mise au point expérimentale de la double détection par scintillation liquide.....	213
1.1.3	L'évaluation du quenching induit par les milieux biologiques.....	217
1.1.4	La détermination de la limite de quantification dans le sang.....	219
1.2	<i>LA DOUBLE DÉTECTION PAR AUTORADIOGRAPHIE DIGITALE</i> .....	220
2	LA PREUVE DE CONCEPT DE LA DOUBLE DÉTECTION <i>EX VIVO</i> .....	223
2.1	<i>LES OBJETS SÉLECTIONNÉS POUR L'ÉTUDE</i> .....	223
2.2	<i>L'ÉTUDE PHARMACOCINÉTIQUE</i> .....	224
2.2.1	La pharmacocinétique du Fab3A2.....	225
2.2.2	La pharmacocinétique d'un ADC doublement marqué .....	226
2.3	<i>L'ÉTUDE DE LA BIODISTRIBUTION</i> .....	227

3	L'ÉVALUATION DES ADC DANS LE MODÈLE TUMORAL 4T1 .....	230
3.1	LE MODÈLE DE CARCINOME MAMMAIRE 4T1 .....	230
3.2	L'ÉTUDE DE LA STABILITÉ DES CONJUGUÉS.....	231
3.2.1	La stabilité dans le plasma.....	232
3.2.2	La stabilité dans le broyat tumoral.....	234
3.3	L'ÉVALUATION DANS LE MODÈLE TUMORAL 4T1 .....	236
3.3.1	La sélection de l'objet à évaluer .....	236
3.3.2	La détermination du profil pharmacocinétique .....	237
3.3.3	L'évaluation de la biodistribution .....	238

## CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES ..... 253

## CHAPITRE 7 : MATÉRIELS ET MÉTHODES..... 257

1	INFORMATIONS GÉNÉRALES .....	258
1.1	RÉACTIFS .....	258
1.2	INSTRUMENTS.....	258
2	SYNTHÈSE DES MOLÉCULES MODÈLE .....	260
2.1	LA MOLÉCULE AMINE PRIMAIRE .....	260
2.2	LES SUBSTRATS GLUTAMINE .....	266
2.2.1	Le substrat CBz-Gln-Gly-Val-Ala.....	266
2.2.2	Le substrat CBz-Gln-Gly-Lys(Pr) .....	269
3	RADIOMARQUAGE AU TRITIUM DE LA MONOMÉTHYLE AURISTATINE (MMAE) ET SYNTHÈSE DES LINKER-CYTOTOXIQUE .....	274
3.1	RADIOMARQUAGE DE LA MMAE .....	274
3.2	LES LINKER-CYTOTOXIQUES NON-CLIVABLES.....	276
3.2.1	Le linker-cytotoxique maléimide.....	276
3.2.2	Le linker-cytotoxique maléimide auto-hydrolysable.....	279
3.2.3	Le linker-cytotoxique glutamine.....	286
3.2.4	Le linker-cytotoxique amine primaire .....	290
3.3	LES LINKER-CYTOTOXIQUES CLIVABLES .....	296

3.3.1	Le dipeptide clivable Val-Ala .....	296
3.3.2	Le linker-cytotoxique clivable maléimide .....	302
3.3.3	Le linker-cytotoxique clivable maleimide auto-hydrolysable .....	309
3.3.4	Le linker-cytotoxique clivable glutamine .....	319
3.3.5	Le linker-cytotoxique clivable amine primaire .....	324
4	SYNTHÈSE D'UNE MOLÉCULE RADIOMARQUÉE AU CARBONE 14.....	334
5	PRODUCTION DES FRAGMENTS D'ANTICORPS .....	344
6	CONJUGAISON ENZYMATIQUE ET CHIMIQUE.....	347
6.1	<i>SYNTHÈSE DES MONOCONJUGUÉS</i> .....	347
6.2	<i>SYNTHÈSE DES CONJUGUÉS DOUBLEMENT MARQUÉS</i> .....	353
7	TESTS D'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE.....	355
7.1	<i>INHIBITION DE LA MMP-14</i> .....	356
7.2	<i>INHIBITION DES AUTRES MMP</i> .....	358
8	EXPÉRIMENTATION ANIMALE .....	359
8.1	<i>LE MODÈLE DE CARCINOME MAMMAIRE 4T1</i> .....	359
8.2	<i>INJECTION DES CONJUGUÉS ET SUIVI PHARMACOCINÉTIQUE</i> .....	359
8.3	<i>PERFUSION ET CONGÉLATION DES ORGANES</i> .....	359
8.4	<i>OBTENTION DES EXTRAITS TUMORAUX</i> .....	360
8.5	<i>COUPES DES ORGANES AU CRYOSTAT</i> .....	360
	<b>ANNEXES.....</b>	<b>361</b>

## PRÉFACE

Concevoir des médicaments capables de cibler un tissu pathologique est un objectif de longue date dans le développement de traitements à visée oncologique ou non-oncologique. Depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, il est reconnu que le traitement efficace d'une maladie par un agent thérapeutique nécessite une certaine sélectivité du médicament pour les cellules malades, tout en préservant les cellules saines. Le développement d'Antibody-Drug Conjugates (ADC) nous a rapproché de cet objectif dans le cadre du traitement du cancer.

Grâce à la persévérance d'un certain nombre de groupes de recherche, les ADC sont désormais considérés comme une classe de thérapies ciblées émergentes qui révolutionnent le traitement de certains cancers. De l'extérieur, la technologie est d'une simplicité trompeuse : un anticorps spécifique vectorise un puissant cytotoxique lié de manière covalente vers le tissu cible, dans lequel ce dernier sera délivré pour exercer son effet thérapeutique. Cependant, les données révèlent que le taux d'échec des programmes de développement d'ADC n'est pas si éloigné de celui des petites molécules, et qu'il reste donc un nombre important de paramètres encore inconnus à optimiser lors de la conception d'ADC. À cet égard, les technologies autour de la synthèse et de la bioanalyse des conjugués anticorps-médicaments ont explosées au cours des dix dernières années en essayant de pallier les lacunes des ADC de première génération. Les ADC en développement préclinique et clinique emploient maintenant un éventail de technologies sophistiquées qui incluent plus d'une dizaine de classes de molécules cytotoxiques, diverses méthodologies de conjugaison et structures de linkers ainsi que de nombreuses variétés d'anticorps.

Cette thèse s'inscrit dans ce contexte d'optimisation des performances et d'amélioration de la compréhension des propriétés des ADC. L'objectif de ce manuscrit est de présenter certaines méthodologies clés qui sont couramment utilisées dans la conception et la bioanalyse des ADC et de mettre en évidence l'apport du double radiomarquage et de la radio-imagerie duale pour la compréhension approfondie du comportement de ces conjugués. Ce travail a également pour but de mettre en avant l'utilisation de nouvelles cibles antigéniques qui permettent le développement d'ADC présentant un mode d'action original.

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

# 1 ANTIBODY-DRUG CONJUGATES (ADC) – UNE CLASSE DE PUISSANTES THÉRAPIES CIBLÉES

---

## 1.1 LES ANTICORPS COMME AGENTS THÉRAPEUTIQUES

Un quart de siècle après leur découverte, les anticorps monoclonaux (mAbs pour monoclonal antibodies) sont devenus la classe de protéines thérapeutiques la plus largement développée dans le traitement d'une grande variété de pathologies, notamment le cancer, les maladies inflammatoires chroniques et les maladies auto-immunes<sup>1</sup>. Les anticorps ou immunoglobulines (Igs) sont des glycoprotéines capables de lier un antigène avec de très hautes affinité et spécificité.

### 1.1.1 Structure et classification

Parmi les cinq isotypes d'immunoglobulines humaines - à savoir IgA, IgD, IgE, IgG et IgM - les IgGs représentent environ 75% des anticorps que l'on retrouve en circulation, et comptent pour 10 à 20% de la totalité des protéines plasmatiques<sup>2</sup>. C'est le seul isotype d'anticorps dont l'utilisation clinique a été approuvée aujourd'hui. Les IgGs sont des glycoprotéines tétramériques d'environ 150 kDa, composées de deux chaînes lourdes  $\gamma$  (HC pour Heavy Chain) d'environ 50 kDa et de deux chaînes légères  $\kappa$  ou  $\lambda$  (LC pour Light Chain) d'environ 25 kDa. Ces chaînes sont reliées entre elles par des ponts disulfures, formant ainsi une molécule en forme de Y contenant deux fragments de liaison à l'antigène (Fab pour Fragment Antigen Binding) et un fragment cristallisable (Fc) (Figure 1). Chaque chaîne est composée i) d'une partie constante contenant trois domaines CH1, CH2 et CH3 (CH pour Constant Heavy) pour la chaîne lourde et un domaine CL (Constant Light) pour la chaîne légère, ainsi que ii) d'une partie

---

<sup>1</sup> Beck, A., Wagner-Rousset, E., Ayoub, D., Van Dorsselaer, A. & Sanglier-Cianférani, S. Characterization of therapeutic antibodies and related products. *Anal. Chem.* **85**, 715–736 (2013).

<sup>2</sup> Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispen, T. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Front. Immunol.* **5**, 1–17 (2014).

variable N-terminal VH (Variable Heavy) pour la chaîne lourde et VL (Variable Light) pour la chaîne légère. La liaison à l'antigène se fait par les domaines variables VH et VL, et notamment par les trois boucles qui relient les différents feuillets bêta de chaque domaine, appelées Complementary-Determining Regions (CDRs). En interagissant avec le FcRn (neonatal Fc Receptor), un récepteur largement distribué dans l'organisme, le fragment Fc est, quant à lui, un acteur incontournable de la pharmacocinétique des anticorps, modulant leur recyclage en circulation après internalisation et leur protection vis-vis du catabolisme intracellulaire<sup>3</sup>.

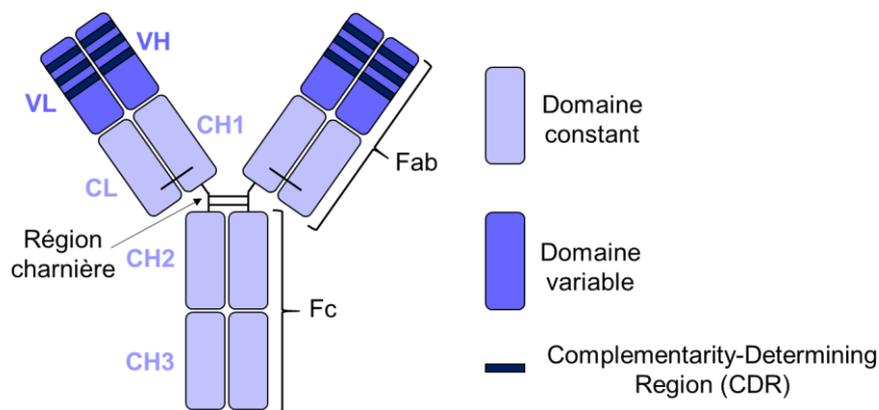


Figure 1 - Représentation schématique de la structure tétramérique d'une IgG, composée de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères.

On retrouve quatre sous-classes d'IgGs, appelées IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 en fonction de leur abondance décroissante dans le sérum. Bien qu'ils soient globalement identiques, avec plus de 90% d'homologie de séquence, ces sous-types d'IgGs se différencient structurellement par la longueur de leur région charnière entre le Fc et les Fabs, par leur nombre de ponts disulfures et par leur poids moléculaire<sup>4</sup> (Tableau 1).

<sup>3</sup> Pyzik, M. et al. The neonatal Fc Receptor (FcRn): A misnomer? *Front. Immunol.* **10**, (2019).

<sup>4</sup> Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispen, T. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Front. Immunol.* **5**, 1–17 (2014).

Propriétés	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Abondance relative	60%	32%	4%	4%
Poids moléculaire	~146 kDa	~146 kDa	~170 kDa	~146 kDa
Nombre de résidus dans la région charnière	15	12	62	12
	4	6	13	4
Nombre de pont disulfures inter-chaînes	2 HC-LC 2 HC-HC	2 HC-LC 4 HC-HC	2 HC-LC 11 HC-HC	2 HC-LC 2 HC-HC
Demi-vie	21 jours	21 jours	7 jours	21 jours

Tableau 1 – Caractéristiques des différents sous-types d'IgGs.

### 1.1.2 Modes d'action des anticorps thérapeutiques

Les anticorps thérapeutiques sont des protéines multifonctionnelles capables de lier leur cible *via* leur domaine Fab, tout en liant les composants du système du complément ou les récepteurs Fcγ (FcγRs) des cellules immunitaires par leur domaine Fc. Ainsi, les IgGs peuvent interagir à la fois avec leur cible, mais aussi avec le système immunitaire pour exercer leur activité *via* différents mécanismes d'action conduisant à la perturbation de la signalisation cellulaire ou à la destruction de la cellule exprimant l'antigène cible<sup>5</sup>.

#### 1.1.2.1 Les fonctions induites par l'activité du fragment Fab

L'activité la plus directe de l'anticorps se produit lorsque celui-ci interagit avec un ligand soluble ou un récepteur cellulaire. En agissant de manière non-agoniste, il perturbe la signalisation en

<sup>5</sup> Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispen, T. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Front. Immunol.* **5**, 1–17 (2014).

aval, induite par l'interaction ligand-récepteur<sup>6</sup> (Figure 2A et 2B). Il s'agit du mode d'action du bevacizumab (Avastin®) liant le VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A) soluble et utilisé dans le traitement du cancer du côlon métastatique<sup>7</sup>, ou encore du trastuzumab (Herceptin®) anti-HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2), utilisé dans le traitement de certaines formes de cancer du sein<sup>8</sup>. Un anticorps peut aussi agir sur un récepteur en se substituant au ligand naturel<sup>6</sup> (Figure 2C). Ainsi, plusieurs anticorps isolés d'une librairie ont été décrits comme des agonistes, capables d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses en se liant aux récepteurs TRAIL-R1 ou TRAIL-R2 (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand)<sup>9</sup>.

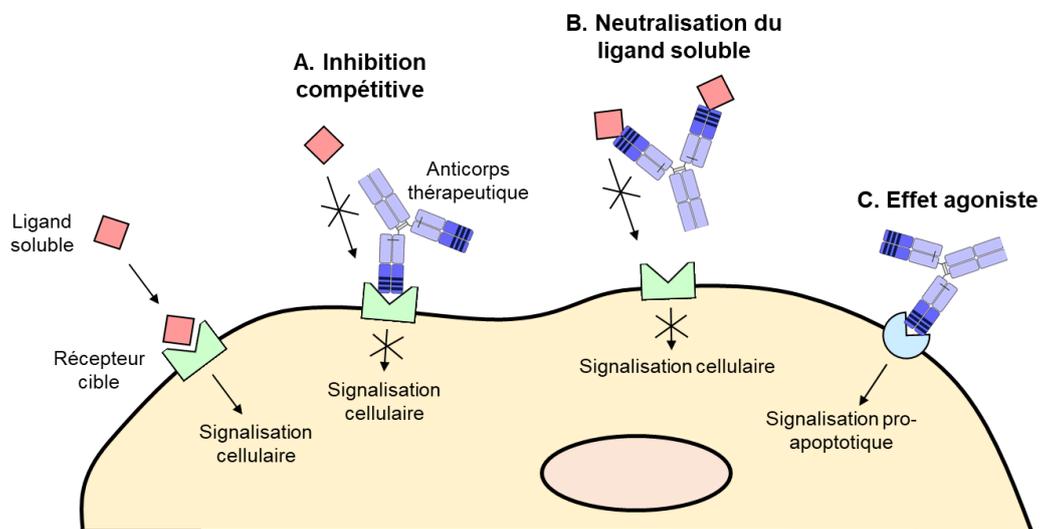


Figure 2 - Représentation des différents modes d'action des anticorps thérapeutiques médiés par le fragment Fab et conduisant à un effet non-agoniste par inhibition compétitive (A) ou neutralisation du ligand soluble (B), ou à un effet agoniste (C).

<sup>6</sup> Monoclonal antibody targets and mechanisms of action. *Ther. Antib. Eng.* 163–595 (2012)  
doi:10.1533/9781908818096.163.

<sup>7</sup> Cohen, M. H., Gootenberg, J., Keegan, P. & Pazdur, R. FDA Drug Approval Summary: Bevacizumab Plus FOLFOX4 as Second-Line Treatment of Colorectal Cancer. *Oncologist* **12**, 356–361 (2007).

<sup>8</sup> Spigel, D. R. & Burstein, H. J. Trastuzumab regimens for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Clin. Breast Cancer* **4**, 329–337 (2003).

<sup>9</sup> Dobson, C. L. et al. Human monomeric antibody fragments to TRAIL-R1 and TRAIL-R2 that display potent in vitro agonism. *MAbs* **1**, 552–562 (2009).

### 1.1.2.2 Les fonctions effectrices induites par l'activité du fragment Fc

Le système du complément combine de multiples mécanismes d'action qui entraînent l'opsonisation puis la destruction d'un antigène ciblé. La liaison d'une IgG de type 1 à sa cible apparentée peut entraîner l'initiation d'un de ces modes d'action, appelé cytotoxicité dépendante du complément (CDC pour Complement-Dependent Cytotoxicity). En effet, la liaison de l'anticorps peut s'accompagner d'un changement de conformation de son domaine Fc permettant la fixation d'une opsonine C1q. L'opsonisation de l'anticorps initie une cascade de réactions complexes aboutissant à la formation d'un complexe MAC (Membrane Attack Complex) qui entraîne la mort de la cellule cible par la destruction de sa membrane<sup>10</sup> (Figure 3A). L'ofatumumab (Arzerra®), qui cible CD20 et qui est utilisé pour le traitement des leucémies lymphoïdes chroniques, utilise ce mécanisme d'action pour exercer son effet anti-cancéreux<sup>11</sup>.

Indépendamment du système du complément, les anticorps thérapeutiques peuvent recruter le système immunitaire par interaction directe de leur fragment Fc avec le FcγR des cellules immunitaires. La cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC pour Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) est un mécanisme d'action par lequel, les lymphocytes NK (pour Natural Killer) sont recrutés *via* leur FcγR, et libèrent des molécules cytotoxiques qui entraînent la lyse d'une cellule cible, opsonisée en surface par des anticorps liés à un antigène membranaire<sup>12</sup> (Figure 3B). Similairement, les macrophages peuvent être recrutés pour jouer le rôle de cellules effectrices en détruisant la cellule cible opsonisée par phagocytose, on parle alors de phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP pour Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis)<sup>13</sup> (Figure 3C). Le rituximab (Rituxan®), approuvé

---

<sup>10</sup> *Monoclonal antibody targets and mechanisms of action. Ther. Antib. Eng.* 163–595 (2012) doi:10.1533/9781908818096.163.

<sup>11</sup> Lemery, S. J. et al. U.S. food and drug administration approval: Ofatumumab for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia refractory to fludarabine and alemtuzumab. *Clin. Cancer Res.* **16**, 4331–4338 (2010).

<sup>12</sup> Gómez Román, V. R., Murray, J. C. & Weiner, L. M. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC). *Antib. Fc Link. Adapt. Innate Immun.* 1–27 (2013) doi:10.1016/B978-0-12-394802-1.00001-7.

<sup>13</sup> Herbrand, U. Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis: The Mechanism of Action That Gets No Respect A Discussion About Improving Bioassay Reproducibility. *Bioprocess. J.* **15**, 26–29 (2016).

par la Food and Drug Administration (FDA) pour traiter les patients atteints d'un lymphome non hodgkinien, utilise ces deux mécanismes ADCC et ADCP pour exercer son effet anti-cancéreux<sup>14</sup>.

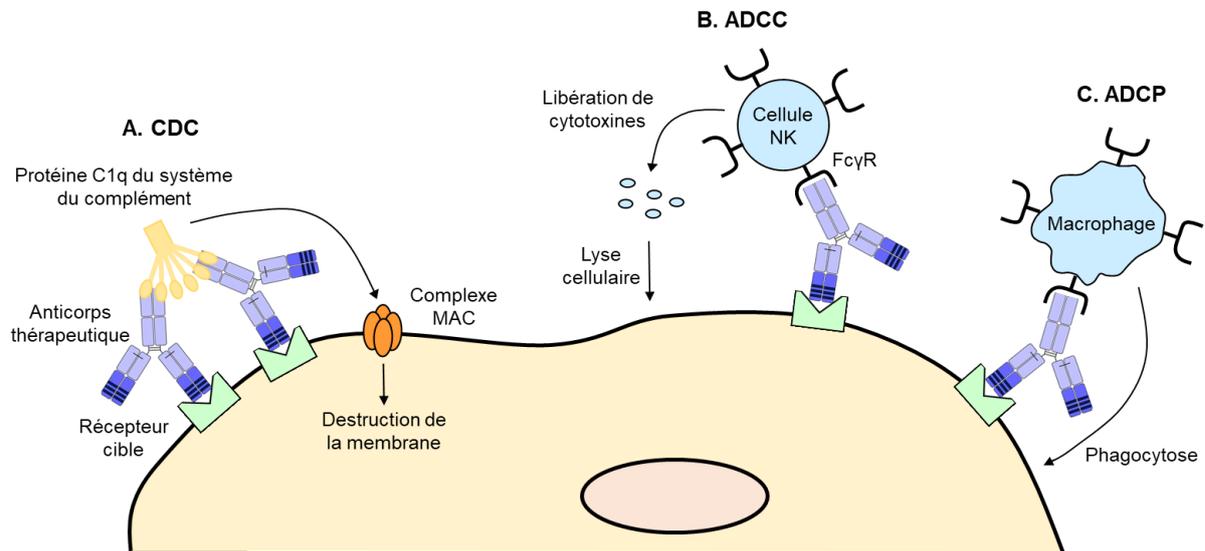


Figure 3 - Représentation des différentes fonctions effectrices des anticorps thérapeutiques médiées par le fragment Fc via le système de complément CDC (A) ou les cellules immunitaires ADCC (B) et ADCP (C).

Une classification des anticorps thérapeutiques en trois catégories a été établie en fonction de leurs différents mécanismes d'actions<sup>15</sup>. Les anticorps de classe I se lient à un antigène à la surface d'une cellule, et leur mode d'action implique les fonctions effectrices du fragment Fc. Les anticorps de classe II interagissent avec un antigène à la surface d'une cellule, mais leur mode d'action n'implique aucune fonction effectrice. Enfin, les anticorps de classe III se lient à un antigène soluble et inhibent sa liaison au récepteur apparenté.

<sup>14</sup> Grillo-Lopez, A. et al. Rituximab The First Monoclonal Antibody Approved for the Treatment of Lymphoma. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 1, 1–9 (2005).

<sup>15</sup> Jiang, X. R. et al. Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 101–110 (2011).

### 1.1.3 Améliorer l'efficacité des anticorps thérapeutiques anti-cancéreux

En 1975, les premiers mAbs ont été produits par des cellules murines issues de la fusion entre un lymphocyte B et une cellule cancéreuse (myélome), appelées hybridomes<sup>16</sup>. Ces anticorps murins - portant le suffixe -momab – ont rapidement fait l'objet de développements thérapeutiques et en 1986 le muromomab anti-CD3 a été le premier commercialisé pour inhiber les rejets de greffe<sup>17</sup>. Plusieurs autres mAbs murins ont été développés mais se sont révélés inadaptés à un usage thérapeutique étendu chez l'homme, notamment en raison de leur faible activité et de leur trop forte immunogénicité. Par la suite, il devint possible de combiner l'ADN murin provenant des hybridomes avec l'ADN humain codant pour des IgGs humaines, conduisant à la production de mAbs, dont la structure et les propriétés se rapprochent des IgGs humaines. Ces anticorps dits chimériques<sup>18</sup> (Figure 4) - portant le suffixe -ximab - correspondent à une fusion des domaines variables murins avec les domaines constants humains (70% humain). Ils ont été rapidement suivis, par le développement et la commercialisation d'anticorps humanisés<sup>19</sup> (Figure 4) - portant le suffixe -zumab - et dont seuls les domaines hypervariables (CDRs), constituant le paratope, restent d'origine murine (90% humain). Enfin, c'est à partir de 2002 qu'arrive sur le marché les premiers mAbs recombinants entièrement humains (Figure 4), portant le suffixe -mumab, et isolés par criblage de banques de phages exprimant des VH et VL humains<sup>20</sup>. Les anticorps chimériques, humanisés et humains sont de meilleurs agents thérapeutiques : leur fragment Fc humain leur confère un temps de demi-vie prolongé qui tend se rapprocher de celui des IgGs humaines endogènes, ainsi que la capacité d'interagir avec le système immunitaire (système du complément, cellules

---

<sup>16</sup> KÖHLER, G., MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).

<sup>17</sup> Todd, P. A. & Brogden, R. N. Muromonab CD3: A Review of its Pharmacology and Therapeutic Potential. *Drugs* **37**, 871–899 (1989).

<sup>18</sup> Neuberger, M. S. et al. A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function. *Nature* **314**, 268–270 (1985).

<sup>19</sup> Lellouch, E., Hubbard, W. B., Sicardy, B., Vilas, F. & Bouchet, P. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* **324**, 227–231 (1986).

<sup>20</sup> McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* vol. 348 552–554 (1990).

effectrices)<sup>21</sup>. L'utilisation de ces anticorps recombinants a permis une nette réduction de l'immunogénicité chez l'homme. Cependant, tout anticorps, même humain, reste immunogène par ses CDRs<sup>22</sup>.

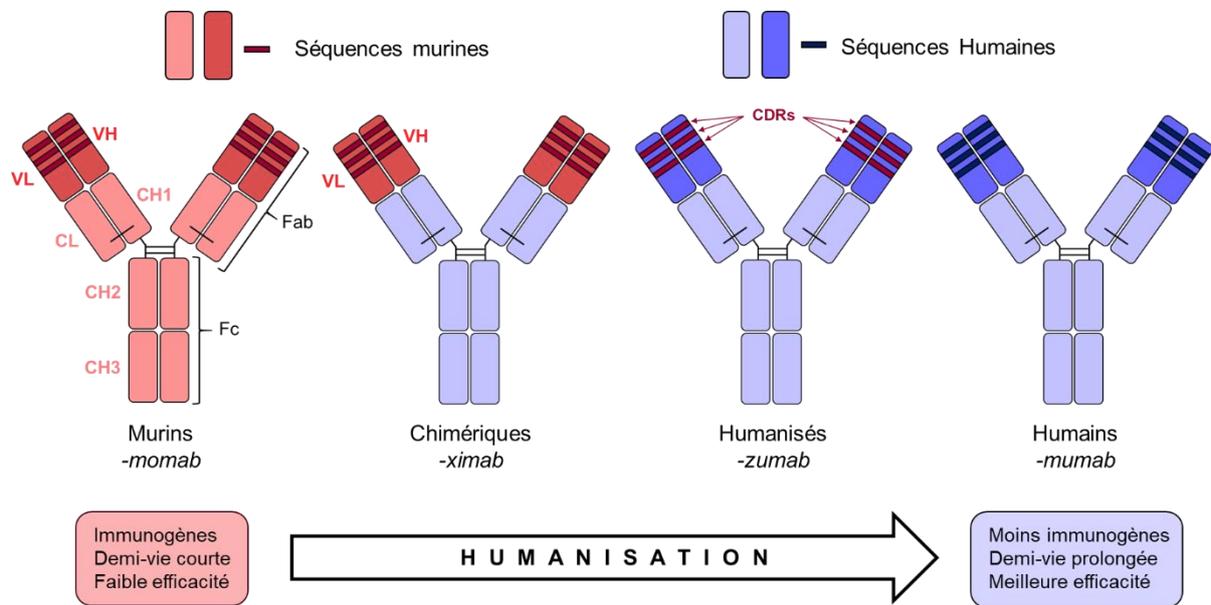


Figure 4 - Des anticorps murins vers les anticorps humains, un processus d'humanisation progressif.

Grâce aux mAbs recombinants, moins immunogènes et ayant un temps de circulation prolongé, les patients ont pu bénéficier de traitements mieux tolérés et avec des injections plus espacées. Néanmoins, ces anticorps présentent plusieurs limitations avec notamment une pénétration tissulaire insuffisante au sein des tumeurs solides<sup>23</sup>. C'est dans ce contexte que des anticorps thérapeutiques de plus petites tailles pouvant diffuser plus rapidement et de façon plus homogène au sein de la masse tumorale ont été développés<sup>24</sup> (Figure 5). Il s'agit de fragments d'anticorps fonctionnels (Fab, Fab' et F(ab')<sub>2</sub>) ou de protéines de fusion incorporant les

<sup>21</sup> Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. & Baty, D. Therapeutic antibodies: Successes, limitations and hopes for the future. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 220–233 (2009).

<sup>22</sup> Harding, F. A., Stickler, M. M., Razo, J. & DuBridge, R. B. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: Residual immunogenicity resides in the CDR regions. *MAbs* **2**, 256–265 (2010).

<sup>23</sup> Carter, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 118–129 (2001).

<sup>24</sup> Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. & Baty, D. Therapeutic antibodies: Successes, limitations and hopes for the future. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 220–233 (2009).

domaines variables VH et VL (scFv et di-scFv). Néanmoins, ces objets présentent une demi-vie plasmatisque plus courte, ce qui a nécessité la mise en place de différentes stratégies afin d'augmenter leur temps de circulation *in vivo*. On citera par exemple leur conjugaison à des chaînes polyéthylène glycol (PEG)<sup>25</sup> ou leur fusion à la sérulalbumine humaine<sup>26</sup>.

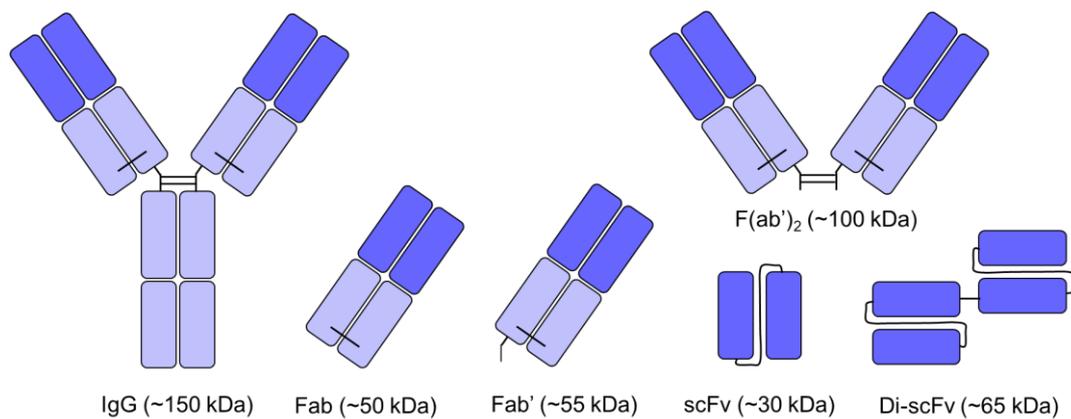


Figure 5 - Fragments fonctionnels d'anticorps et protéines de fusion utilisés comme nouveaux formats d'anticorps thérapeutiques.

L'efficacité des mAbs peut également être améliorée à travers le développement d'anticorps bispécifiques (BsAbs pour Bispecific Antibodies). Issus de la fusion de deux IgGs, ces BsAbs sont des anticorps non-naturels, capables de lier simultanément deux épitopes différents *via leurs* deux fragments Fab<sup>27</sup>. Ainsi, plusieurs exemples dans la littérature décrivent les performances de BsAbs ciblant d'une part un antigène tumoral, et d'autre part un antigène exprimé à la surface d'une cellule immunitaire, renforçant ainsi les mécanismes de mort cellulaire médiés par les cellules effectrices<sup>28</sup>.

<sup>25</sup> Jevsevar, S., Kusterle, M. & Kenig, M. PEGylation of Antibody Fragments for Half-Life Extension. in *Antibody Methods and Protocols* vol. 901 10–32 (2012).

<sup>26</sup> Müller, D. et al. Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin. *J. Biol. Chem.* **282**, 12650–12660 (2007).

<sup>27</sup> Fischer, N. & Léger, O. Bispecific antibodies: Molecules that enable novel therapeutic strategies. *Pathobiology* **74**, 3–14 (2007).

<sup>28</sup> Zhang, X., Yang, Y., Fan, D. & Xiong, D. The development of bispecific antibodies and their applications in tumor immune escape. *Exp. Hematol. Oncol.* **6**, 1–6 (2017).

Finalement, la stratégie la plus largement explorée pour améliorer l'efficacité des anticorps anti-cancéreux est la fonctionnalisation directe par une liaison covalente à une toxine, une cytokine, un radionucléide ou à une petite molécule cytotoxique pour donner des conjugués respectivement appelés immunotoxines, immunocytokines, radioimmunoconjugués et Antibody-Drug Conjugates (ADC)<sup>29</sup>. Ici, l'anticorps remplit le rôle de vecteur protéique qui guide la molécule ou l'élément cytotoxique vers le tissu pathologique cible.

## 1.2 LES ADC, UN ASSEMBLAGE DE TROIS COMPOSANTS

Actuellement, les patients atteints d'un cancer sont principalement traités par chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie, immunothérapie, ou par une combinaison de plusieurs de ces modes de traitement. Cependant, la chimiothérapie et la radiothérapie entraînent de nombreux effets indésirables à la dose administrée nécessaire pour obtenir une efficacité thérapeutique. De plus, dans le cas des traitements à base d'anticorps thérapeutiques, les cellules cancéreuses peuvent acquérir un mécanisme de résistance, qui rend le traitement inefficace sur le long terme<sup>30</sup>. Pour finir, de nombreux cas de récurrence ont été reportés après l'arrêt du traitement, faisant des immunothérapies des traitements à prendre à vie<sup>31</sup>.

Les ADC sont une classe de thérapies ciblées émergentes et considérée comme une chimiothérapie vectorisée. Ils sont conçus pour tirer parti des avantages des anticorps et des petites molécules cytotoxiques en référence au concept de "magic bullet", imaginé par Paul Ehrlich en 1900<sup>32</sup>. Les ADC sont obtenus par la conjugaison de manière covalente d'une petite molécule cytotoxique à un anticorps ciblant spécifiquement un antigène tumoral *via* un lien ("linker") synthétique (Figure 6).

---

<sup>29</sup> Carter, P. *Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies*. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 118–129 (2001).

<sup>30</sup> Reslan, L., Dalle, S. & Dumontet, C. *Understanding and circumvent resistance to anticancer monoclonal antibodies*. **1**, 222–229 (2009).

<sup>31</sup> Borcoman, E., Nandikolla, A., Long, G. & Goel, S. *Patterns of Response and Progression to Immunotherapy*. (2020).

<sup>32</sup> Strebhardt, K. & Ullrich, A. *Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 Years of progress*. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 473–480 (2008).

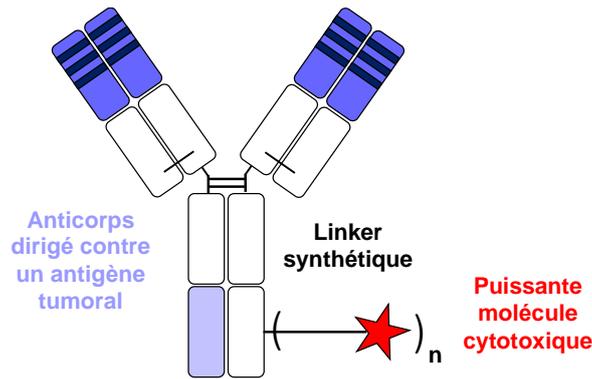


Figure 6 - Représentation de la structure d'un ADC : une petite molécule cytotoxique conjuguée de manière covalente à un anticorps via un linker synthétique.

Bien que seule l'utilisation des ADC dans le cadre d'une thérapie anti-cancéreuse soit développée ici, leur champ d'application ne s'y restreint pas et leur utilisation pour la délivrance d'un antibiotique<sup>33</sup>, d'un immunosuppresseur<sup>34</sup> ou d'un anti-inflammatoire<sup>35,36</sup> a également été décrite.

### 1.2.1 Mécanisme d'action des ADC

Le mécanisme général d'action établi pour les ADC anti-cancéreux comprend plusieurs étapes<sup>37</sup> (Figure 7). Tout d'abord, l'ADC en circulation va venir se fixer à son récepteur cible exprimé à la surface des cellules cancéreuses. L'interaction de l'anticorps avec sa cible tumorale va activer une voie de signalisation cellulaire qui va permettre l'internalisation du complexe antigène-anticorps par un mécanisme d'endocytose dépendante du récepteur. Une fois internalisés au sein des endosomes précoces, les ADC vont ensuite être transportés vers les endosomes tardifs puis vers les lysosomes pour être dégradés par catabolisme. Enfin, l'agent cytotoxique qui a été

<sup>33</sup> Lehar, S. M. et al. Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature* **527**, 323–328 (2015).

<sup>34</sup> Wang, R. E. et al. An immunosuppressive antibody-drug conjugate. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 3229–3232 (2015).

<sup>35</sup> Lim, R. K. V. et al. Targeted Delivery of LXR Agonist Using a Site-Specific Antibody-Drug Conjugate. *Bioconjug. Chem.* **26**, 2216–2222 (2015).

<sup>36</sup> Svendsen, P. et al. Antibody-Directed Glucocorticoid Targeting to CD163 in M2-type Macrophages Attenuates Fructose-Induced Liver Inflammatory Changes. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **4**, 50–61 (2017).

<sup>37</sup> Peters, C. & Brown, S. Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. *Biosci. Rep.* **35**, (2015).

libéré sous une forme active, atteint sa cible intra-cellulaire et induit la mort cellulaire par apoptose. L'agent cytotoxique peut aussi, si ses propriétés chimiques le permettent, diffuser au travers de la membrane cellulaire et aller exercer son action toxique au sein des cellules voisines<sup>38</sup>. Ce processus appelé effet "bystander", peut contribuer à l'amélioration de l'efficacité thérapeutique, notamment dans le cas de tumeurs solides hétérogènes<sup>39</sup>.

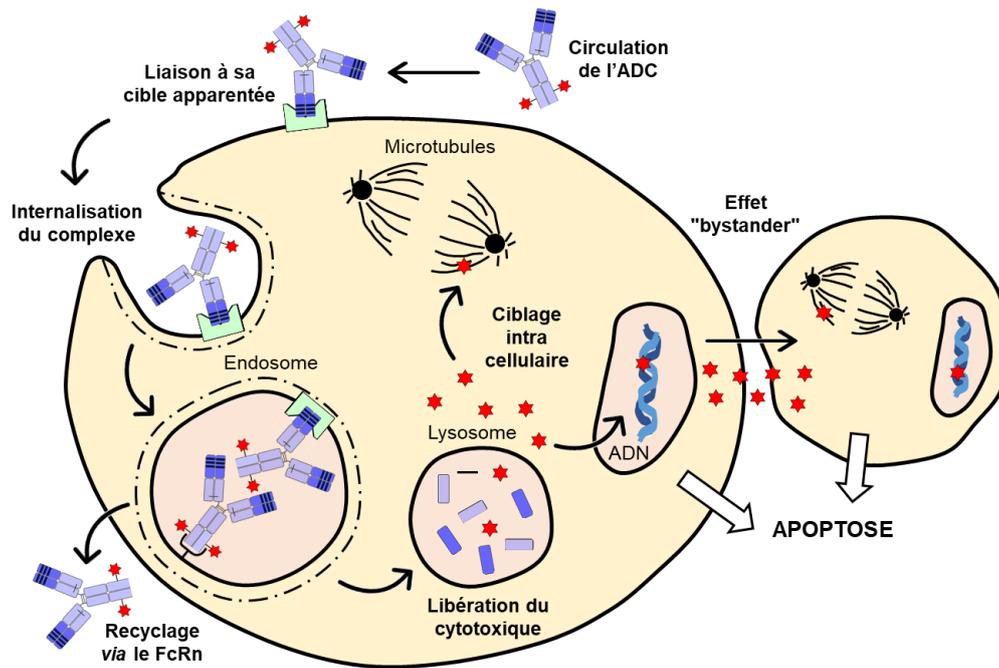


Figure 7 - Mécanisme d'action cytotoxique des ADC par internalisation des conjugués ou par effet "bystander".

Chacune des étapes impliquées dans le mécanisme d'action est associée à des enjeux uniques qui peuvent impacter l'efficacité de délivrance intracellulaire de la petite molécule. Le taux d'expression de l'antigène à la surface cellulaire, l'efficacité d'internalisation et de recyclage en surface du récepteur cible, ainsi que la part d'ADC intact renvoyée vers le milieu extracellulaire *via* le FcRn depuis les endosomes précoces, sont des facteurs qui influencent directement les

<sup>38</sup> Li, F. et al. Intracellular released payload influences potency and bystander-killing effects of antibody-drug conjugates in preclinical models. *Cancer Res.* **76**, 2710–2719 (2016).

<sup>39</sup> Erickson, H. K. et al. Antibody-maytansinoid conjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing. *Cancer Res.* **66**, 4426–4433 (2006).

performances d'un ADC<sup>40</sup>. Ainsi, le développement des ADC nécessite de considérer un ensemble de paramètres clés tels que l'abondance et la bio distribution de l'antigène, les propriétés de l'anticorps, la nature du « linker » modulant le processus de libération du cytotoxique ainsi que le mode d'action de ce dernier<sup>41</sup>.

### 1.2.2 L'anticorps et son antigène apparenté

La fonction principale de l'anticorps est de venir vectoriser la molécule cytotoxique spécifiquement au sein des tissus pathologiques. Pour cela, l'antigène sélectionné doit remplir plusieurs exigences<sup>42</sup>. D'abord, l'antigène cible doit idéalement être abondamment exprimé à la surface des cellules cancéreuses et non exprimé dans les tissus sains, afin de limiter les effets toxiques au sein de ces tissus<sup>43</sup>. L'antigène doit être exposé à la surface de la cellule pour être accessible par l'anticorps circulant. Enfin, le complexe antigène-anticorps doit être internalisé pour permettre une libération intracellulaire de l'agent cytotoxique<sup>44</sup>.

L'affinité de l'anticorps pour sa cible doit être suffisamment forte, pour permettre une accumulation sélective et une rétention durable dans la tumeur. En effet, il a été montré qu'une forte affinité permet d'augmenter le taux d'internalisation de l'ADC<sup>45</sup>. Cependant, une trop forte affinité de l'anticorps pour sa cible peut également influencer négativement sa distribution ; l'anticorps est alors retenu dans l'espace périvasculaire et ne diffuse pas à l'intérieur des tumeurs solides<sup>46</sup>. Contrairement aux mAbs thérapeutiques, l'approche ADC ne nécessite pas que l'anticorps lui-même possède une activité anti cancéreuse, bien que ces

---

<sup>40</sup> Peters, C. & Brown, S. *Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics*. *Biosci. Rep.* **35**, (2015).

<sup>41</sup> Tang, H. et al. *The analysis of key factors related to ADC structural design*. *Front. Pharmacol.* **10**, 1–11 (2019).

<sup>42</sup> Khongorzul, P., Ling, C. J., Khan, F. U., Ihsan, A. U. & Zhang, J. *Antibody-drug conjugates: A comprehensive review*. *Molecular Cancer Research* vol. 18 (2020).

<sup>43</sup> Birrer, M. J., Moore, K. N., Betella, I. & Bates, R. C. *Antibody-Drug Conjugate-Based Therapeutics : State of the Science*. (2019).

<sup>44</sup> Peters, C. & Brown, S. *Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics*. *Biosci. Rep.* **35**, (2015).

<sup>45</sup> Opaliński, Ł. et al. *High affinity promotes internalization of engineered antibodies targeting FGFR1*. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–14 (2018).

<sup>46</sup> Rudnick, S. I. et al. *Influence of affinity and antigen internalization on the uptake and penetration of anti-HER2 Antibodies in Solid Tumors*. *Cancer Res.* **71**, 2250–2259 (2011).

caractéristiques puissent conférer un intérêt thérapeutique supplémentaire. Selon le profil d'activité souhaité, il pourrait être intéressant de développer un ADC avec des fonctions effectrices définies, ou avec la capacité d'interagir avec le système immunitaire ; ce qui peut être obtenu en choisissant le sous-type d'IgG approprié<sup>47</sup>.

### 1.2.3 La molécule cytotoxique

Le composant effecteur d'un ADC est la petite molécule, qui doit elle aussi répondre à plusieurs exigences essentielles. Premièrement, elle doit avoir un puissant pouvoir cytotoxique pour avoir une efficacité thérapeutique suffisante, c'est-à-dire une valeur d'IC<sub>50</sub> inférieure au nanomolaire sur des modèles cellulaires<sup>48</sup>. En effet, la concentration finale atteignable au sein de la tumeur dépend de plusieurs étapes limitantes en amont (distribution de l'ADC, efficacité d'internalisation et de délivrance...), et ne correspond souvent qu'à une très faible part de la dose injectée<sup>49</sup>. Elle doit aussi posséder au sein de sa structure une fonction chimique permettant sa conjugaison à l'anticorps<sup>50</sup>. Enfin, elle doit avoir une très bonne stabilité plasmatique et lysosomale, induire une faible immunogénicité et être pourvue de propriétés physicochimiques adaptées afin de limiter l'agrégation des ADC. De ce point de vue, son hydrophobicité est un critère important, pouvant influencer son mécanisme d'action. En effet, il a été montré que les petites molécules hydrophobes, libérées dans la cellule, ont la capacité de diffuser au travers de la membrane cellulaire pour aller exercer leur action toxique au sein des cellules voisines (effet "bystander"). En revanche, les petites molécules hydrophiles ou chargées restent bloquées à l'intérieur de la cellule où elles ont été délivrées<sup>51</sup>. De plus, l'hydrophobicité peut aussi avoir une influence sur les phénomènes de multirésistance aux médicaments développés par les cellules cancéreuses. En effet, il a été montré que les

---

<sup>47</sup> Tang, H. et al. *The analysis of key factors related to ADC structural design*. *Front. Pharmacol.* **10**, 1–11 (2019).

<sup>48</sup> Li, F. et al. *Intracellular released payload influences potency and bystander-killing effects of antibody-drug conjugates in preclinical models*. *Cancer Res.* **76**, 2710–2719 (2016).

<sup>49</sup> Peters, C. & Brown, S. *Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics*. *Biosci. Rep.* **35**, (2015).

<sup>50</sup> Maderna, A. et al. *Discovery of cytotoxic dolastatin 10 analogues with N-terminal modifications*. *J. Med. Chem.* **57**, 10527–10543 (2014).

<sup>51</sup> Li, F. et al. *Intracellular released payload influences potency and bystander-killing effects of antibody-drug conjugates in preclinical models*. *Cancer Res.* **76**, 2710–2719 (2016).

cytotoxiques hydrophobes sont de meilleurs substrats de MDR1 (Multi Drug Resistance 1), une glycoprotéine P (P-gp) exprimée dans certains types de cancers multirésistants et qui joue le rôle de pompe d'efflux, envoyant ainsi la molécule cytotoxique vers le milieu extracellulaire<sup>52</sup>. Dans ce contexte, c'est l'utilisation de molécules hydrophiles ou chargées qui permet d'augmenter le bénéfice thérapeutique des ADC pour traiter les cancers multirésistants.

La majorité des ADC actuellement en phase clinique utilisent des petites molécules qui sont de puissants inhibiteurs des microtubules, ou des agents qui endommagent l'ADN<sup>53</sup>. Cependant, malgré les bons résultats cliniques des ADC portant ces différentes molécules, on observe un intérêt considérable pour le développement de nouveaux agents cytotoxiques avec des mécanismes d'action alternatifs<sup>54</sup>.

Les inhibiteurs des microtubules sont des agents antimétaboliques qui inhibent le cycle de division cellulaire en bloquant la polymérisation de la tubuline, conduisant ainsi à la mort cellulaire. Les cellules cancéreuses qui se divisent rapidement sont plus sensibles aux agents antimétaboliques que les cellules saines.

Les composés de la famille des auristatines sont de puissants analogues synthétiques de la dolastatine 10, une toxine qui a été isolée chez le lièvre de mer *Dolabella Auricularia*<sup>55</sup>. Parmi eux, les monométhyle auristatine E et F (MMAE et MMAF respectivement) sont actuellement les plus utilisées dans le développement d'ADC, en raison de leur bonne stabilité et leur bonne solubilité (Figure 8). Sous sa forme non conjuguée, la MMAE présente des valeurs d'IC<sub>50</sub> inférieure à 10<sup>-9</sup> M sur plusieurs types cellulaires, tandis que les valeurs d'IC<sub>50</sub> pour la MMAF sont plus de cent fois supérieures. Cette différence importante s'explique par le fait que bien que ces deux molécules soient structurellement très proches, elle se différencie par leur extrémité C-terminal. On retrouve ainsi un résidu phénylalanine chargé négativement chez la MMAF, qui l'empêche de pénétrer dans les cellules, tandis que la MMAE, plus hydrophobe,

---

<sup>52</sup> Cianfriglia, M. *The biology of MDR1-P-glycoprotein (MDR1-Pgp) in designing functional antibody drug conjugates (ADC): the experience of gamtuzumab ozogamicin.* *Ann Ist Super Sanità* **49**, 150–168 (2013).

<sup>53</sup> Birrer, M. J., Moore, K. N., Betella, I. & Bates, R. C. *Antibody-Drug Conjugate-Based Therapeutics : State of the Science.* (2019).

<sup>54</sup> Pahl, A., Lutz, C. & Hechler, T. *Amanitins and their development as a payload for antibody-drug conjugates.* *Drug Discov. Today Technol.* **30**, 85–89 (2018).

<sup>55</sup> Maderna, A. & Leverett, C. A. *Recent advances in the development of new auristatins: Structural modifications and application in antibody drug conjugates.* *Mol. Pharm.* **12**, 1798–1812 (2015).

diffuse au travers des bicouches lipidiques<sup>56</sup>. Les propriétés de la MMAF la rendent particulièrement intéressante pour le développement d'ADC puisqu'il a été montré qu'elle est deux mille fois plus puissante lorsqu'elle est administrée sous une forme ADC, qui permet sa délivrance active à l'intérieur de la cellule, que lorsqu'elle est administrée sous une forme non conjuguée<sup>56</sup>. Une autre propriété notable de la MMAF, est que les ADC correspondants montrent une activité contre les lignées cellulaires présentant le phénotype de multirésistance aux médicaments, ce qui indique qu'elle est un moins bon substrat des pompes d'efflux que les autres auristatines<sup>57</sup>.

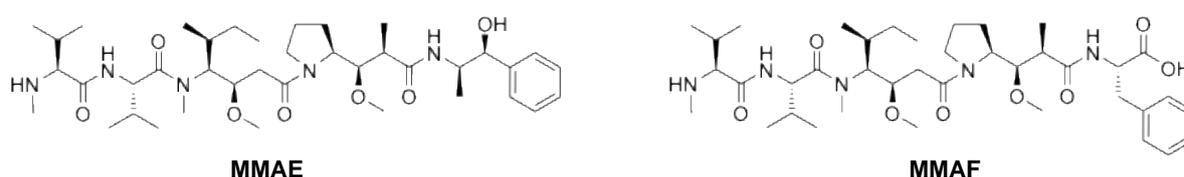


Figure 8 - Structure de la monométhyle Auristatine E (MMAE) et de la monométhyle Auristatine F (MMAF).

Comme autre classe d'inhibiteurs de la tubuline, on citera également les maytansinoïdes telles que la mertansine (DM1) et la raptansine (DM4), dérivés de la maytansine, une molécule naturelle, extraite de l'écorce de l'arbuste africain *Maytenus Ovatus*. La maytansine présente une activité antimétabolique de l'ordre du picomolaire, c'est-à-dire mille fois plus puissant que les inhibiteurs de tubuline usuels comme le paclitaxel<sup>58</sup>, DM1 et DM4 présentent, quant à eux, des IC<sub>50</sub> de 10<sup>-9</sup> à 10<sup>-11</sup> M sur certains types cellulaires<sup>59</sup> (Figure 9).

<sup>56</sup> Doronina, S. O. et al. Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: Effects of linker technology on efficacy and toxicity. *Bioconjug. Chem.* **17**, 114–124 (2006).

<sup>57</sup> Kung Sutherland, M. S. et al. Lysosomal trafficking and cysteine protease metabolism confer target-specific cytotoxicity by peptide-linked anti-CD30-auristatin conjugates. *J. Biol. Chem.* **281**, 10540–10547 (2006).

<sup>58</sup> Lopus, M. et al. Maytansine and cellular metabolites of antibody-maytansinoid conjugates strongly suppress microtubule dynamics by binding to microtubules. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 2689–2699 (2010).

<sup>59</sup> Widdison, W. C. et al. Semisynthetic Maytansine analogues for the targeted treatment of cancer. *J. Med. Chem.* **49**, 4392–4408 (2006).

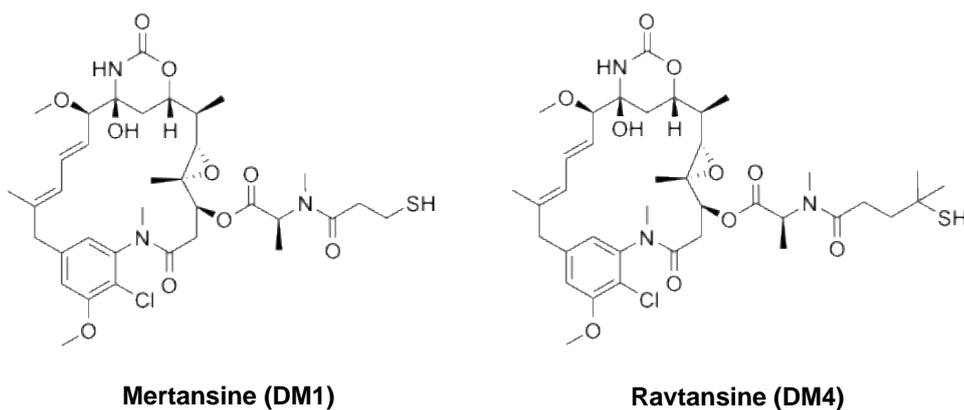


Figure 9 - Structure de la mertansine (DM1) et de la ravtansine (DM4).

Plus récemment, les tubulysines sont apparues comme une nouvelle classe d'agents antimitotiques prometteurs. Ces pseudo-tétrapeptides de structure complexe, sont parmi les plus puissants inhibiteurs de la division cellulaire décrits jusqu'à présent, avec notamment, une forte activité contre les cancers multirésistants<sup>60</sup>. Actuellement, plusieurs ADC incorporant la tubulysine D, l'un des plus puissants cytotoxiques de cette famille ( $IC_{50}$ :  $10^{-10}$  M), sont en cours de développement. Bien que la tubulysine peut être directement conjugué *via* son amine tertiaire en formant un ammonium quaternaire<sup>61</sup>, des analogues hydroxyle ou amine primaire ont été développés pour faciliter la conjugaison à l'anticorps<sup>62</sup> (Figure 10).

<sup>60</sup> Murray, B. C., Peterson, M. T. & Fecik, R. A. Chemistry and biology of tubulysins: Antimitotic tetrapeptides with activity against drug resistant cancers. *Nat. Prod. Rep.* **32**, 654–662 (2015).

<sup>61</sup> Staben, L. R. et al. Stabilizing a Tubulysin Antibody-Drug Conjugate to Enable Activity Against Multidrug-Resistant Tumors. *ACS Med. Chem. Lett.* **8**, 1037–1041 (2017).

<sup>62</sup> Nathan Tumey, L. et al. Optimization of Tubulysin Antibody-Drug Conjugates: A Case Study in Addressing ADC Metabolism. *ACS Med. Chem. Lett.* **7**, 977–982 (2016).

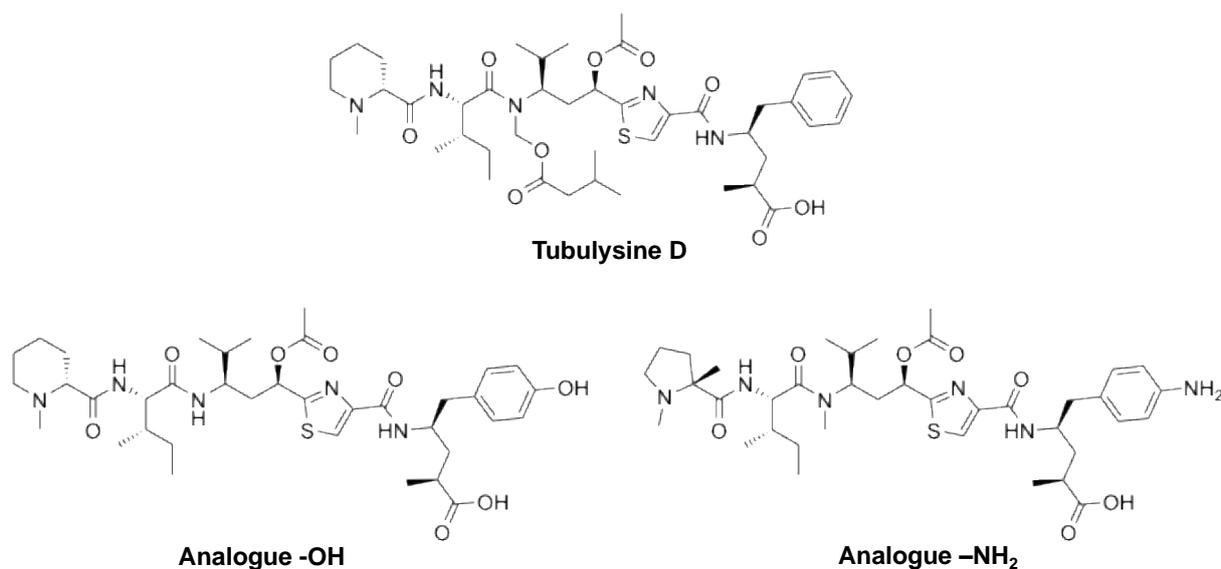


Figure 10 - Structure de la tubulysine D et de ses analogues hydroxyle et amine primaire.

Dans un but d'élargir le champ d'action des ADC aux cancers résistants aux agents antimétaboliques, les efforts se sont concentrés sur le développement d'agents cytotoxiques interagissant avec la molécule d'ADN<sup>63</sup>. Ces agents exercent leur action cytotoxique en s'intercalant au niveau du petit sillon de la double hélice de l'ADN, entraînant des dommages irréversibles conduisant à la mort cellulaire<sup>64</sup>.

La N-acétyl-calichéamicine ( $IC_{50} : 10^{-8}$ - $10^{-9}$  M), un antibiotique antitumoral dérivé de l'enediène, a été utilisé pour le développement du premier ADC (Figure 11A). Ce cytotoxique génère une cassure double brin de la molécule d'ADN conduisant à l'arrêt de la réplication et à la mort cellulaire<sup>65</sup>. Plus récemment, ce sont les agents alkylants capables de se lier de manière irréversible à la molécule d'ADN qui ont été introduits dans le développement d'ADC. Parmi ces agents, on retrouve le DUBA et le MGBA ( $IC_{50} : 10^{-8}$ - $10^{-9}$  M) deux analogues de la duocarmycine,

<sup>63</sup> Birrer, M. J., Moore, K. N., Betella, I. & Bates, R. C. *Antibody-Drug Conjugate-Based Therapeutics : State of the Science.* (2019).

<sup>64</sup> Khongorzul, P., Ling, C. J., Khan, F. U., Ihsan, A. U. & Zhang, J. *Antibody-drug conjugates: A comprehensive review. Molecular Cancer Research* vol. 18 (2020).

<sup>65</sup> Hinman, L. M. et al. *Preparation and Characterization of Monoclonal Antibody Conjugates of the Calicheamicins: A Novel and Potent Family of Antitumor Antibiotics. Cancer Res.* **53**, 3336–3342 (1993).

un dérivé de produit naturel extrait des souches de *Streptomyces* (Figure 11B)<sup>66</sup>, ainsi que les dimères de pyrrolobenzodiazépines (PBD) (IC<sub>50</sub> : 10<sup>-11</sup>-10<sup>-12</sup> M), des produits naturels fabriqués par divers actinomycètes (Figure 11C)<sup>67</sup>, et les pseudodimères d'indolinobenzodiazépine (IGN) (IC<sub>50</sub> : 10<sup>-12</sup> M), une classe de cytotoxiques apparentés (Figure 11D)<sup>68</sup>. Ces derniers peuvent être synthétisés sous forme de mono- ou de di-imine qui agissent respectivement comme agent alkylant ou réticulant de l'ADN.

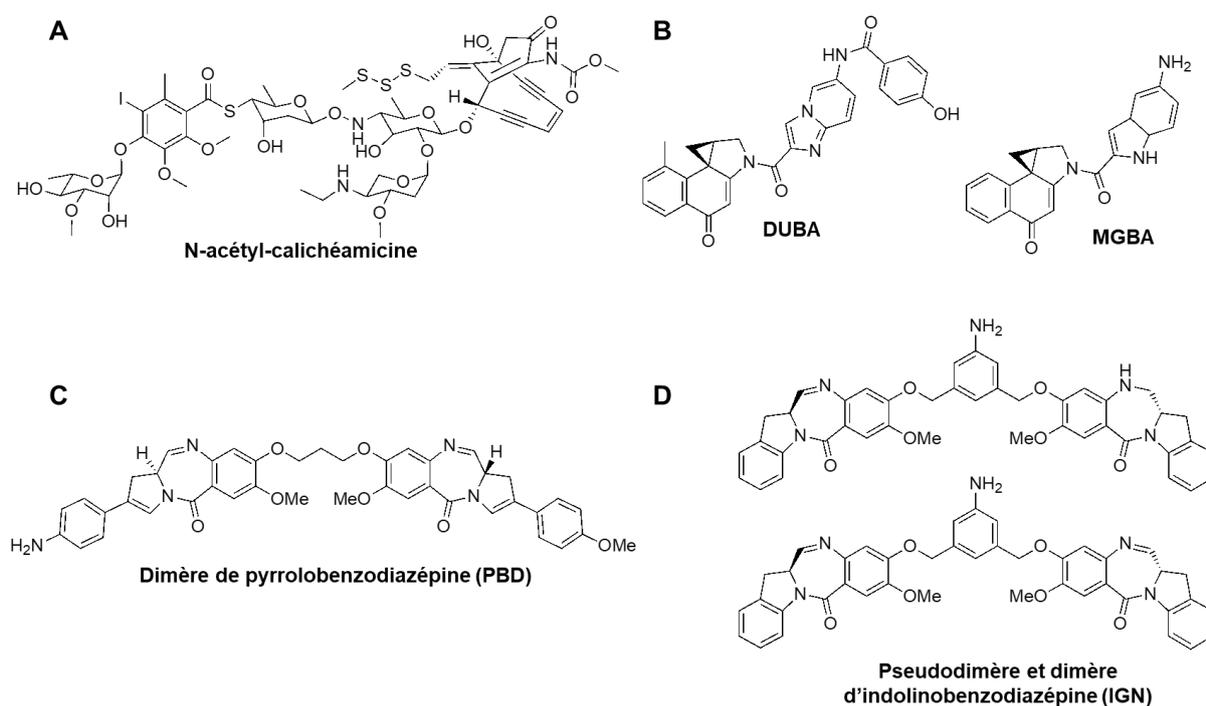


Figure 11 – Structures des différents agents interagissant avec la molécule d'ADN. La N-acétyl-calichéamicine (A), les analogues de la duocarmycine DUBA et MGBA (B), les dimères de pyrrolobenzodiazépine (C) et les pseudodimères d'indolinobenzodiazépine (D).

Dans le but de contourner les différents mécanismes de résistance qui se développent contre les cytotoxiques actuels, et d'avoir un spectre antitumoral plus large, de nombreux efforts ont

<sup>66</sup> Menderes, G. et al. SYD985, a novel Duocarmycin-Based HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate, shows Promising Antitumor Activity in Epithelial Ovarian Carcinoma with HER2/Neu Expression. *Gynecol Oncol.* **146**, 179–186 (2017).

<sup>67</sup> Mantaj, J., Jackson, P. J. M., Rahman, K. M. & Thurston, D. E. From Anthramycin to Pyrrolobenzodiazepine (PBD)-Containing Antibody–Drug Conjugates (ADC). *Angew. Chemie - Int. Ed.* **56**, 462–488 (2017).

<sup>68</sup> Singh, R. et al. Antibody-Drug Conjugates with Indolinobenzodiazepine Dimer Payloads: DNA-Binding Mechanism of Indolinobenzodiazepine Dimer Catabolites in Target Cancer Cells. *Mol. Pharm.* **17**, 50–58 (2020).

été faits dans le développement de nouveaux agents cytotoxiques. Par exemple le DXd (Figure 12), un analogue de la camptothécine, un alcaloïde isolé de l'arbre chinois *Camptotheca cuminata*, est un puissant inhibiteur de la topoisomérase I ( $IC_{50} : 10^{-12}$  M), capable de former un complexe stable avec l'enzyme et le brin d'ADN<sup>69</sup>. Cette molécule a été incorporée avec succès dans plusieurs ADC<sup>70</sup>.

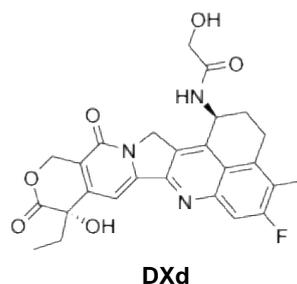


Figure 12 - Structure de l'inhibiteur de topoisomérase DXd.

#### 1.2.4 Le linker synthétique

Bien qu'il s'agisse d'un concept simple à première vue, le linker synthétique joue un rôle bien plus complexe que celui d'un simple lien entre l'anticorps à la molécule cytotoxique ; c'est un composant structurel et fonctionnel essentiel d'un ADC<sup>71</sup>. Le linker doit être stable en circulation pour maintenir la molécule cytotoxique sous une forme de prodrogue inactive, tout en permettant une libération efficace après internalisation du conjugué<sup>72</sup>. Le clivage non spécifique d'un linker avant d'atteindre sa cible conduirait à la libération de la petite molécule pendant la phase de circulation, qui induirait une augmentation de la toxicité pour les tissus sains. En fonction de leur mécanisme de libération, les linkers peuvent être classés en deux groupes distincts : les linkers clivables et les linkers non-clivables.

---

<sup>69</sup> Ogitani, Y. et al. DS-8201a, a novel HER2-targeting ADC with a novel DNA topoisomerase I inhibitor, demonstrates a promising antitumor efficacy with differentiation from T-DM1. *Clin. Cancer Res.* **22**, 5097–5108 (2016).

<sup>70</sup> Modi, S. et al. Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **382**, 610–621 (2020).

<sup>71</sup> Tang, H. et al. The analysis of key factors related to ADC structural design. *Front. Pharmacol.* **10**, 1–11 (2019).

<sup>72</sup> Khongorzul, P., Ling, C. J., Khan, F. U., Ihsan, A. U. & Zhang, J. Antibody-drug conjugates: A comprehensive review. *Molecular Cancer Research* vol. 18 (2020).

#### 1.2.4.1 Les linkers clivables

Les linkers clivables sont caractérisés par la présence d'un site de coupure entre l'anticorps et la petite molécule, et constituent la principale classe de linkers utilisés dans le développement d'ADC. Ces linkers utilisent différents mécanismes de libération du cytotoxique : ils peuvent être clivés chimiquement lors d'un changement environnemental (pH ou potentiel redox), ou par l'action-d'enzymes spécifiques<sup>73</sup>.

Les linkers acido-labiles ont été les premiers linkers clivables à avoir été utilisés dans le développement d'ADC (Figure 13A). Ils sont conçus pour rester intacts dans un environnement neutre, tel que la circulation sanguine (pH=7,4), et pour libérer le cytotoxique uniquement à pH acide, comme par exemple dans les endosomes (pH=5,5) ou les lysosomes (pH=4,5), après internalisation du conjugué. Parmi ce type de linker, on retrouve le linker de type hydrazone<sup>74</sup>, qui est le plus connu et le plus communément utilisé, mais aussi le linker de type carbonate<sup>75</sup>. En raison de clivages non spécifiques de ces linkers par des protéases plasmatiques<sup>76</sup>, un linker acido-labile incorporant une fonction éther de silyle a été plus récemment développé<sup>77</sup>.

---

<sup>73</sup> Khongorzul, P., Ling, C. J., Khan, F. U., Ihsan, A. U. & Zhang, J. *Antibody-drug conjugates: A comprehensive review. Molecular Cancer Research* vol. 18 (2020).

<sup>74</sup> Lamb, Y. N. *Inotuzumab Ozogamicin: First Global Approval. Drugs* **77**, 1603–1610 (2017).

<sup>75</sup> Cardillo, T. M., Govindan, S. V., Sharkey, R. M., Trisal, P. & Goldenberg, D. M. *Humanized anti-trop-2 IgG-SN-38 conjugate for effective treatment of diverse epithelial cancers: Preclinical studies in human cancer xenograft models and monkeys. Clin. Cancer Res.* **17**, 3157–3169 (2011).

<sup>76</sup> Senter, P. D. *Potent antibody drug conjugates for cancer therapy. Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 235–244 (2009).

<sup>77</sup> Wang, Y. et al. *Novel Silyl Ether-Based Acid-Cleavable Antibody-MMAE Conjugates with Appropriate Stability and Efficacy. Cancers (Basel).* **11**, (2019).

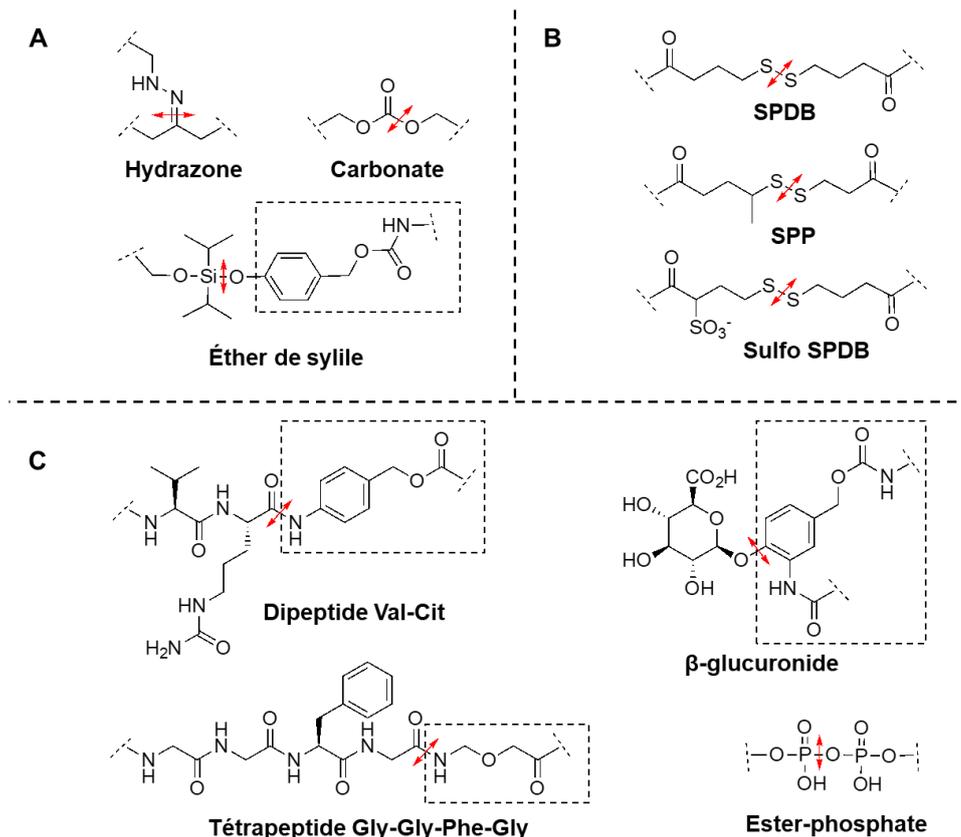


Figure 13 - Structure des différents linkers clivables. (A) les linkers acido-labiles. (B) les linkers sensibles au potentiel redox. (C) les linkers sensibles aux protéases. La flèche rouge représente le site de clivage et l'espaceur auto-immolable est encadré en pointillé noir.

Les linkers sensibles au potentiel redox, tels que les linkers disulfures, tirent parti de la différence de potentiel entre le plasma et le compartiment intracellulaire. De plus, la concentration en glutathion réduit (GSH) à l'intérieur des cellules cancéreuses est mille fois supérieure à la concentration cytoplasmique dans les cellules saines<sup>78</sup>. Les linkers disulfures de type SPDB (alkyl hydrophobe), SPP (alkyl substitué hydrophobe, mais plus stable), et Sulfo-SPDB (chargé négativement, plus hydrophile) sont les plus utilisés (Figure 13B), majoritairement pour la conjugaison des maytansinoïdes<sup>79</sup>.

Les linkers sensibles aux protéases lysosomales, également appelés linkers peptidiques sont les plus utilisés dans le développement d'ADC. Ils peuvent se présenter sous la forme d'un

<sup>78</sup> Leung, D. et al. *Antibody Conjugates-Recent Advances and Future Innovations*. *Antibodies* **9**, 2 (2020).

<sup>79</sup> Erickson, H. K. et al. *Antibody-maytansinoid conjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing*. *Cancer Res.* **66**, 4426–4433 (2006).

dipeptide<sup>80</sup> (Val-Cit, le plus utilisé) ou d'un tétrapeptide (Gly-Gly-Phe-Gly)<sup>81</sup> (Figure 13C). La séquence peptidique porte un espaceur auto-immolable qui est activé lors de la protéolyse et qui permet la libération du cytotoxique. Initialement il a été reporté que c'est la protéase lysosomale cathépsine B, surexprimée dans un certain nombre de cancers, qui reconnaît spécifiquement ces motifs peptidiques et qui vient hydrolyser la liaison amide en C-terminal<sup>82</sup>. Cependant, il a depuis été montré que l'activité de la cathépsine B n'est pas indispensable, suggérant ainsi que plusieurs protéases seraient impliquées dans ce mécanisme de libération<sup>83</sup>. Les linkers peptidiques présentent une bien meilleure stabilité plasmatique que les linkers chimiquement clivables, avec une demi-vie d'environ sept à dix jours qui peut être allongée jusqu'à plus de quatorze jours en utilisant le motif Glu-Val-Cit<sup>84</sup>.

Les  $\beta$ -glucuronides<sup>85</sup> et les ester-phosphates<sup>86</sup> sont deux autres types de linkers clivables par des enzymes (Figure 13C), qui sont reconnus et hydrolysés spécifiquement par la  $\beta$ -glucuronidase et la pyrophosphatase respectivement. Ces deux enzymes sont également présentes à haute concentration dans les lysosomes des cellules cancéreuses, pour permettre la libération intracellulaire du cytotoxique après internalisation de l'ADC. En plus de leur très bonne stabilité plasmatique, les  $\beta$ -glucuronides et les ester-phosphates ont un caractère hydrophile qui peut contrebalancer l'hydrophobicité de certains cytotoxiques et diminuer l'agrégation des ADC<sup>87</sup>.

---

<sup>80</sup> Dubowchik, G. M. & I, R. A. F. *Cathepsin B-sensitive dipeptide prodrugs*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 3341–3346 (1998).

<sup>81</sup> Zhong, Y. J., Shao, L. H. & Li, Y. *Cathepsin B-cleavable doxorubicin prodrugs for targeted cancer therapy (Review)*. *Int. J. Oncol.* **42**, 373–383 (2013).

<sup>82</sup> Dubowchik, G. M. et al. *Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: Model studies of enzymatic drug release and antigen-specific in vitro anticancer activity*. *Bioconjug. Chem.* **13**, 855–869 (2002).

<sup>83</sup> Caculitan, N. G. et al. *Cathepsin B is dispensable for cellular processing of cathepsin B-cleavable antibody–drug conjugates*. *Cancer Res.* **77**, 7027–7037 (2017).

<sup>84</sup> Anami, Y. et al. *Glutamic acid-valine-citrulline linkers ensure stability and efficacy of antibody-drug conjugates in mice*. *Nat. Commun.* **9**, (2018).

<sup>85</sup> Jeffrey, S. C. et al. *Development and properties of  $\beta$ -glucuronide linkers for monoclonal antibody-drug conjugates*. *Bioconjug. Chem.* **17**, 831–840 (2006).

<sup>86</sup> Kern, J. C. et al. *Discovery of Pyrophosphate Diesters as Tunable, Soluble, and Bioorthogonal Linkers for Site-Specific Antibody-Drug Conjugates*. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 1430–1445 (2016).

<sup>87</sup> Bargh, J. D., Isidro-Llobet, A., Parker, J. S. & Spring, D. R. *Cleavable linkers in antibody-drug conjugates*. *Chem. Soc. Rev.* **48**, 4361–4374 (2019).

#### 1.2.4.2 Les linkers non-clivables

Dans le cas des linkers non-clivables (Figure 14), qui ne comportent aucun site de coupure, le mécanisme de libération de la petite molécule n'est basé que sur la dégradation protéolytique de l'ADC dans les lysosomes, après internalisation<sup>88</sup>. L'espèce alors libérée n'est pas la molécule seule, comme dans le cas d'un linker clivable, mais le métabolite linker-cytotoxique lié à au moins un acide aminé<sup>89</sup>. L'avantage majeur de ce type de linker est qu'ils offrent une plus grande stabilité dans la circulation sanguine, limitant ainsi la libération non spécifique du cytotoxique et la toxicité dans les tissus sains. Cependant, la libération de la petite molécule sous une forme liée à son linker et au premier acide aminé change ses propriétés physicochimiques. En effet, ce métabolite devient plus hydrophile que la molécule seule, ce qui limite sa capacité à diffuser au travers des membranes lipidiques<sup>89</sup>. Par conséquent, l'utilisation de linkers non-clivables n'est pas adaptée aux molécules pour lesquelles l'effet "bystander" est essentiel à leur efficacité thérapeutique. Par exemple, il a été montré que la conjugaison de la molécule hydrophobe MMAE à un linker non clivable diminuait sa cytotoxicité<sup>90</sup>, tandis que l'activité de son analogue MMAF, naturellement plus hydrophile, n'était pas impactée par la nature clivable ou-non clivable du linker<sup>91</sup>. A l'inverse, il a été montré qu'un ADC incorporant la mertansine (DM1) sous la forme d'un thio-éther non clivable (SMCC) présentait un meilleur bénéfice thérapeutique que son analogue contenant un linker clivable disulfure<sup>92</sup>.

---

<sup>88</sup> Birrer, M. J., Moore, K. N., Betella, I. & Bates, R. C. *Antibody-Drug Conjugate-Based Therapeutics : State of the Science*. (2019).

<sup>89</sup> Khongorzul, P., Ling, C. J., Khan, F. U., Ihsan, A. U. & Zhang, J. *Antibody-drug conjugates: A comprehensive review*. *Molecular Cancer Research* vol. 18 (2020).

<sup>90</sup> McCombs, J. R. & Owen, S. C. *Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry*. *AAPS J.* **17**, 339–351 (2015).

<sup>91</sup> Doronina, S. O. et al. *Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: Effects of linker technology on efficacy and toxicity*. *Bioconjug. Chem.* **17**, 114–124 (2006).

<sup>92</sup> Lewis Phillips, G. D. et al. *Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate*. *Cancer Res.* **68**, 9280–9290 (2008).



Figure 14 - Structure des linkers non-clivables les plus utilisés.

Bien que chaque type de linker présente des avantages et des inconvénients différents, ceux-ci dépendent majoritairement des autres composants de l'ADC, et notamment de la petite molécule (Tableau 2). Ainsi, le choix du linker doit se faire au cas par cas, sur la base de l'évaluation de la toxicité et de l'efficacité propre à chaque ADC.

Molécule cytotoxique	Mode d'action	Linker associé	Métabolite active	Effet "bystander"	IC <sub>50</sub>
MMAE	Blocage du fuseau mitotique	Val-Cit	MMAE	Oui	10 <sup>-10</sup> M
MMAF	Blocage du fuseau mitotique	Val-Cit	MMAF	Non	10 <sup>-11</sup> M
		MC	Cys-MC-MMAF	Non	10 <sup>-11</sup> M
DM1	Blocage du fuseau mitotique	SPP	DM1	Oui	10 <sup>-10</sup> M
		SMCC	Lys-MCC-DM1	Non	10 <sup>-11</sup> M
		MC	Cys-MC-DM1	Non	10 <sup>-10</sup> M
DM4	Blocage du fuseau mitotique	SPDB	DM4	Oui	10 <sup>-10</sup> M
		Sulfo-SPDB	DM4	Oui	10 <sup>-10</sup> M
Tubulysine	Blocage du fuseau mitotique	Val-Cit	Tubulysine	Non	10 <sup>-10</sup> M
Calichéamicine	Cassure double brin de l'ADN	Hydrazone	Calichéamicine	Oui	10 <sup>-9</sup> M
Duocarmycine	Alkylation de l'ADN	Val-Cit	Duocarmycine	Oui	10 <sup>-9</sup> M
PBDs	Alkylation de l'ADN	Val-Cit	PBDs	Oui	10 <sup>-11</sup> M

IGNs	Alkylation ou réticulation de l'ADN	Val-Cit	IGNs	Oui	10 <sup>-12</sup> M
DXd	Inhibition de la topoisomérase I	Gly-Gly-Phe-Gly	DXd	Oui	10 <sup>-12</sup> M

Tableau 2 - Combinaisons de linker et de molécule cytotoxique les plus courantes dans le développement d'ADC.

### 1.3 UN DESIGN OPTIMISÉ POUR UN MEILLEUR BÉNÉFICE THÉRAPEUTIQUE

L'idée de conjuguer de manière covalente un anticorps à une petite molécule thérapeutique pour en améliorer son bénéfice thérapeutique n'est pas une idée récente. C'est en 1900 que Paul Ehrlich a imaginé le concept de "magic bullet", capable de soigner spécifiquement sans causer de dommages au reste de l'organisme<sup>93</sup>. Néanmoins, ce n'est qu'environ soixante ans plus tard que le concept de Paul Ehrlich a été exemplifié pour la première fois, avec le développement du premier ADC à partir d'anticorps polyclonaux murins<sup>94</sup>. De nombreux progrès en génie génétique et en biologie moléculaire, ont été nécessaires avant de réussir à produire de manière recombinante des anticorps chimériques, humanisés, ou humains et que le premier ADC (Mylotarg®) soit accepté par la FDA en 2000<sup>95</sup>, presque 100 ans après les travaux de Paul Ehrlich. Cependant, la fenêtre thérapeutique de ces ADC de première génération reste insuffisante, c'est pourquoi, de nombreuses améliorations ont été faites avec le développement des ADC de deuxième et de troisième génération afin d'améliorer le bénéfice thérapeutique et de diminuer la toxicité des ADC<sup>96</sup> (Figure 15). Au-delà du choix de l'antigène cible, de l'anticorps, du linker et de la molécule cytotoxique, des paramètres tels que le mode

<sup>93</sup> Strebhardt, K. & Ullrich, A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 Years of progress. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 473–480 (2008).

<sup>94</sup> Perez, H. L. et al. Antibody-drug conjugates: Current status and future directions. *Drug Discov. Today* **19**, 869–881 (2014).

<sup>95</sup> Bross, P. F. et al. Approval summary: Gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* **7**, 1490–1496 (2001).

<sup>96</sup> Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C. & Corvaia, N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 315–337 (2017).

et le site de conjugaison ainsi que le nombre de petites molécules par anticorps (DAR pour Drug to Antibody Ratio) ont un rôle fondamental dans les profils d'efficacité et de toxicité des ADC<sup>97</sup>.

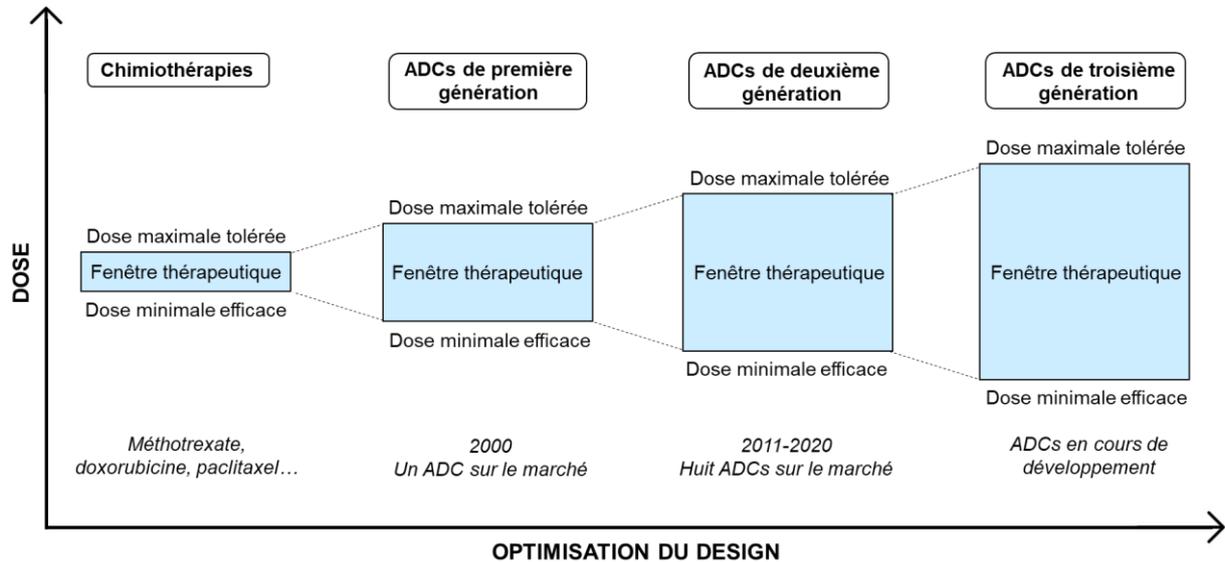


Figure 15 - L'optimisation du design des ADC permet l'augmentation de la fenêtre thérapeutique.

### 1.3.1 Les ADC de première génération

#### 1.3.1.1 Vers la mise sur le marché du premier ADC

C'est après 1975, à la suite du développement des hybridomes qui permettent la production d'anticorps murins<sup>98</sup>, qu'a été développée la première génération d'ADC. Ces ADC ont été obtenus par la conjugaison d'agents chimio thérapeutiques conventionnels (méthotrexate, doxorubicine...) à des anticorps dans un premier temps murins<sup>99</sup>. C'est en 1983 qu'ont eu lieu les premières études cliniques chez l'homme d'un ADC incorporant une molécule

<sup>97</sup> Khongorzul, P., Ling, C. J., Khan, F. U., Ihsan, A. U. & Zhang, J. *Antibody-drug conjugates: A comprehensive review. Molecular Cancer Research* vol. 18 (2020).

<sup>98</sup> KÖHLER, G., MILSTEIN, C. *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature* **256**, 495–497 (1975).

<sup>99</sup> Elias, D. J. et al. *Monoclonal antibody KS 1/4 -methotrexate immunoconjugate studies in non- small cell lung carcinoma. Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **150**, 1114–1122 (1994).

cytotoxique<sup>100</sup>. Le succès très limité de ces études, a permis de reconnaître rapidement que l'usage des anticorps murins était inadapté à un usage thérapeutique chez l'Homme, en raison de leur trop forte immunogénicité.

L'arrivée des anticorps chimériques et humanisés à partir des années 1990 a permis le développement de nouveaux ADC moins immunogènes, accompagné de l'introduction des premiers linkers clivables de type hydrazone. Un exemple est le BR96-DOX, obtenu par conjugaison de la doxorubicine *via* un linker hydrazone à un anticorps chimérique, dans le traitement des carcinomes<sup>101</sup>. Bien qu'une activité curative ait été observée dans des modèles de xénogreffes, la puissance relativement faible de la doxorubicine ( $IC_{50} : 10^{-6} M$ ) a nécessité de très fortes doses injectées pour observer une activité thérapeutique, et donc un mauvais profil de tolérance.

Des avancées supplémentaires, telles que l'utilisation de plus puissants cytotoxiques, ont conduit à l'approbation par la FDA du premier ADC. Le gemtuzumab ozogamicine (Mylotarg<sup>®</sup>) développé par Pfizer, est une combinaison du cytotoxique calichéamicine conjugué à un anticorps humanisé anti-CD33 *via* un linker hydrazone (Figure 16). Son activité thérapeutique supérieure aux agents chimio thérapeutiques a été prouvée, conduisant à sa mise sur le marché en 2000 pour le traitement de personnes âgées atteintes d'une leucémie myéloïde aiguë<sup>102</sup>. Cependant, des études post-approbation ont montré que le bénéfice thérapeutique n'était que limité ; mais surtout qu'il était accompagné d'une forte toxicité, ce qui a entraîné le retrait volontaire de l'ADC par Pfizer en 2010. Le Mylotarg<sup>®</sup> a ensuite bénéficié du savoir accumulé en clinique ces dernières années pour être réapprouvé par la FDA en 2017, à une dose plus faible, en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques et pour une population différente de patients<sup>103</sup>.

---

<sup>100</sup> Ford, C. H. J. et al. Localisation and toxicity study of a vindesine-anti-CEA conjugate in patients with advanced cancer. *Br. J. Cancer* **47**, 35–42 (1983).

<sup>101</sup> Firestone, R. A. et al. Synthesis and antitumor activity of the immunoconjugate BR96-Dox. *J. Control. Release* **39**, 251–259 (1996).

<sup>102</sup> Bross, P. F. et al. Approval summary: Gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* **7**, 1490–1496 (2001).

<sup>103</sup> Norsworthy, K. J. et al. FDA Approval Summary: Mylotarg for Treatment of Patients with Relapsed or Refractory CD33-Positive Acute Myeloid Leukemia. *Oncologist* **23**, 1103–1108 (2018).

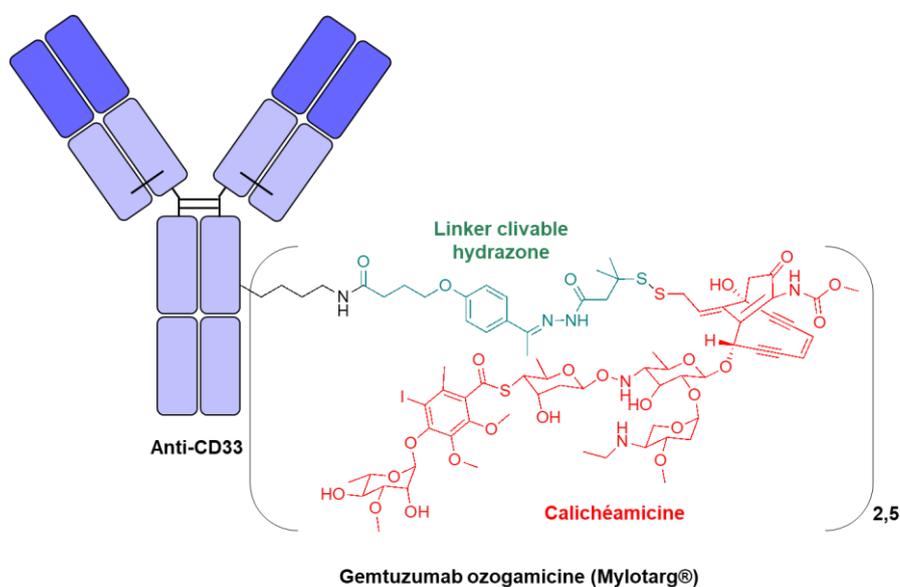


Figure 16 - Structure de Mylotarg® (gemtuzumab ozogamicine).

### 1.3.1.2 Les leçons à retenir des ADC de première génération

Après que la première génération d'ADC ait provoqué des effets indésirables aigus et une augmentation de la mortalité chez les patients, plusieurs paramètres incontournables dans le développement des ADC ont été mis en évidence.

Tout d'abord, les premiers ADC ont permis de montrer que la nature de l'anticorps est essentielle. En effet, l'utilisation d'anticorps murins entraîne une réponse immunitaire qui empêche une exposition répétée de l'ADC aux patients limitant ainsi son efficacité<sup>104</sup>. La puissance de la petite molécule associée à l'anticorps est également importante. Les agents chimio thérapeutiques conventionnels ne sont pas assez puissants pour avoir une activité thérapeutique à la faible dose qui est délivrée au sein du tissu pathologique, et une valeur d'IC<sub>50</sub> de l'ordre du nanomolaire est nécessaire<sup>105</sup>.

<sup>104</sup> Perez, H. L. et al. *Antibody-drug conjugates: Current status and future directions. Drug Discov. Today* **19**, 869–881 (2014).

<sup>105</sup> Li, F. et al. *Intracellular released payload influences potency and bystander-killing effects of antibody-drug conjugates in preclinical models. Cancer Res.* **76**, 2710–2719 (2016).

La faible efficacité de Mylotarg® a été associée à deux paramètres : le choix de la cible et le mode de conjugaison. Bien que CD33 soit une protéine transmembranaire exprimée chez 90% des patients atteints de leucémie myéloïde aiguë, son niveau d'expression est plutôt faible et son processus d'internalisation est très lent, ce qui contribue à une quantité réduite de molécules délivrées sur site<sup>106</sup>. De plus, le Mylotarg® est un mélange hétérogène d'ADC présentant un DAR moyen de 2,5 et contenant approximativement 50% d'anticorps non conjugués (DAR 0)<sup>107</sup>. Cet anticorps libre joue un rôle de compétiteur dans la liaison à l'antigène, et contribue à diminuer la quantité de cytotoxique délivrée à la tumeur. De plus, le gemtuzumab est un anticorps de type IgG4 qui ne possède aucune fonction effectrice, et qui n'intervient donc pas dans le mode d'action cytotoxique. Par ailleurs, la toxicité aiguë de Mylotarg®, a été corrélée d'une part à la présence de l'antigène CD33 à la surface des cellules hématopoïétiques normales, ce qui entraîne la délivrance du cytotoxique au sein des cellules saines, et d'autre part à la faible stabilité du linker hydrazone en circulation, qui entraîne une délivrance prématurée de la petite molécule<sup>108</sup>.

### 1.3.2 Les ADC de deuxième génération

#### 1.3.2.1 La mise sur le marché de huit nouveaux ADC

Les limitations et les échecs des ADC de première génération ont été surmontés lors du développement des ADC de deuxième génération. Le problème de la libération prématurée du cytotoxique a été résolu par l'introduction des linkers clivables de type peptidique (dipeptide et térapeptide), ainsi que des linkers non-clivables<sup>109</sup>. Les molécules cytotoxiques les plus

---

<sup>106</sup> Norsworthy, K. J. et al. FDA Approval Summary: Mylotarg for Treatment of Patients with Relapsed or Refractory CD33-Positive Acute Myeloid Leukemia. *Oncologist* **23**, 1103–1108 (2018).

<sup>107</sup> Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C. & Corvaia, N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 315–337 (2017).

<sup>108</sup> Castaigne, S. Why is it so difficult to use gemtuzumab ozogamicin. *Insid. blood* **121**, 2363–2364 (2013).

<sup>109</sup> Leung, D. et al. Antibody Conjugates-Recent Advances and Future Innovations. *Antibodies* **9**, 2 (2020).

utilisées dans les ADC de deuxième génération sont les auristatines<sup>110</sup> et les maytansinoïdes<sup>111</sup>, mille fois plus puissantes que l'intercalant de l'ADN doxorubicine. Ainsi huit ADC de seconde génération ont été mis sur le marché entre 2011 et 2020 (Tableau 3).

### 1.3.2.2 Les leçons à retenir des ADC de deuxième génération

L'index thérapeutique a été nettement amélioré entre les ADC de première et de deuxième génération, mais celui-ci reste toujours modéré. Ainsi, bien que la proportion d'anticorps non-conjugués ait été considérablement diminuée, l'ADC correspond encore à un mélange très hétérogène, avec des conséquences négatives sur ses propriétés thérapeutiques<sup>112</sup>. En effet, les ADC de seconde génération sont préparés par des méthodes stochastiques de conjugaison chimique générant des ADC possédant différents DARs, et des conjugués régioisomères ayant le même DAR<sup>113</sup>.

Dans le cas de la conjugaison des lysines, une étude a montré que la modification d'une IgG avec un ester succinimide génère une population d'ADC avec un DAR allant de zéro à six, et pour lesquels au moins quarante des quatre-vingt-six résidus lysines que contient une IgG ont été modifiés<sup>114</sup> (Figure 17). Un tel mélange contient plus de quatre millions et demi de molécules uniques. Il a également été montré que n'importe quel résidu lysine de la chaîne lourde et de la chaîne légère, ainsi que l'amine N-terminal des deux chaînes peuvent être modifiés<sup>120</sup>. Dans ce contexte, les résidus contenus dans les CDRs qui constituent l'épitope d'interaction peuvent également être modifiés, ce qui affecte la capacité de liaison à l'antigène.

---

<sup>110</sup> Maderna, A. et al. Discovery of cytotoxic dolastatin 10 analogues with N-terminal modifications. *J. Med. Chem.* **57**, 10527–10543 (2014)

<sup>111</sup> Lopus, M. et al. Maytansine and cellular metabolites of antibody-maytansinoid conjugates strongly suppress microtubule dynamics by binding to microtubules. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 2689–2699 (2010).

<sup>112</sup> Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C. & Corvaia, N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 315–337 (2017).

<sup>113</sup> Agarwal, P. & Bertozzi, C. R. Site-specific antibody-drug conjugates: The nexus of bioorthogonal chemistry, protein engineering, and drug development. *Bioconjug. Chem.* **26**, 176–192 (2015).

<sup>114</sup> Wang, L., Amphlett, G., Blättler, W. A., Lambert, J. M. & Zhang, W. Structural characterization of the maytansinoid-monoclonal antibody immunoconjugate, huN901-DM1, by mass spectrometry. *Protein Sci.* **14**, 2436–2446 (2005).

ADC	DATE D'APPROBATION	INDICATION	ANTIGÈNE CIBLE	ANTICORPS	LINKER	MOLÉCULE CYTOTOXIQUE	CONJUGAISON	DAR MOYEN
ADCETRIS®	2011	Lymphome hodgkinien et lymphome anaplasique	CD30	IgG1 chimérique	Val-Cit (clivable)	MMAE	Cystéine	4
KADCYLA®	2013	Cancer du sein métastatique HER2-positif	HER2	IgG1 humanisé	SMCC (non-clivable)	DM1	Lysine	3,5
BESPONSA®	2017	Leucémie lymphoblastique aiguë	CD22	IgG4 humanisé	Hydrazone (clivable)	Calichéamicine	Lysine	6
POLIVY®	2019	Lymphome diffus à grandes cellules B	CD79b	IgG1 humanisé	Val-Cit (clivable)	MMAE	Cystéine	4
ENHERTU®	2019	Cancer du sein métastatique HER2-positif	HER2	IgG1 humanisé	Gly-Gly-Phe-Gly (clivable)	DXd	Cystéine	7,5
PADCEV®	2019	Cancer urothélial localement avancé ou métastatique	Nectine-4	IgG1 humain	Val-Cit (clivable)	MMAE	Cystéine	3,8
TRODELVY®	2020	Cancer du sein triple négatif	Trop-2	IgG1 humanisé	Carbonate (clivable)	SN-38	Cystéine	7,6
BLENREP®	2020	Myélome multiple en rechute ou réfractaire	BCMA	IgG1 humanisé	MC (non-clivable)	MMAF	Cystéine	4

Tableau 3 – Les huit ADC de deuxième génération qui ont été approuvés par la FDA entre 2011 et 2020.

Par comparaison avec la conjugaison sur les résidus lysines, celle réalisée sur les résidus cystéines permet une diminution de l'hétérogénéité au sein du mélange d'ADC. La structure des IgGs1 et des IgGs4 - les deux sous-types utilisés dans le développement d'ADC - ne contient que trente-deux résidus cystéines, répartis en douze ponts disulfures intra-chaîne et quatre ponts disulfures inter-chaînes<sup>115</sup>. Les quatre ponts inter-chaînes sont plus accessibles, plus sensibles aux agents réducteurs, et libèrent huit positions réactives vis-à-vis de la conjugaison<sup>119</sup>, c'est-à-dire environ dix fois moins que dans le cas des lysines (Figure 17). La réduction et l'alkylation des cystéines a cependant certaines limites, pouvant entraîner une perte du lien covalent entre certaines différentes chaînes<sup>119</sup> conduisant à une déstabilisation de la structure de l'anticorps.

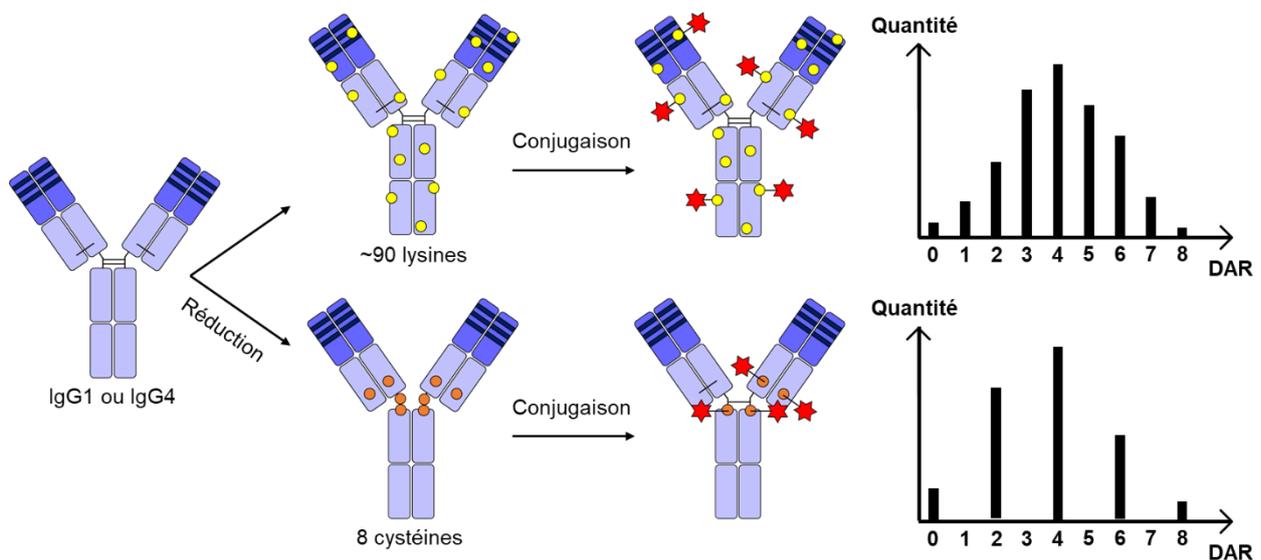


Figure 17 - Représentation schématique de la conjugaison des lysines et des cystéines et la distribution du DAR théorique.

De nombreuses études ont été menées afin de comprendre l'influence négative que peut avoir un mélange hétérogène d'ADC avec différents DARs sur l'activité anti-cancéreuse. L'une d'entre elles s'est intéressée à comparer le potentiel thérapeutique des différentes sous-populations de DARs (2, 4 et 8) du conjugué cAC10-MMAE conjugué par fonctionnalisation des cystéines,

<sup>115</sup> Beck, A., Wagner-Rousset, E., Ayoub, D., Van Dorsselaer, A. & Sanglier-Cianférani, S. Characterization of therapeutic antibodies and related products. *Anal. Chem.* **85**, 715–736 (2013).

après isolation des différentes espèces<sup>116</sup>. Bien que les valeurs d'IC<sub>50</sub> *in vitro* soit directement liées au DAR (IC<sub>50</sub> DAR 8 < IC<sub>50</sub> DAR 4 < IC<sub>50</sub> DAR 2), il a été montré *in vivo* que le conjugué de DAR 2 présente la plus faible activité antitumorale, tandis que celles des DAR 4 et DAR 8 sont équivalentes. Cette observation a été directement corrélée à la pharmacocinétique ; l'ADC de DAR 8 a tendance à s'agrèger et est éliminé trois fois plus vite à cause de l'hydrophobicité apportée par la petite molécule. Accéder à un anticorps avec une valeur de DAR homogène et ajustée est donc un paramètre clé à prendre en compte dans le développement d'ADC.

### 1.3.3 Les ADC de troisième génération

#### 1.3.3.1 Les méthodes de conjugaison régio-spécifiques

Les problèmes relatifs à l'hétérogénéité du DAR des ADC de deuxième génération ont été abordés à travers le développement de méthodes de conjugaison régio-spécifiques permettant de produire des conjugués homogènes, avec une stoechiométrie définie et uniforme<sup>117</sup>. Ces méthodes de conjugaison spécifique utilisent la séquence native de l'anticorps ou une séquence incluant une mutation ponctuelle et se divisent en deux catégories : les méthodes chimiques et les méthodes enzymatiques.

La première approche de conjugaison spécifique par modification chimique a consisté en l'introduction d'acides aminés spécifiques par ingénierie de l'anticorps. Pour permettre la conjugaison spécifique du linker-cytotoxique, Junutula et ses collègues ont ainsi muté deux résidus (LC-V110C et HC-A114C) par deux cystéines et montré que ces mutations n'altéraient pas le repliement de l'IgG ni sa liaison à l'antigène, L'ADC résultant a été comparé à son analogue obtenu par conjugaison stochastique des cystéines natives et il a ainsi été possible de démontrer que la bioconjugaison contrôlée améliorerait significativement l'indice thérapeutique de l'ADC<sup>118</sup>.

---

<sup>116</sup> Hamblett, K. J. et al. Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. *Clin. Cancer Res.* **10**, 7063–7070 (2004).

<sup>117</sup> Agarwal, P. & Bertozzi, C. R. Site-specific antibody-drug conjugates: The nexus of bioorthogonal chemistry, protein engineering, and drug development. *Bioconjug. Chem.* **26**, 176–192 (2015).

<sup>118</sup> Junutula, J. R. et al. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nat. Biotechnol.* **26**, 925–932 (2008).

De façon similaire, l'introduction spécifique d'acides aminés non-naturels par remaniement du code génétique a également été décrite. Il s'agit principalement de sélénocystéines, de para-acétyl phénylalanine (pAcF)<sup>119</sup>, de para-azidométhyl phénylalanine (pAMF)<sup>120</sup> ou d'azidoéthoxycarbonyl lysine (AzAb)<sup>121</sup> (Figure 18). L'incorporation de fonctions chimiques non-protéinogènes par le biais de ces acides aminés non-naturels permet la conjugaison spécifique du cytotoxique par des réactions de chimie bioorthogonale, telles que la formation d'oxime<sup>125</sup> ou la cycloaddition 1,3-dipolaire alcyne-azoture<sup>126,127</sup>.

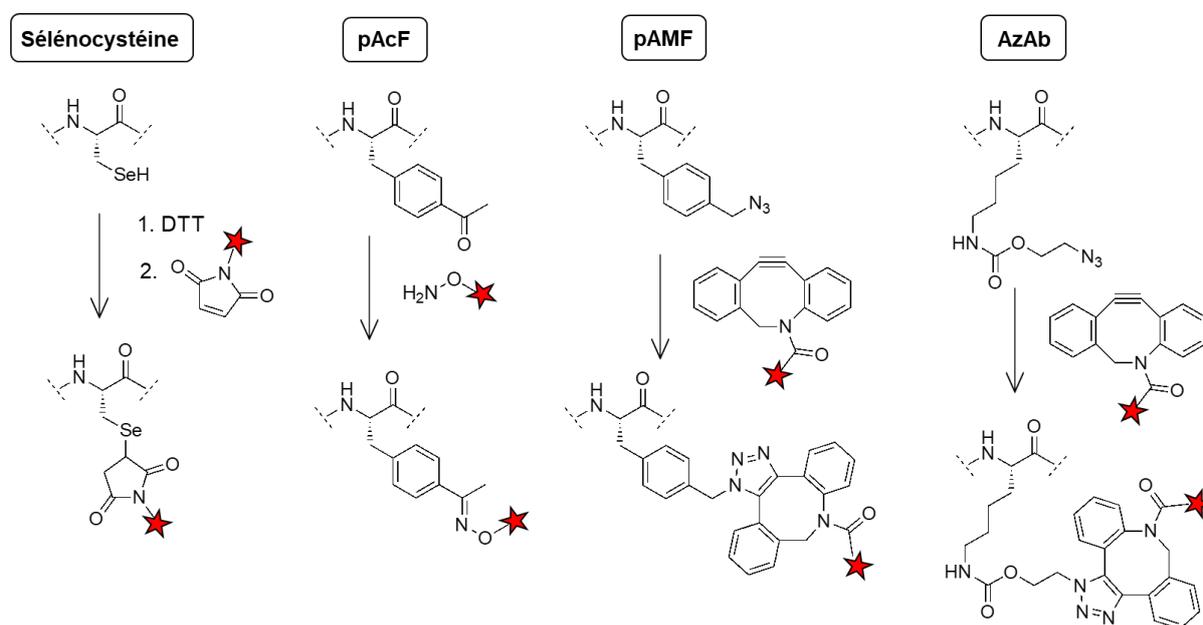


Figure 18 - Structure des acides aminés non-naturels et des conjugués associés.

L'incorporation d'acides aminés non-naturels au sein d'une séquence protéique reste néanmoins difficile à réaliser et les rendements de production associés sont souvent faibles. Dans ce contexte, une méthode de mutation chimique permettant de générer une fonction

<sup>119</sup> Tian, F. et al. A general approach to site-specific antibody drug conjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 1766–1771 (2014).

<sup>120</sup> Zimmerman, E. S. et al. Production of site-specific antibody-drug conjugates using optimized non-natural amino acids in a cell-free expression system. *Bioconjug. Chem.* **25**, 351–361 (2014).

<sup>121</sup> Vanbrunt, M. P. et al. Genetically Encoded Azide Containing Amino Acid in Mammalian Cells Enables Site-Specific Antibody-Drug Conjugates Using Click Cycloaddition Chemistry. *Bioconjug. Chem.* **26**, 2249–2260 (2015).

chimique non-protéino-gène à partir d'une séquence protéique a également été décrite<sup>122</sup>. Ici, un résidu sérine introduit de manière recombinante dans la partie N-terminal de la chaîne légère, peut être oxydé sélectivement en un céto-aldéhyde réactif, permettant une conjugaison régiosélective.

De façon alternatives, des méthodes de conjugaison sur les motifs de glycosylation ont été développées. En effet, les anticorps de type IgG possèdent un motif de glycosylation conservé au niveau du résidu Asn297, localisé entre les domaines CH2 et CH3 au sein du fragment Fc<sup>123</sup>. De nombreuses stratégies telles que l'ingénierie métabolique<sup>124</sup>, l'oxydation chimique<sup>125</sup> ou les modifications chémo-enzymatiques<sup>126,127,128,129</sup> ont été développées afin de conjuguer un cytotoxique à partir de ce motif de glycosylation.

En plus des méthodes chimiques, il existe de nombreuses méthodes de modification enzymatique qui permettent de conjuguer spécifiquement le cytotoxique à l'anticorps. Ces méthodes reposent sur l'introduction par ingénierie de l'anticorps d'une petite séquence peptidique tag spécifiquement reconnue par une enzyme, afin de guider la conjugaison du cytotoxique<sup>130</sup>. Parmi les enzymes utilisées dans le développement des ADC, on retrouve majoritairement : (1) la transglutaminase bactérienne (BTG pour Bacterial TransGlutaminase)

---

<sup>122</sup> Thompson, P. et al. *Hydrolytically Stable Site-Specific Conjugation at the N-Terminus of an Engineered Antibody*. *Bioconjug. Chem.* **26**, 2085–2096 (2015).

<sup>123</sup> Beck, A., Wagner-Rousset, E., Ayoub, D., Van Dorsselaer, A. & Sanglier-Cianférani, S. *Characterization of therapeutic antibodies and related products*. *Anal. Chem.* **85**, 715–736 (2013).

<sup>124</sup> Okeley, N. M. et al. *Metabolic engineering of monoclonal antibody carbohydrates for antibody-drug conjugation*. *Bioconjug. Chem.* **24**, 1650–1655 (2013).

<sup>125</sup> Zuberbühler, K., Casi, G., Bernardes, G. J. L. & Neri, D. *Fucose-specific conjugation of hydrazide derivatives to a vascular-targeting monoclonal antibody in IgG format*. *Chem. Commun.* **48**, 7100–7102 (2012).

<sup>126</sup> Zhou, Q. et al. *Site-specific antibody-drug conjugation through glycoengineering*. *Bioconjug. Chem.* **25**, 510–520 (2014).

<sup>127</sup> Li, X., Fang, T. & Boons, G.-J. *The preparation of well-defined antibody-drug conjugates through glycan remodelling and strain promoted azide-alkyne cycloadditions*. *Ang* **53**, 7179–7182 (2014).

<sup>128</sup> Qasba, P. K. *Glycans of Antibodies as a Specific Site for Drug Conjugation Using Glycosyltransferases*. *Bioconjug. Chem.* **26**, 2170–2175 (2015).

<sup>129</sup> Van Geel, R. et al. *Chemoenzymatic Conjugation of Toxic Payloads to the Globally Conserved N-Glycan of Native mAbs Provides Homogeneous and Highly Efficacious Antibody-Drug Conjugates*. *Bioconjug. Chem.* **26**, 2233–2242 (2015).

<sup>130</sup> Agarwal, P. & Bertozzi, C. R. *Site-specific antibody-drug conjugates: The nexus of bioorthogonal chemistry, protein engineering, and drug development*. *Bioconjug. Chem.* **26**, 176–192 (2015).

permettant la transamidation entre la fonction carboxamide de la glutamine et une amine primaire<sup>131</sup> (Figure 19A), (2) la sortase catalysant la ligation d'un peptide poly-glycine à l'extrémité C-terminal d'une séquence spécifique<sup>132</sup> (Figure 19B), et (3) la Formylglycine-Generating Enzyme (FGE) qui catalyse la transformation d'une cystéine en un résidu formylglycine contenant une fonction aldéhyde ensuite modifiable par chimie bioorthogonale<sup>133</sup> (Figure 19C). L'utilisation de la BTG pour la modification régio-spécifique de protéines est spécifiquement détaillée dans le chapitre 2.

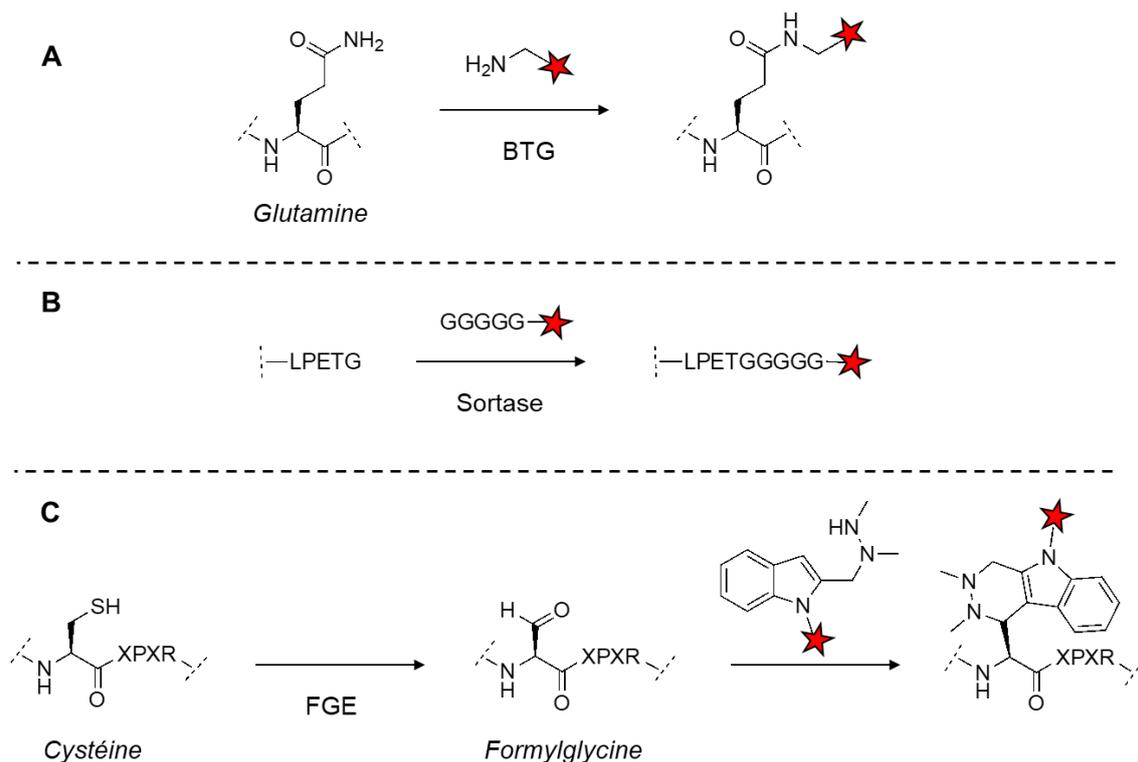


Figure 19 - Méthode de bioconjugaison enzymatique. (A) Conjugaison par la transglutaminase bactérienne (BTG). (B) Conjugaison par la sortase. (C) Conjugaison par la formylglycine-generating enzyme (FGE).

<sup>131</sup> Strop, P. et al. Location matters: Site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates. *Chem. Biol.* **20**, 161–167 (2013).

<sup>132</sup> Pishesha, N., Ingram, J. R. & Ploegh, H. L. Sortase A: A Model for Transpeptidation and Its Biological Applications. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **34**, 163–188 (2018).

<sup>133</sup> Barfield, R. M. & Rabuka, D. Leveraging formylglycine-generating enzyme for production of site-specifically modified bioconjugates. *Methods Mol. Biol.* **1728**, 3–16 (2018).

Les ADC de deuxième génération construits par conjugaison des cystéines après réduction des ponts disulfure, contiennent tous une liaison thio-éther cystéine-maléimide dont l'instabilité a notamment été mise en évidence en présence d'autres thiols (sérum albumine, glutathion, cystéine...), conduisant au transfert de la molécule cytotoxique de l'anticorps vers la sérumalbumine *via* une réaction de rétro-addition de Michael<sup>134</sup> (Figure 20A). Cette déconjugaison contribue à augmenter la toxicité des ADC. C'est dans ce contexte que le développement des ADC de troisième génération s'est accompagné du développement de nouvelles technologies cherchant à stabiliser les maléimides ou à les substituer. Il a ainsi été montré que l'hydrolyse du motif succinimide conduit à une ouverture de cycle qui stabilise durablement la liaison thio-éther<sup>135</sup>. De nouveaux maléimides substitués auto-hydrolysables (Figure 20B) ont également été synthétisés, et l'amine primaire introduite joue le rôle de catalyse basique intramoléculaire favorisant l'ouverture spontanée du motif cyclique<sup>136</sup>. De façon alternative, de nouveaux réactifs ciblant les cystéines ont également été synthétisés, comme le MDTF auto-hydrolysable<sup>137</sup> ou le CBTF<sup>138</sup> (Figure 20B).

---

<sup>134</sup> Wei, C. et al. *Where Did the Linker-Payload Go? A Quantitative Investigation on the Destination of the Released Linker-Payload from an Antibody-Drug Conjugate with a Maleimide Linker in Plasma.* *Anal. Chem.* **88**, 4979–4986 (2016).

<sup>135</sup> Tumey, L. N. et al. *Mild method for succinimide hydrolysis on ADC: Impact on ADC potency, stability, exposure, and efficacy.* *Bioconjug. Chem.* **25**, 1871–1880 (2014).

<sup>136</sup> Lyon, R. P. et al. *Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates.* *Nat. Biotechnol.* **32**, 1059–1062 (2014).

<sup>137</sup> Dovgan, I., Kolodych, S., Koniev, O. & Wagner, A. *2-(Maleimidomethyl)-1,3-Dioxanes (MD): A Serum-Stable Self-hydrolysable Hydrophilic Alternative to Classical Maleimide Conjugation.* *Sci. Rep.* **6**, 1–7 (2016).

<sup>138</sup> Kolodych, S. et al. *CBTF: New amine-to-thiol coupling reagent for preparation of antibody conjugates with increased plasma stability.* *Bioconjug. Chem.* **26**, 197–200 (2015).

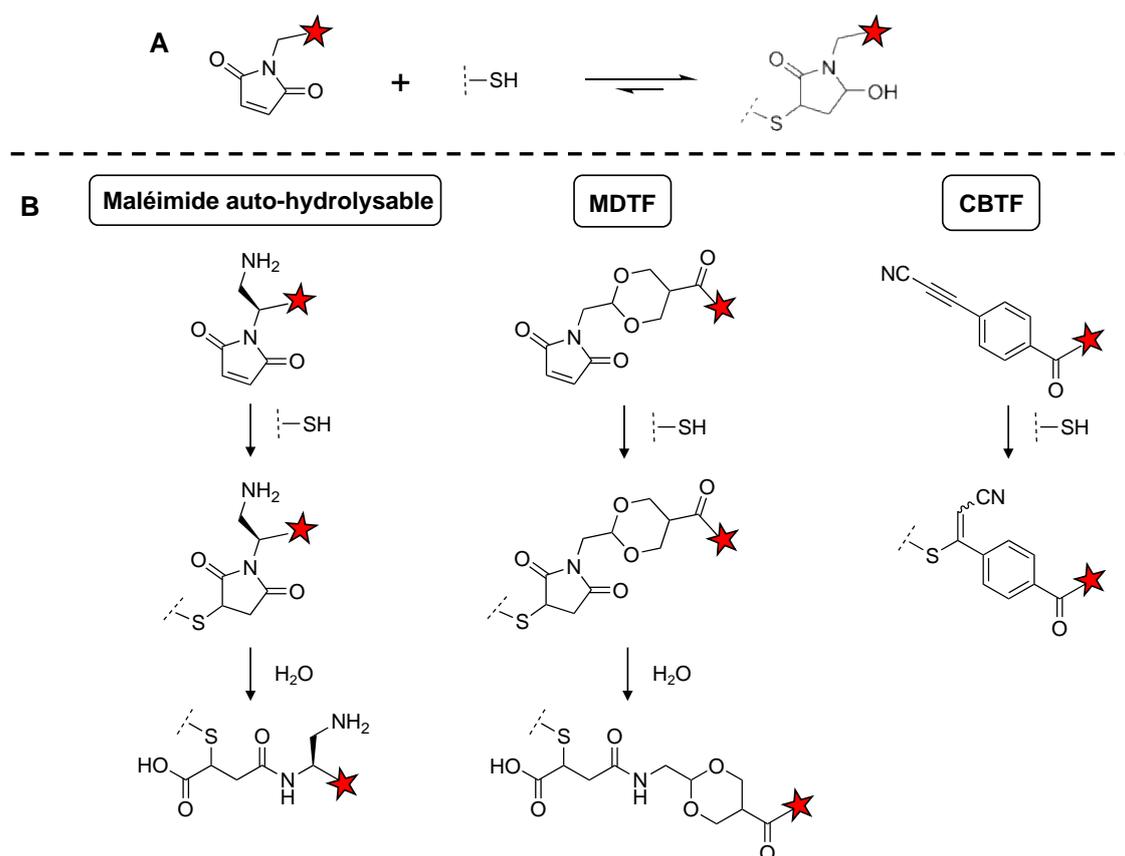


Figure 20 - L'instabilité du lien thio-éther cystéine-maléimide (A) a conduit au développement de nouvelles conjugaison plus stable (B).

Une autre alternative, combinant à la fois la synthèse d'ADC avec un DAR défini et homogène et l'introduction de nouvelles fonctions réactives générant un lien stable avec les cystéines, a été le développement d'agents pontants, tels que les dibromomaléimides<sup>139</sup>, les bis-sulfones<sup>140</sup>, les dibromopyridazinediones<sup>141</sup> et plus récemment, les divinylpyrimidines<sup>142</sup> (Figure 21). Ce type de conjugaison ne nécessite aucune ingénierie de l'anticorps, et consiste uniquement en une étape de réduction des ponts disulfures structuraux. L'un des avantages de

<sup>139</sup> Behrens, C. R. et al. *Antibody-Drug Conjugates (ADC) Derived from Interchain Cysteine Cross-Linking Demonstrate Improved Homogeneity and Other Pharmacological Properties over Conventional Heterogeneous ADC*. *Mol. Pharm.* **12**, 3986–3998 (2015).

<sup>140</sup> Bryant, P. et al. *In vitro and in vivo evaluation of cysteine rebridged trastuzumab-MMAE antibody drug conjugates with defined drug-to-antibody ratios*. *Mol. Pharm.* **12**, 1872–1879 (2015).

<sup>141</sup> Maruani, A. et al. *A plug-and-play approach to antibody-based therapeutics via a chemoselective dual click strategy*. *Nat. Commun.* **6**, 1–9 (2015).

<sup>142</sup> Walsh, S. J. et al. *A general approach for the site-selective modification of native proteins, enabling the generation of stable and functional antibody-drug conjugates*. *Chem. Sci.* **10**, 694–700 (2019).

ces agents pontants est de permettre l'obtention d'ADC avec un DAR fixe de quatre à partir de la séquence native des IgGs. La stabilité du lien thio-éther généré, mais aussi le maintien de la structure de l'anticorps par reformation d'un lien covalent entre les cystéines apparentées sont des améliorations notables. L'utilisation des dibromopyridazinediones offre également la possibilité d'introduire une double fonctionnalité sur le conjugué, qui peut être d'une part le cytotoxique, et d'autre part un PEG pour améliorer la solubilité et augmenter temps de circulation<sup>147</sup>.

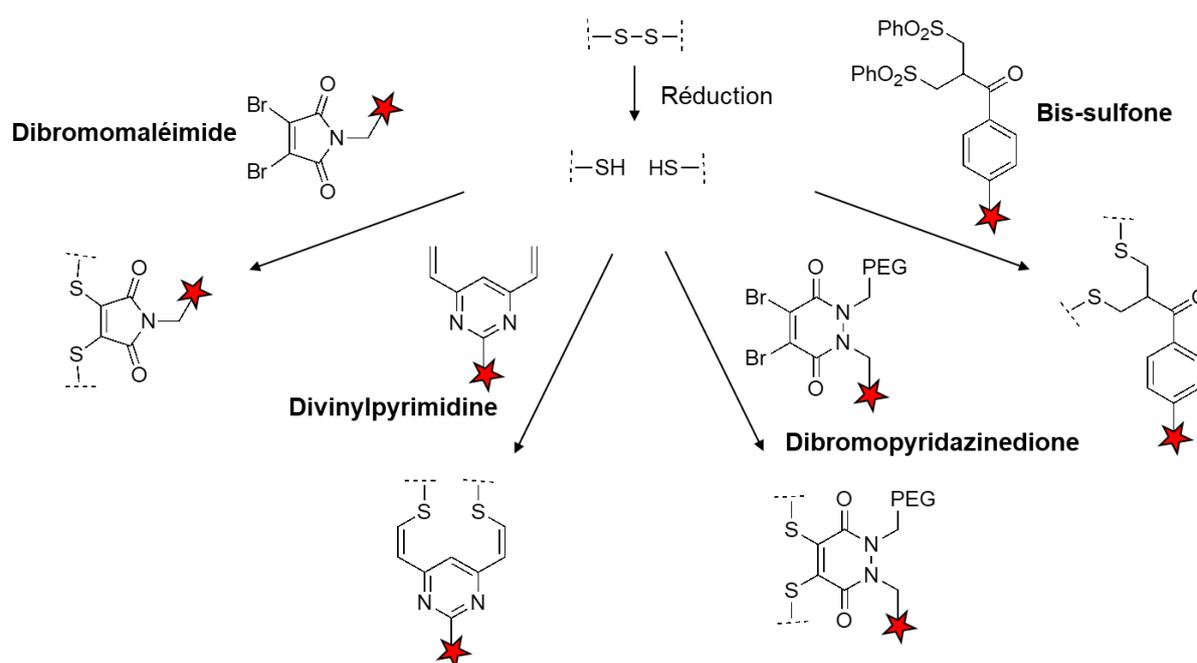


Figure 21 – Les différents agents pontants utilisés pour la conjugaison aux anticorps.

Bien que le développement de toutes ces méthodes de conjugaison régio-spécifique soit une avancée majeure vers l'obtention d'ADC ayant une plus large fenêtre thérapeutique, des études récentes ont mis en évidence l'importance du rôle ou l'incidence de la localisation du site de conjugaison pour l'activité des conjugués. En effet, il a été montré que l'environnement structurel autour du linker influence directement sa stabilité<sup>143</sup>, et que les propriétés pharmacocinétiques des ADC dépendent du site de conjugaison du cytotoxique<sup>144</sup>. Ainsi, une

<sup>143</sup> Dorywalska, M. et al. Effect of attachment site on stability of cleavable antibody drug conjugates. *Bioconjug. Chem.* **26**, 650–659 (2015).

<sup>144</sup> Strop, P. et al. Location matters: Site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates. *Chem. Biol.* **20**, 161–167 (2013).

meilleure compréhension de ces différents paramètres pourrait aider à concevoir des ADC encore plus efficaces.

### 1.3.3.2 Les nouveaux formats d'ADC

La plupart des ADC ciblant des tumeurs solides ne vont pas au-delà de la phase II d'essais cliniques et ne représentent au final qu'un tiers des ADC sur le marché<sup>145</sup>. A cet égard, la grande taille des ADC (format IgG) constitue un facteur limitant à leur diffusion au sein de la tumeur<sup>146</sup>. Il a également été montré que l'efficacité d'anticorps ayant une très forte affinité pour leur cible peut se trouver limiter par une capture au niveau des cellules tumorales périvasculaires<sup>147</sup>. Récemment, il a été proposé que le fragment Fc pouvait également réduire l'effet bénéfique des ADC. En prolongeant la demi-vie des ADC, il augmente en effet leur exposition aux cellules saines<sup>148</sup>, et induit une fixation aux cellules immunitaires, conduisant au développement de pathologies comme la thrombocytopénie<sup>149</sup>. Pour pallier ces limitations, l'utilisation de formats d'anticorps de plus petites tailles, comme les Fabs et les scFvs, a été explorée. Seuls quelques exemples de cytotoxiques efficacement vectorisés par ces nouveaux formats d'anticorps sont actuellement publiés (Tableau 4).

---

<sup>145</sup> Nagayama, A., Ellisen, L. W., Chabner, B. & Bardia, A. *Antibody–Drug Conjugates for the Treatment of Solid Tumors: Clinical Experience and Latest Developments*. *Target. Oncol.* **12**, 719–739 (2017).

<sup>146</sup> Jain, R. K. *Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors*. *Cancer Res.* **50**, (1990).

<sup>147</sup> Tang, H. et al. *The analysis of key factors related to ADC structural design*. *Front. Pharmacol.* **10**, 1–11 (2019).

<sup>148</sup> Brachet, G. et al. *Increment in Drug Loading on an Antibody–Drug Conjugate Increases Its Binding to the Human Neonatal Fc Receptor in Vitro*. *Mol. Pharm.* **13**, 1405–1412 (2016).

<sup>149</sup> Litvak–Greenfeld, D. & Benhar, I. *Risks and untoward toxicities of antibody-based immunoconjugates*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 1782–1799 (2012).

FORMAT	ANTIGENE	CYTOTOXIQUE	DAR	IC <sub>50</sub>	INDICATION	REFERENCE
FAB	HER2	MMAE	1	0,2 nM	Cancer du sein	150
SCFV	Intégrine $\alpha_3\beta_1$	Duocarmycine	2	2,7 nM	Cancer du pancréas	151
SCFV	CA9	MMAF	2	0,5 nM	Cancer du colon	152
SCFV	HER2	MMAE	1	0,6 nM	Cancer du sein	153
SCFV	HER2	MMAF	1	0,3 nM	Cancer du sein	159

Tableau 4- Caractéristiques des différents ADC de plus petits formats publiés dans le cadre du traitement des tumeurs solides.

### 1.3.3.3 Les ADC non-internalisables

Jusqu'à-là, les anticorps sélectionnés pour la conception d'ADC ont été sélectionnés sur la base de leur capacité à être internalisés par les cellules cancéreuses. Néanmoins, l'exigence stricte d'internalisation des anticorps a récemment été remise en question, depuis qu'il a été montré qu'un ADC non-internalisable dirigé contre les composants de la matrice extracellulaire est capable de libérer efficacement son cytotoxique et d'induire une activité antitumorale<sup>154</sup>. Le principe de cette nouvelle approche repose sur la présence de protéases<sup>155</sup>, ou d'une forte concentration en glutathion<sup>156</sup> dans le milieu extracellulaire, qui permet la libération du

<sup>150</sup> Badescu, G. et al. Bridging disulfides for stable and defined antibody drug conjugates. *Bioconjug. Chem.* **25**, 1124–1136 (2014).

<sup>151</sup> Lillo, A. et al. A human single-chain antibody specific for integrin capable of cell internalization and delivery of antitumor agents. *Chem. Biol. Biol.* **11**, 897–906 (2004).

<sup>152</sup> Spidel, J. L. et al. Engineering humanized antibody framework sequences for optimal site-specific conjugation of cytotoxins. *MAbs* **9**, 907–915 (2017).

<sup>153</sup> Aubrey, N. et al. Site-Specific Conjugation of Auristatins onto Engineered scFv Using Second Generation Maleimide to Target HER2-positive Breast Cancer in Vitro. *Bioconjug. Chem.* **29**, 3516–3521 (2018).

<sup>154</sup> Casi, G. & Neri, D. Noninternalizing targeted cytotoxics for cancer therapy. *Mol. Pharm.* **12**, 1880–1884 (2015).

<sup>155</sup> Gébleux, R., Stringhini, M., Casanova, R., Soltermann, A. & Neri, D. Non-internalizing antibody–drug conjugates display potent anti-cancer activity upon proteolytic release of monomethyl auristatin E in the subendothelial extracellular matrix. *Int. J. Cancer* **140**, 1670–1679 (2017).

<sup>156</sup> Gébleux, R., Wulhfard, S., Casi, G. & Neri, D. Antibody format and drug release rate determine the therapeutic activity of noninternalizing antibody–drug conjugates. *Mol. Cancer Ther.* **14**, 2606–2612 (2015).

cytotoxique dans le microenvironnement tumoral, puis sa diffusion à l'intérieur des cellules tumorales, provoquant leur mort.

Neri et ses collaborateurs ont ainsi décrit un ADC ciblant le domaine extracellulaire non internalisé de la fibronectine, conjugué spécifiquement avec un DAR 2 à la mertansine DM1 par un linker clivable disulfure<sup>157</sup>. Il a été montré que cet ADC non-internalisable s'accumule dans la matrice extracellulaire sous-endothéliale, qu'il est capable de libérer le cytotoxique avec une cinétique rapide, et qu'il est bien toléré à des doses cliniquement pertinentes. Plusieurs études ont montré que la fibronectine<sup>163</sup>, le collagène IV<sup>158</sup>, la fibrine<sup>159</sup>, la ténascine-C<sup>160</sup> et la Gal-3BP<sup>161</sup> (Galectin-3-Binding Protein) sont des cibles prometteuses dans le développement d'ADC non-internalisables. Un nouveau linker peptidique clivable a également été décrit dans le cadre des ADC non-internalisables : le linker Val-Ala est efficacement clivé par les protéases du milieu extracellulaire et montre une meilleure stabilité plasmatique que le dipeptide Val-Cit communément utilisé dans le développement des ADC internalisables<sup>162</sup>.

La recherche de nouvelles cibles antigéniques pertinentes, de linkers structurellement optimisés et de puissants cytotoxiques avec des modes d'action originaux se poursuit encore dans le but de continuer à améliorer les performances thérapeutiques des ADC.

---

<sup>157</sup> Perrino, E. et al. Curative properties of noninternalizing antibody-drug conjugates based on maytansinoids. *Cancer Res.* **74**, 2569–2578 (2014).

<sup>158</sup> Yasunaga, M., Manabe, S., Tarin, D. & Matsumura, Y. Cancer-stroma targeting therapy by cytotoxic immunoconjugate bound to the collagen 4 network in the tumor tissue. *Bioconjug. Chem.* **22**, 1776–1783 (2011).

<sup>159</sup> Yasunaga, M., Manabe, S. & Matsumura, Y. New concept of cytotoxic immunoconjugate therapy targeting cancer-induced fibrin clots. *Cancer Sci.* **102**, 1396–1402 (2011).

<sup>160</sup> Dal Corso, A., Gébleux, R., Murer, P., Soltermann, A. & Neri, D. A non-internalizing antibody-drug conjugate based on an anthracycline payload displays potent therapeutic activity in vivo. *J. Control. Release* **264**, 211–218 (2017).

<sup>161</sup> Giansanti, F. et al. Secreted Gal-3BP is a novel promising target for non-internalizing Antibody–Drug Conjugates. *J. Control. Release* **294**, 176–184 (2019).

<sup>162</sup> Dal Corso, A., Cazzamalli, S., Gébleux, R., Mattarella, M. & Neri, D. Protease-Cleavable Linkers Modulate the Anticancer Activity of Noninternalizing Antibody-Drug Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **28**, 1826–1833 (2017).

## 2 LA PHARMACOCINÉTIQUE ET LA BIODISTRIBUTION DES ADC LORS DES ÉTUDES PRÉCLINIQUES

---

Cette partie concernant les méthodes analytiques utilisées pour la bioanalyse des ADC a fait l'objet d'une revue plus détaillée qui a été soumise au journal *Pharmaceuticals* pour publication (en annexe).

Le domaine des ADC évolue très rapidement, et des efforts considérables sont continuellement déployés pour tirer parti des observations faites lors de l'évaluation des premiers conjugués, et ainsi guider le développement des futures générations d'ADC. En plus de l'optimisation des éléments structuraux, la compréhension de la pharmacocinétique et de la biodistribution ainsi que leur impact sur l'efficacité et la toxicité, est un élément essentiel pour la conception d'un ADC efficace. En raison de la progression permanente de la compréhension de la nature complexe des ADC et du nombre limité de données cliniques disponibles, il n'y a, à ce jour, aucune stratégie ou procédure standard dédiée à l'analyse des ADC. Cependant, les différents acteurs du domaine s'accordent sur certains aspects importants à considérer lors de la bioanalyse des ADC, et plusieurs méthodes analytiques ont été décrites pour cette application.

### 2.1 LES DIFFÉRENTS ASPECTS À CONSIDÉRER LORS DE LA BIOANALYSE DES ADC

L'étude ADME (Absorption – Distribution – Métabolisme – Excrétion) des ADC est un processus complexe en raison de leur structure multi-composante et de leur nature hétérogène. En effet, les ADC possèdent une structure complexe qui combine les caractéristiques des larges biomolécules et des petites molécules organiques ; ce qui nécessite l'utilisation de plusieurs stratégies analytiques afin de déterminer le comportement et le devenir des deux composants *in vivo*<sup>163</sup>. En plus de ce premier niveau de complexité, les ADC conventionnels peuvent être un mélange hétérogène de conjugués chimiquement différents, qui varient à la fois en termes de DAR mais aussi au niveau de la localisation du site de conjugaison, ce qui contribue aux enjeux

---

<sup>163</sup> Stephan JP, Kozak KR, Wong WLT. Challenges in developing bioanalytical assays for characterization of antibody-drug conjugates. *Bioanalysis*. 2011;3(6):677-700. doi:10.4155/bio.11.30

associés à la bioanalyse des ADC. Cependant, il est important de noter que l'utilisation de méthodes de conjugaison régio-spécifique pour générer des ADC structurellement homogènes ne résout que partiellement le problème lié à l'hétérogénéité des conjugués. En effet, il a été montré qu'un ADC homogène subit un certain nombre de biotransformations *in vivo* qui conduisent à la déconjugaison prématurée du cytotoxique ou au catabolisme de l'anticorps<sup>164</sup>. Ces différents processus sont responsables de l'évolution de l'ADC initialement homogène vers un mélange hétérogène en constante évolution, ce qui influence directement le profil d'efficacité et de toxicité. La stabilité du linker durant la phase de circulation, qui est directement liée à sa nature chimique mais aussi au site de conjugaison, est donc un élément déterminant de la pharmacocinétique et de la biodistribution des ADC<sup>165</sup>.

Les performances *in vivo* d'une molécule thérapeutique - qu'il s'agisse d'une molécule biologique ou d'une petite molécule organique - sont principalement liées à sa concentration plasmatique dans le temps, ainsi qu'à sa capacité à s'accumuler au sein des tissus ciblés. La concentration circulante d'ADC est principalement gouvernée par le composant anticorps, et se caractérise par une faible clairance et une longue demi-vie<sup>166</sup>. Néanmoins, au-delà de ces similitudes avec les anticorps, de nombreuses caractéristiques des ADC diffèrent de celles de ces derniers, notamment dans le cas d'ADC conjugués à un DAR élevé. Les ADC doivent être considérés comme deux composants pharmacologiquement distincts, l'anticorps et la petite molécule cytotoxique ; c'est pourquoi, plusieurs analytes doivent être mesurés pour décrire correctement leurs propriétés *in vivo*<sup>167</sup>. Ces analytes comprennent i) l'anticorps conjugué, portant au moins une petite molécule, ii) le cytotoxique conjugué, correspondant à toutes les petites molécules encore liées à l'anticorps, iii) l'anticorps total, qu'il soit conjugué ou non, iv) l'anticorps libre, qui a perdu la totalité de ces petites molécules conjuguées, et v) le cytotoxique libre et ses différents catabolites, tel que l'adduit linker-cytotoxique lié au premier acide aminé

---

<sup>164</sup> Shen BQ, Xu K, Liu L, et al. Conjugation site modulates the *in vivo* stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates. *Nat Biotechnol.* 2012;30(2):184-189. doi:10.1038/nbt.2108

<sup>165</sup> Junutula JR, Raab H, Clark S, et al. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nat Biotechnol.* 2008;26(8):925-932. doi:10.1038/nbt.1480

<sup>166</sup> Pyzik M, Sand KMK, Hubbard JJ, Andersen JT, Sandlie I, Blumberg RS. The neonatal Fc Receptor (FcRn): A misnomer? *Front Immunol.* 2019;10(JULY). doi:10.3389/fimmu.2019.01540

<sup>167</sup> Lin K, Tibbitts J. Pharmacokinetic considerations for antibody drug conjugates. *Pharm Res.* 2012;29(9):2354-2366. doi:10.1007/s11095-012-0800-y

(Figure 22). Actuellement, il n’y a pas de véritable consensus à propos des analytes qui pourraient fournir des informations clés, ni sur les espèces moléculaires qui pourraient être liées à l’efficacité et à la toxicité des ADC. Par conséquent, il est nécessaire de procéder à de multiples analyses, chacune d’entre elles donnant un aperçu des différents aspects de l’ADME globale des ADC<sup>168</sup>.

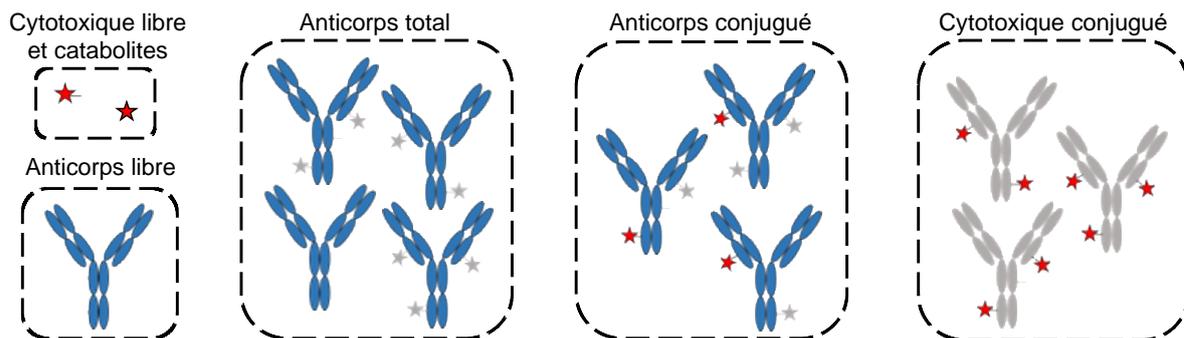


Figure 22 – Les biotransformations subies par les ADC *in vivo* augmentent la complexité du mélange et donne lieu à de multiples analytes à mesurer.

## 2.2 L’ÉTUDE PHARMACOCINÉTIQUE DES ADC

Chaque étape du développement des ADC, de la conception aux stades précliniques et cliniques, peut avoir des considérations pharmacocinétiques différentes, qui nécessitent donc la mesure de plusieurs analytes<sup>169</sup>. Au cours de la première étape du développement de nouveaux ADC, consistant à sélectionner et à optimiser les meilleurs conjugués, il est nécessaire de fournir des informations sur la stabilité, la toxicité et l’efficacité thérapeutique des candidats médicaments. Ces informations permettent ensuite de comparer les différents conjugués entre eux et de sélectionner l’ADC présentant le meilleur profil thérapeutique *in vivo*. À ce stade, les analytes couramment mesurés sont l’anticorps total, l’anticorps conjugué et/ou le cytotoxique conjugué, le cytotoxique libre et ses différents catabolites, ainsi que l’évolution *in vivo* du DAR

<sup>168</sup> Gorovits B, Alley SC, Bilic S, et al. Bioanalysis of antibody-drug conjugates: American Association of Pharmaceutical Scientists Antibody-Drug Conjugate Working Group position paper. *Bioanalysis*. 2013;5(9):997-1006. doi:10.4155/bio.13.38

<sup>169</sup> Sauerborn M, Van Dongen W. Practical considerations for the pharmacokinetic and immunogenic assessment of antibody-drug conjugates. *BioDrugs*. 2014;28(4):383-391. doi:10.1007/s40259-014-0096-z

au cours du temps. Au cours des dernières étapes précliniques, la compréhension des propriétés pharmacologiques et toxicologiques des principaux candidats devient essentielle. C'est pourquoi, en plus de la quantification des analytes décrits précédemment, l'immunogénicité des conjugués est également évaluée en analysant la présence d'anticorps dirigés contre l'ADC (ADA pour Anti-Drug Antibody)<sup>170</sup>. La bioanalyse des ADC doit permettre de fournir des informations sur les différents analytes clés à quantifier et sur leur lien direct avec l'efficacité et la toxicité<sup>171</sup>. Cet aspect doit être pris en compte pour aider à prédire la pharmacocinétique chez l'homme et à transposer plus facilement les effets pharmacologiques observés chez les différentes espèces animales.

Des méthodes bioanalytiques telles que la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS pour Liquid Chromatography-Mass Spectrometry), les tests immunologiques, et la combinaison de ces deux méthodes sont utilisés pour analyser la diversité d'analytes issus des ADC. La LC-MS/MS est principalement employée pour la détection et la quantification de la petite molécule sous sa forme libre ou métabolisée. Les méthodes basées sur les tests immunologiques sont souvent utilisées pour étudier le composant anticorps des ADC. Enfin, les méthodes hybrides de LB-LC-MS/MS (Ligand Binding-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry), consistent en une analyse LC-MS/MS d'un échantillon immuno-capturé et sont de plus en plus utilisées comme alternative pour la caractérisation et la quantification des anticorps<sup>172</sup>.

### **2.2.1 La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS)**

La méthode LC-MS/MS - traditionnellement utilisée pour les petites molécules - est conçue pour quantifier le cytotoxique non conjugué à l'anticorps, ce qui inclut la fraction libérée par

---

<sup>170</sup> Hock MB, Thudium KE, Carrasco-Triguero M, Schwabe NF. Immunogenicity of Antibody Drug Conjugates: Bioanalytical Methods and Monitoring Strategy for a Novel Therapeutic Modality. *AAPS J.* 2015;17(1):35-43. doi:10.1208/s12248-014-9684-6

<sup>171</sup> Sauerborn M, Van Dongen W. Practical considerations for the pharmacokinetic and immunogenic assessment of antibody-drug conjugates. *BioDrugs.* 2014;28(4):383-391. doi:10.1007/s40259-014-0096-z

<sup>172</sup> Ramagiri S, Moore I. Hybridizing LBA with LC-MS/MS: The new norm for biologics quantification. *Bioanalysis.* 2016;8(6):483-486. doi:10.4155/bio.16.9

déconjugaison pendant la phase de circulation ainsi que celle libérée lors du catabolisme de l'ADC. Avant l'analyse, une étape de précipitation des protéines ou d'extraction en phase solide (SPE pour Solid Phase Extraction) est systématiquement effectuée pour éliminer toutes les protéines plasmatiques qui complexifient l'échantillon et diminuent la sensibilité de détection. Les masses de la molécule et de ses fragments caractéristiques sont utilisés pour déterminer la structure des principaux métabolites, tandis que le signal UV permet de quantifier les différentes espèces. Etant donné que la petite molécule non-conjuguée peut être présente à une très faible concentration dans les échantillons biologiques, la sensibilité de détection de la méthode est l'une des principales limitations associées à la quantification du cytotoxique délivré. Par exemple, il a été reporté lors d'une étude clinique réalisée sur des patients traités toutes les trois semaines, que la quantification du cytotoxique DM1 non-conjugué n'a pas été possible en raison d'un signal constamment en dessous de la limite inférieure de quantification (LLOQ pour Lower Limit Of Quantification) de la méthode (0,2 ng/mL)<sup>173</sup>. Dans une autre étude, la quantification du cytotoxique DM4 non-conjugué a été uniquement effectuée durant les vingt-quatre premières heures d'une étude de trois semaines, en utilisant une méthode LC-MS/MS avec une LLOQ de 0,5 ng/mL<sup>174</sup>. Il est important de noter que l'ensemble des données publiées concernant les LLOQ des cytotoxiques non-conjugués reste assez limité, ce qui rend difficile la prédiction du seuil de sensibilité moyen qui peut généralement être atteint. Cela est d'autant plus compliqué que ce seuil dépend principalement de la petite molécule cytotoxique considérée.

## 2.2.2 Les tests immunologiques

### 2.2.2.1 L'application à la quantification du composant anticorps

Le test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), qui repose sur la détection de la protéine d'intérêt par immunoaffinité, est la méthode standard utilisée pour l'analyse des larges

---

<sup>173</sup> Heudi O, Barteau S, Picard F, Kretz O. Quantitative analysis of maytansinoid (DM1) in human serum by on-line solid phase extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry - Method validation and its application to clinical samples. *J Pharm Biomed Anal.* 2016;120:322-332. doi:10.1016/j.jpba.2015.12.026

<sup>174</sup> Wei D, Sullivan M, Espinosa O, Yang L. A sensitive LC-MS/MS method for the determination of free maytansinoid DM4 concentrations - Method development, validation, and application to the nonclinical studies of antitumor agent DM4 conjugated hu-anti-Cripto MAb B3F6 (B3F6-DM4) in rats and monkeys. *Int J Mass Spectrom.* 2012;312:53-60. doi:10.1016/j.ijms.2011.05.010

biomolécules dans des échantillons biologiques complexes. Cette méthode bioanalytique offre des avantages uniques pour la quantification des protéines, tels qu'une sensibilité élevée et une large gamme de quantification dans un petit volume d'échantillon sans aucune étape d'extraction<sup>175</sup>. Cependant, la structure multi-composante complexe des conjugués et leur nature hétérogène et constamment changeante *in vivo*, constituent des limitations à la bioanalyse des ADC par ELISA<sup>176,177</sup>. Tandis qu'un seul test immunologique est nécessaire pour une molécule biologique standard, l'analyse des ADC requiert plusieurs tests et différentes combinaisons de réactifs pour la détection et la quantification de l'intégralité des différents analytes issus de l'ADC<sup>178</sup>. Les réactifs de capture et de détection majoritairement utilisés sont des réactifs génériques tels que les anticorps anti-IgG humaine et les protéines A, G ou L, et des réactifs plus spécifiques comme l'antigène cible, les anticorps dirigés contre le cytotoxique, ou les anticorps anti-idiotypiques. En principe, la multitude de combinaisons de réactifs envisageables devrait permettre le développement de tests sélectifs et précis. Cependant, il a été montré que le développement de méthodes robustes est un processus très long, qui nécessite le screening de nombreux formats de tests et de réactifs dans différentes matrices, y compris le plasma et le sérum<sup>184</sup>. De plus, étant donné que le développement de réactifs spécifiques est long et coûteux, leur disponibilité est faible, ce qui limite l'application de ces tests immunologiques à des études cliniques.

Un autre point important à prendre en compte est que les réactifs utilisés pour quantifier le composant anticorps de l'ADC doivent pouvoir le reconnaître indépendamment de sa valeur de DAR. Cependant, il a été reporté que la petite molécule peut indirectement interférer la liaison du réactif à l'anticorps, et deux ADC de DAR différents ne sont pas détectés avec la même efficacité ni la même précision. En isolant les différentes fractions correspondant à chaque DAR, il a été démontré que celui-ci impactait directement l'efficacité de capture de différents

---

<sup>175</sup> Kumar S, King LE, Clark TH, Gorovits B. Antibody-drug conjugates nonclinical support: From early to late nonclinical bioanalysis using ligand-binding assays. *Bioanalysis*. 2015;7(13):1605-1617. doi:10.4155/bio.15.107

<sup>176</sup> Kozak KR, Tsai SP, Fourie-O'Donohue A, et al. Total antibody quantification for MMAE-conjugated antibody-drug conjugates: Impact of assay format and reagents. *Bioconjug Chem*. 2013;24(5):772-779. doi:10.1021/bc300491k

<sup>177</sup> Stephan JP, Chan P, Lee C, et al. Anti-CD22-MCC-DM1 and MC-MMAF conjugates: Impact of assay format on pharmacokinetic parameters determination. *Bioconjug Chem*. 2008;19(8):1673-1683. doi:10.1021/bc800059t

<sup>178</sup> Stephan JP, Chan P, Lee C, et al. Anti-CD22-MCC-DM1 and MC-MMAF conjugates: Impact of assay format on pharmacokinetic parameters determination. *Bioconjug Chem*. 2008;19(8):1673-1683. doi:10.1021/bc800059t

réactifs, avec environ seulement 70% et 55% de récupération des DAR6 et DAR8 respectivement<sup>179</sup>. De plus, les caractéristiques physicochimiques des ADC, telles que la méthode ou le site de conjugaison, ont aussi une forte répercussion sur la sensibilité au DAR d'un test impliquant un réactif générique ou spécifique. Toutefois, il a été montré que ce problème de sensibilité au DAR peut être dans certains cas contourné en changeant de format de test immunologique. En effet, comparativement au test ELISA où les réactifs sont ajoutés de manière séquentielle, le test semi-homogène (SHA pour Semi Homogeneous Assay), basé sur le prémélange en solution des réactifs de capture et de détection avec l'échantillon biologique, s'est révélé efficace pour détecter avec précision l'ensemble des ADC, indépendamment de leur DAR<sup>185</sup>. Lors du développement d'un test immunologique, il est donc recommandé de déterminer sa sensibilité au DAR en évaluant la capacité de récupération des différentes fractions enrichies en une valeur de DAR.

#### 2.2.2.2 L'application à la quantification du cytotoxique

Bien que les tests immunologiques soient largement utilisés pour la quantification de larges biomolécules, ils peuvent également convenir à l'analyse de la petite molécule. Par exemple, un test ELISA de compétition a été décrit pour la quantification du cytotoxique MMAE conjugué à l'anticorps après une incubation *in vitro* en présence de cathépsine B, en utilisant un anti-MMAE et le conjugué protéique HRP-MMAE<sup>180</sup>. Cependant, la LLOQ de 0,6 ng/mL qui a été reportée pour ce test immunologique de compétition est environ trente-trois fois supérieure à celle qui peut être atteinte pour le même cytotoxique en utilisant une méthode LC-MS/MS (0,018 ng/mL)<sup>181</sup>.

---

<sup>179</sup> Kozak KR, Tsai SP, Fourie-O'Donohue A, et al. Total antibody quantification for MMAE-conjugated antibody-drug conjugates: Impact of assay format and reagents. *Bioconjug Chem.* 2013;24(5):772-779. doi:10.1021/bc300491k

<sup>180</sup> Sanderson RJ, Hering MA, James SF, et al. *In vivo* drug-linker stability of an anti-CD30 dipeptide-linked auristatin immunoconjugate. *Clin Cancer Res.* 2005;11(2 I):843-852.

<sup>181</sup> Boswell CA, Mundo EE, Zhang C, et al. Impact of drug conjugation on pharmacokinetics and tissue distribution of Anti-STEAP1 antibody-drug conjugates in rats. *Bioconjug Chem.* 2011;22(10):1994-2004. doi:10.1021/bc200212a

### 2.2.3 Les méthodes hybrides où l'immuno-capture est associée à la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LB-LC-MS/MS)

Les méthodes hybrides qui associent l'immuno-capture à la LC-MS/MS et qui combinent les avantages de ces deux technologies sont en train de devenir une approche standard dans la bioanalyse des ADC<sup>182</sup>. Elles sont conçues de telle sorte que l'étape d'immuno-capture permette l'élimination des protéines plasmatiques abondantes de l'échantillon biologique, tandis que la LC-MS/MS permette la détection simultanée de plusieurs analytes au sein d'un même échantillon. Durant les études précliniques, un réactif de capture comme un anticorps anti-Fc humain immobilisé, est couramment utilisé pour isoler l'ADC du plasma de l'animal, tandis qu'un anticorps anti-idiotypique est nécessaire pour les échantillons cliniques<sup>183</sup>. À la fois la spectrométrie de masse à résolution unitaire de type triple quadripôle et la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS pour High Resolution Mass Spectrometry) sont utilisées dans ce type d'analyse.

#### 2.2.3.1 L'application à la caractérisation et la quantification du composant anticorps

L'analyse quantitative est principalement effectuée selon une approche "bottom-up", dans laquelle l'ADC immuno-capturé subit une étape de digestion protéolytique avant d'être analysé par LC-MS/MS (Figure 23). Ainsi, dans cette approche, un ou plusieurs fragments peptidiques signatures sont sélectionnés comme représentants de l'anticorps et sont utilisés pour indirectement quantifier la protéine sous sa forme entière<sup>184</sup>. Il est important de noter que lors des études précliniques, des peptides génériques issus de la région constante des anticorps peuvent être utilisés comme fragments signatures, tandis que l'analyse d'échantillons

---

<sup>182</sup> Ramagiri S, Moore I. Hybridizing LBA with LC-MS/MS: The new norm for biologics quantification. *Bioanalysis*. 2016;8(6):483-486. doi:10.4155/bio.16.9

<sup>183</sup> Fung EN, Bryan P, Kozhich A. Techniques for quantitative LC-MS/MS analysis of protein therapeutics: Advances in enzyme digestion and immunocapture. *Bioanalysis*. 2016;8(8):847-856. doi:10.4155/bio.16.24

<sup>184</sup> Van Den Broek I, Van Dongen WD. LC-MS-based quantification of intact proteins: Perspective for clinical and bioanalytical applications. *Bioanalysis*. 2015;7(15):1943-1958. doi:10.4155/bio.15.113

biologiques humains nécessite des peptides uniques issus des régions variables, pour éviter les interférences avec les IgGs humaines endogènes. La quantification est réalisée par comparaison du signal du fragment signature avec celui d'un étalon interne présent en quantité connue. Les standards internes doivent être identiques au peptide d'intérêt en termes de propriétés physicochimiques, tout en ayant un poids moléculaire différenciable par spectrométrie de masse ; c'est pourquoi, les peptides marqués par des isotopes stables (<sup>13</sup>C et <sup>15</sup>N) sont utilisés pour cette application<sup>185</sup>. La capture et la digestion sont des étapes critiques à la réussite de la méthode quantitative ; par conséquent, il est recommandé d'introduire un anticorps marqué par des isotopes stables dans l'échantillon biologique, afin de compenser les variations associées à la préparation de l'échantillon<sup>186</sup>. Bien que ce protocole de travail garantisse une très bonne sensibilité de quantification, les fragments signatures ne fournissent que des informations limitées sur les changements structuraux potentiels des ADC, et peuvent donc entraîner une mauvaise estimation de la concentration des ADC intacts dans les échantillons.

Dans ce contexte, l'approche "top-down", qui permet d'évaluer simultanément les changements qualitatifs et quantitatifs est apparue comme une analyse complémentaire à la stratégie "bottom-up". Durant l'analyse "top-down", la protéine d'intérêt est analysée par HRMS sans qu'aucune étape de digestion ne soit réalisée<sup>187</sup> (Figure 23). Cette approche a été utilisée avec succès pour quantifier les ADC intacts dans les échantillons biologiques<sup>188,189</sup>. Il est important de noter que la suppression de l'étape de digestion protéolytique permet de diminuer significativement les variations associées au processus de préparation de

---

<sup>185</sup> Wang J, Gu H, Liu A, et al. Antibody-drug conjugate bioanalysis using LB-LC-MS/MS hybrid assays: Strategies, methodology and correlation to ligand-binding assays. *Bioanalysis*. 2016;8(13):1383-1401. doi:10.4155/bio-2016-0017

<sup>186</sup> Li H, Ortiz R, Tran L, et al. General LC-MS/MS method approach to quantify therapeutic monoclonal antibodies using a common whole antibody internal standard with application to preclinical studies. *Anal Chem*. 2012;84(3):1267-1273. doi:10.1021/ac202792n

<sup>187</sup> He J, Su D, Ng C, et al. High-Resolution Accurate-Mass Mass Spectrometry Enabling In-Depth Characterization of *in Vivo* Biotransformations for Intact Antibody-Drug Conjugates. *Anal Chem*. 2017;89(10):5476-5483. doi:10.1021/acs.analchem.7b00408

<sup>188</sup> Jian W, Kang L, Burton L, Weng N. A workflow for absolute quantitation of large therapeutic proteins in biological samples at intact level using LC-HRMS. *Bioanalysis*. 2016;8(16):1679-1691. doi:10.4155/bio-2016-0096

<sup>189</sup> Lanshoeft C. Generic mass spectrometric workflows for mAb-related therapeutic protein quantification in pre-clinical species. 2017. <http://www.theses.fr/2017STRAF070/document>.

l'échantillon. Néanmoins, en comparaison avec la quantification à l'échelle du peptide, la quantification par LC-HRMS des ADC sous forme entière présente certaines limitations. En effet, en raison de leur plus grande taille et de leur hétérogénéité, leur signal de masse est dispersé suivant les différents isotopes naturels et les multiples états de charge de la protéine ; ce qui entraîne une perte considérable de sensibilité de détection.

Pour contourner cette limitation, l'approche "middle-down", qui implique une digestion modérée des anticorps en sous-unités plus petites peut être appliquée (Figure 23). Il a été montré que la digestion partielle par la protéase Lys-C d'un ADC immobilisé sur des billes de protéine A a permis la caractérisation du fragment Fab d'environ 50 kDa libéré, et sa quantification précise<sup>190</sup>. Une étape de réduction des ponts disulfures après une digestion modérée à l'aide de l'endopeptidase IdeS a également été réalisée pour générer trois fragments d'environ 25 kDa (Lc, Fc/2, Fd), qui ont été directement analysés par LC-HRMS<sup>191</sup>. Dans ces deux cas, la taille réduite des analytes a conduit à une amélioration de la sensibilité et de la résolution des spectres de masse par rapport à l'ADC intact.

### 2.2.3.2 Les autres applications

La LB-LC-MS/MS est une méthode polyvalente qui peut également être employée pour quantifier le cytotoxique conjugué à l'anticorps<sup>192</sup> (Figure 23). Dans ce cas, c'est la nature du linker synthétique entre l'anticorps et la petite molécule qui détermine la stratégie à suivre pour la préparation d'échantillon. En présence d'un linker enzymatiquement clivable, un traitement par la protéase adaptée permet de libérer spécifiquement le cytotoxique conjugué pour l'analyse LC-MS/MS<sup>193</sup>. En revanche, dans le cas d'un linker non-clivable, le conjugué

---

<sup>190</sup> Liu H, Manuilov A V., Chumsae C, Babineau ML, Tarcsa E. Quantitation of a recombinant monoclonal antibody in monkey serum by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2011;414(1):147-153. doi:10.1016/j.ab.2011.03.004

<sup>191</sup> Wagner-Rousset E, Janin-Bussat MC, Colas O, et al. Antibody-drug conjugate model fast characterization by LC-MS following IdeS proteolytic digestion. *MAbs.* 2014;6(1):173-184. doi:10.4161/mabs.26773

<sup>192</sup> Liu A, Kozhich A, Passmore D, et al. Quantitative bioanalysis of antibody-conjugated payload in monkey plasma using a hybrid immuno-capture LC-MS/MS approach: Assay development, validation, and a case study. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2015;1002:54-62. doi:10.1016/j.jchromb.2015.08.007

<sup>193</sup> Sanderson RJ, Nicholas ND, Baker Lee C, et al. Antibody-conjugated drug assay for protease-cleavable antibody-drug conjugates. *Bioanalysis.* 2016;8(1):55-63. doi:10.4155/bio.15.230

entier est alors digéré, et c'est le fragment peptidique lié au linker-cytotoxique généré qui est l'analyte signature à quantifier par LC-MS/MS<sup>194</sup>.

Cette méthode LB-LC-MS/MS a également été utilisée pour l'identification et la quantification des adduits du linker-cytotoxique lié à la sérumalbumine. Cette méthode s'applique aux ADC générés par un lien thio-éther maléimide qui peuvent subir une déconjugaison partielle par échange de thiol avec la Cys34 de la sérumalbumine durant la phase de circulation<sup>195</sup>. Dans ce cas, les réactifs de capture utilisés sont des anticorps dirigés contre le cytotoxique<sup>196</sup> ou contre la sérumalbumine<sup>197</sup>.

---

<sup>194</sup> Shi C, Goldberg S, Lin T, et al. LC/MS/MS Bioanalysis of Protein-Drug Conjugates - The Importance of Incorporating Succinimide Hydrolysis Products. *Anal Chem.* 2018;90(8):5314-5321. doi:10.1021/acs.analchem.8b00411

<sup>195</sup> Alley SC, Benjamin DR, Jeffrey SC, et al. Contribution of linker stability to the activities of anticancer immunoconjugates. *Bioconjug Chem.* 2008;19(3):759-765. doi:10.1021/bc7004329

<sup>196</sup> Wei C, Zhang G, Clark T, et al. Where Did the Linker-Payload Go? A Quantitative Investigation on the Destination of the Released Linker-Payload from an Antibody-Drug Conjugate with a Maleimide Linker in Plasma. *Anal Chem.* 2016;88(9):4979-4986. doi:10.1021/acs.analchem.6b00976

<sup>197</sup> Dong L, Li C, Locuson C, Chen S, Qian MG. A Two-Step Immunocapture LC/MS/MS Assay for Plasma Stability and Payload Migration Assessment of Cysteine-Maleimide-Based Antibody Drug Conjugates. *Anal Chem.* 2018;90(10):5989-5994. doi:10.1021/acs.analchem.8b00694

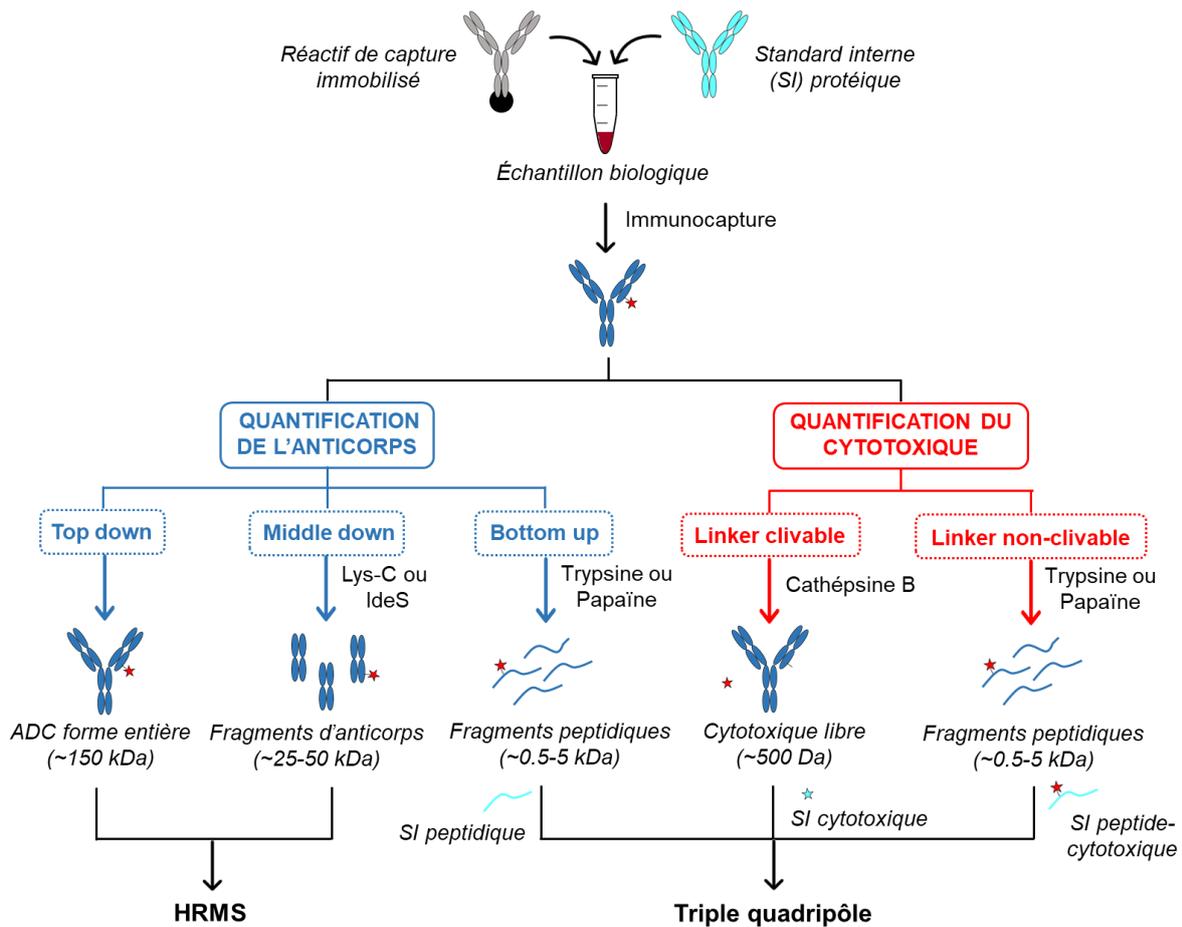


Figure 23 – Les différentes possibilités pour la bioanalyse des ADC au sein d'un échantillon biologique en utilisant les méthodes LB-LC-MS. SI : Standard Interne.

## 2.3 L'ÉTUDE DE LA BIODISTRIBUTION DES ADC

Pour concevoir les ADC les plus efficaces et les mieux tolérés possible, il est essentiel d'évaluer leur biodistribution dans les tissus pathologiques cibles, mais aussi au sein des tissus sains. Cette étape se révèle cruciale notamment dans le cas où les tissus sains présentent un faible niveau d'expression de l'antigène cible, ce qui pourrait entraîner des effets secondaires toxiques non désirables au sein de ces derniers. En raison de leur grande taille et de leur polarité, les ADC sont généralement restreints aux espaces vasculaires et interstitiels, et leur transport des vaisseaux sanguins vers les tissus est plutôt lent. Cependant, les tumeurs ont tendance à développer un système vasculaire anormal, avec la création de larges écarts entre les cellules endothéliales, ce qui entraîne une augmentation de l'absorption des ADC dans les

tumeurs par effet EPR (Enhanced Permeability and Retention)<sup>198</sup>. De plus, les ADC peuvent aussi être internalisés par les cellules selon des mécanismes spécifiques récepteur-dépendants, ou selon des mécanismes non-spécifiques comme la pinocytose ; ce qui contribue à l'accumulation des ADC dans les tissus pathologiques, mais aussi aux effets indésirables potentiels dans les tissus sains<sup>199</sup>. Il est aussi important de noter que la circulation systémique prolongée des ADC, permise par le mécanisme de recyclage médié par le FcRn, participe à l'augmentation de l'accumulation des conjugués au sein des tissus cibles et des tissus normaux. Bien que la distribution de la petite molécule conjuguée soit gouvernée par le composant anticorps de l'ADC, elle peut également être libérée prématurément durant la phase de circulation par déconjugaison du linker ou par protéolyse. Dans ce cas, le cytotoxique déconjugué suit alors le profil de biodistribution d'une petite molécule, caractérisé par une large distribution dans l'ensemble du corps ; ce qui s'associe à une augmentation des effets secondaires potentiels et de la toxicité dans les tissus sains. Quelle que soit la situation, il est donc crucial non seulement de quantifier la molécule effectivement délivrée dans les tissus pathologiques, mais aussi d'évaluer le niveau d'exposition des autres organes au cytotoxique. Dans ce contexte, plusieurs études ont montré la possibilité d'évaluer la biodistribution de l'anticorps et du cytotoxique in vivo ou ex vivo en utilisant des marquages radioactifs ou fluorescents, mais aussi *via* la spectrométrie de masse (Figure 24).

---

<sup>198</sup> Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol.* 2000;156(4):1363-1380. doi:10.1016/S0002-9440(10)65006-7

<sup>199</sup> Mahalingaiah PK, Ciurlionis R, Durbin KR, et al. Potential mechanisms of target-independent uptake and toxicity of antibody-drug conjugates. *Pharmacol Ther.* 2019;200:110-125. doi:10.1016/j.pharmthera.2019.04.008

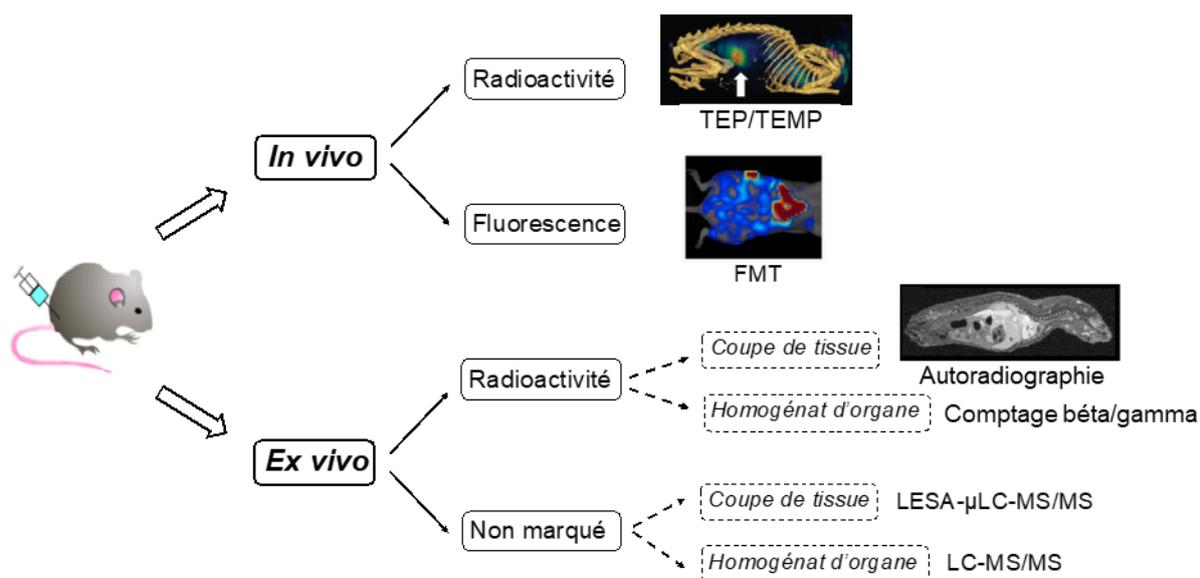


Figure 24 – Les différentes méthodes *in vivo* et *ex vivo* d'analyse de la biodistribution des ADC dans des modèles précliniques.

### 2.3.1 Les méthodes de biodistribution impliquant un marquage de l'ADC

L'évaluation de la biodistribution des ADC dans les modèles précliniques repose principalement sur la quantification *ex vivo* du composant anticorps radiomarqué à l'iode 125 ( $^{125}\text{I}$ )<sup>200,201,202,203</sup>

<sup>200</sup> Yang C, Zhao X, Sun X, et al. Preclinical pharmacokinetics of a novel anti-c-Met antibody–drug conjugate, SHR-A1403, in rodents and non-human primates. *Xenobiotica*. 2019;49(9):1097-1105. doi:10.1080/00498254.2018.1534030

<sup>201</sup> Xie H, Audette C, Hoffee M, Lambert JM, Blättler W. Erratum: Pharmacokinetics and biodistribution of the antitumor immunoconjugate, cantuzumab mertansine (huC242-DM1), and its two components in mice (*Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (2004) 308 (1073-1082)). *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;310(2):844. doi:10.1124/jpet.103.060533.Cantuzumab

<sup>202</sup> Saad OM, Shen BQ, Xu K, Khojasteh SC, Girish S, Kaur S. Bioanalytical approaches for characterizing catabolism of antibody–drug conjugates. *Bioanalysis*. 2015;7(13):1583-1604. doi:10.4155/bio.15.87

<sup>203</sup> Mandler R, Kobayashi H, Hinson ER, Brechbiel MW, Waldmann TA. Herceptin–Geldanamycin Immunoconjugates: Pharmacokinetics, Biodistribution, and Enhanced Antitumor Activity. *Cancer Res*. 2004;64(4):1460-1467. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2485

ou à l'indium 111 ( $^{111}\text{In}$ )<sup>204,205,206,207</sup>, ou du cytotoxique marqué au tritium ( $^3\text{H}$ )<sup>208,209,210</sup>. Pour cela, à différents temps, les animaux sont sacrifiés, leurs organes sont prélevés et les niveaux de radioactivité dans chacun des tissus sont déterminés par comptage bêta ( $^3\text{H}$ ) ou gamma ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ). Deux exemples de l'utilisation de l'autoradiographie quantitative *ex vivo* pour la quantification d'un anticorps marqué à l'iode 125<sup>211</sup> et du cytotoxique DM1 marqué au tritium<sup>215</sup>, respectivement sur des coupes d'organes et sur une section d'animal entier ont également été publiés. Bien qu'un double marquage simultané des deux composants de l'ADC devrait permettre de mieux comprendre les performances des ADC *in vivo*, seuls quelques exemples ont été publiés à ce jour. En effet, la biodistribution de l'anticorps et du cytotoxique dans différents organes ont été d'abord évaluées dans le cas d'un anticorps marqué au tritium conjugué à la MMAF marquée au carbone 14 ( $^{14}\text{C}$ ) par comptage bêta<sup>212</sup>, et ensuite dans le cas d'un anticorps marqué au zirconium 89 ( $^{89}\text{Zr}$ ) conjugué à un analogue de tubulysine marqué à

---

<sup>204</sup> Boswell CA, Mundo EE, Zhang C, et al. Impact of drug conjugation on pharmacokinetics and tissue distribution of Anti-STEAP1 antibody-drug conjugates in rats. *Bioconj Chem*. 2011;22(10):1994-2004. doi:10.1021/bc200212a

<sup>205</sup> Mandler R, Kobayashi H, Hinson ER, Brechbiel MW, Waldmann TA. Herceptin-Geldanamycin Immunoconjugates: Pharmacokinetics, Biodistribution, and Enhanced Antitumor Activity. *Cancer Res*. 2004;64(4):1460-1467. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2485

<sup>206</sup> Boswell CA, Yadav DB, Mundo EE, et al. Biodistribution and efficacy of an anti-TENB2 antibody-drug conjugate in a patient-derived model of prostate cancer. *Oncotarget*. 2019;10(58):6234-6244. doi:10.18632/oncotarget.27263

<sup>207</sup> Herbertson RA, Tebbutt NC, Lee FT, et al. Phase I biodistribution and pharmacokinetic study of Lewis Y-targeting immunoconjugate CMD-193 in patients with advanced epithelial cancers. *Clin Cancer Res*. 2009;15(21):6709-6715. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0536

<sup>208</sup> Xie H, Audette C, Hoffee M, Lambert JM, Blättler W. Erratum: Pharmacokinetics and biodistribution of the antitumor immunoconjugate, cantuzumab mertansine (huC242-DM1), and its two components in mice (*Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (2004) 308 (1073-1082)). *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;310(2):844. doi:10.1124/jpet.103.060533.Cantuzumab

<sup>209</sup> Walles M, Rudolph B, Wolf T, et al. New insights in tissue distribution, metabolism, and excretion of [ $^3\text{H}$ ]-labeled antibody maytansinoid conjugates in female tumor-bearing nude rats. *Drug Metab Dispos*. 2016;44(7):897-910. doi:10.1124/dmd.115.069021

<sup>210</sup> Shen B-Q, Bumbaca D, Saad O, et al. Catabolic Fate and Pharmacokinetic Characterization of Trastuzumab Emtansine (T-DM1): an Emphasis on Preclinical and Clinical Catabolism. *Curr Drug Metab*. 2012;13(7):901-910. doi:10.2174/138920012802138598

<sup>211</sup> Saad OM, Shen BQ, Xu K, Khojasteh SC, Girish S, Kaur S. Bioanalytical approaches for characterizing catabolism of antibody-drug conjugates. *Bioanalysis*. 2015;7(13):1583-1604. doi:10.4155/bio.15.87

<sup>212</sup> Alley SC, Zhang X, Okeley NM, et al. The pharmacologic basis for antibody-auristatin conjugate activity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;330(3):932-938. doi:10.1124/jpet.109.155549

l'iode 131 (<sup>131</sup>I) par comptage gamma<sup>213</sup>. Aussi, l'utilisation de l'autoradiographie quantitative a été appliquée à l'étude de la biodistribution dans la tumeur d'un anticorps marqué à l'indium 111 conjugué à la MMAE marquée au tritium, où le signal du tritium a été acquis après un délai de plus de dix demi-vies de l'indium 111 (2,8 jours)<sup>214</sup>.

Des technologies d'imagerie *in vivo* non invasives telles que la tomographie par émission de positrons (TEP) et la tomographie par émission monophotonique (TEMP) ont également été employées pour déterminer la biodistribution des ADC dans le corps entier, en utilisant un radiomarquage de l'anticorps au zirconium 89 ou à l'indium 111 respectivement<sup>215,216,217</sup>. Une autre méthode alternative, basée sur la tomographie moléculaire de fluorescence (FMT pour Fluorescence Molecular Tomography) a également été décrite pour l'évaluation de la biodistribution d'un ADC dont l'anticorps porte un fluorophore dans le proche infrarouge<sup>218</sup>.

Chacune de ces méthodes décrites pour évaluer la biodistribution des ADC présentent des limitations. En effet, les méthodes d'analyse *ex vivo* des homogénats ou des coupes de certains tissus ne fournissent aucune information sur la distribution dans l'ensemble du corps, qui pourrait toutefois être déterminante pour évaluer l'efficacité et la toxicité. En revanche, les méthodes d'imagerie *in vivo* comme la TEP ou la TEMP permettent une évaluation de la biodistribution globale des conjugués dans les temps permis par la demi-vie des radioisotopes utilisés (deux à trois jours). Cependant, l'imagerie duale des deux composants de l'ADC n'est

---

<sup>213</sup> Cohen R, Vugts DJ, Visser GWM, et al. Development of novel ADC: Conjugation of tubulysin analogues to trastuzumab monitored by dual radiolabeling. *Cancer Res.* 2014;74(20):5700-5710. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1141

<sup>214</sup> Ilovich O, Qutaish M, Hesterman JY, et al. Dual-isotope cryoimaging quantitative autoradiography: Investigating antibody-drug conjugate distribution and payload delivery through imaging. *J Nucl Med.* 2018;59(9):1461-1466. doi:10.2967/jnumed.118.207753

<sup>215</sup> Boswell CA, Yadav DB, Mundo EE, et al. Biodistribution and efficacy of an anti-TENB2 antibody-drug conjugate in a patient-derived model of prostate cancer. *Oncotarget.* 2019;10(58):6234-6244. doi:10.18632/oncotarget.27263

<sup>216</sup> Boswell CA, Mundo EE, Zhang C, et al. Differential effects of predosing on tumor and tissue uptake of an <sup>111</sup>In-labeled anti-TENB2 antibody-drug conjugate. *J Nucl Med.* 2012;53(9):1454-1461. doi:10.2967/jnumed.112.103168

<sup>217</sup> ter Weele EJ, van Scheltinga AGTT, Kosterink JGW, et al. Imaging the distribution of an antibody-drug conjugate constituent targeting mesothelin with <sup>89</sup>Zr and IRDye 800CW in mice bearing human pancreatic tumor xenografts. *Oncotarget.* 2015;6(39):42081-42090. doi:10.18632/oncotarget.5877

<sup>218</sup> Giddabasappa A, Gupta VR, Norberg R, et al. Biodistribution and targeting of anti-5t4 antibody-drug conjugate using fluorescence molecular tomography. *Mol Cancer Ther.* 2016;15(10):2530-2540. doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-1012

pas réalisable par ces méthodes, car l'utilisation de deux radioéléments reste difficile en raison des interférences entre les différentes énergies. De plus, bien que les méthodes d'imagerie quantitative permettent une grande sensibilité de détection, elles ne fournissent aucune information sur l'identité des espèces radiomarquées présentes dans les tissus, et doivent donc être associées à une méthode de caractérisation. Ainsi, il a été montré que l'extraction des tissus suivie d'une analyse par SEC-HPLC ou HPLC couplée à un détecteur de radioactivité peut en partie pallier ce problème<sup>219,220</sup>. En tout état de cause, qu'il s'agisse d'un simple ou d'un double marquage, ces méthodes nécessitent toutes l'utilisation de radio-isotopes coûteux et d'installations spécialisées.

### 2.3.2 Les méthodes "label-free"

Pour pallier les problèmes associés à l'utilisation d'isotopes radioactifs, des méthodes alternatives utilisant la spectrométrie de masse ont aussi été développées. Une première méthode a été décrite pour la quantification du métabolite Cys-MC-MMAF dans des homogénats de tumeurs, de foie, de poumon, de rein et de cœur. La quantification a été réalisée par une méthode LC-MS/MS en utilisant l'analogue Cys-MC-MMAD comme étalon interne<sup>221</sup>. La quantification directe du métabolite Lys-MCC-DM1 sur des coupes de tumeur et de foie a aussi été effectuée par une méthode d'extraction liquide suivie d'une analyse par LC-MS/MS (LESA-LC-MS/MS pour Liquid Extraction Surface Analysis Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)<sup>225</sup>. L'avantage principal de l'utilisation de la spectrométrie de masse est la possibilité d'obtenir des données qualitatives et quantitatives de plusieurs analytes simultanément en une seule acquisition. Cependant, la spectrométrie de masse reste moins sensible que la détection des isotopes radioactifs, ce qui peut être une limitation à la

---

<sup>219</sup> Walles M, Rudolph B, Wolf T, et al. New insights in tissue distribution, metabolism, and excretion of [<sup>3</sup>H]-labeled antibody maytansinoid conjugates in female tumor-bearing nude rats. *Drug Metab Dispos.* 2016;44(7):897-910. doi:10.1124/dmd.115.069021

<sup>220</sup> Shen B-Q, Bumbaca D, Saad O, et al. Catabolic Fate and Pharmacokinetic Characterization of Trastuzumab Emtansine (T-DM1): an Emphasis on Preclinical and Clinical Catabolism. *Curr Drug Metab.* 2012;13(7):901-910. doi:10.2174/138920012802138598

<sup>221</sup> Leal M, Wentland JA, Han X, et al. Preclinical Development of an anti-5T4 Antibody-Drug Conjugate: Pharmacokinetics in Mice, Rats, and NHP and Tumor/Tissue Distribution in Mice. *Bioconj Chem.* 2015;26(11):2223-2232. doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00205

quantification de la faible quantité de cytotoxique effectivement délivrée dans les tissus. De plus, aucune application de la spectrométrie de masse à l'étude de la biodistribution du composant anticorps des ADC n'a été décrite à ce jour.

## 2.4 L'APPORT DE LA RADIO-IMAGERIE BÊTA HAUTE RÉOLUTION

Depuis longtemps, la radioactivité est un outil indispensable en recherche qui est utilisé pour le marquage et le suivi de molécules. Elle peut être utilisée *ex vivo* pour étudier la localisation des molécules au sein de coupes de tissus ou *in vivo* pour caractériser divers processus biologiques. Puisque les particules bêta ne peuvent pas traverser le corps des animaux ou les couches épaisses de tissus, la radioactivité bêta est adaptée pour l'analyse sur coupes fines de tissus, tandis que la radioactivité gamma - plus énergétique - est associée à la détection externe *in vivo*.

### 2.4.1 De l'autoradiographie vers la radio-imagerie bêta

L'autoradiographie a été la première technique d'imagerie bêta à avoir été développée. Le mot autoradiographie vient du fait que l'échantillon n'est pas placé entre la source de rayonnement et le détecteur comme en radiographie, mais qu'il contient en lui-même cette source de rayonnement. Le principe de fonctionnement de la méthode repose sur le fait que les radiations provenant de l'échantillon biologique interagissent avec l'émulsion photographique en contact avec ce dernier pour former une image latente. Celle-ci est ensuite révélée chimiquement sous la forme d'une distribution de grains d'argent, dont la densité est directement liée à la concentration radioactive locale, ce qui permet d'obtenir une image de la localisation de la radioactivité dans l'échantillon<sup>222</sup>.

En 1954, Ullberg introduit la technique d'autoradiographie sur corps entier (WBA pour Whole Body Autoradiography) en réalisant une image autoradiographique d'une coupe longitudinale

---

<sup>222</sup> Barthe N, Maîtrejean S, Cardona A. High-Resolution Beta Imaging.; 2012. doi:10.1016/B978-0-12-384873-4.00019-0

d'animal lors de l'étude de la biodistribution de la benzypénicilline marquée au soufre  $^{35}$ <sup>245</sup>. Cette étude a été accompagnée par le développement du premier microtome capable de découper des tranches de cent microns d'épaisseur. L'avantage principal de cette technique est qu'elle permet une analyse bidimensionnelle d'une coupe de tissu avec une très grande résolution spatiale, de l'ordre du micron, voire du dixième de micron suivant les conditions utilisées : énergie des rayonnements, type et épaisseur d'émulsion. Cependant, la sensibilité de l'autoradiographie est directement liée au temps de pose pour obtenir l'image, qui est généralement de plusieurs semaines, pouvant aller jusqu'à plusieurs mois dans le cas de rayonnements de faible énergie comme le tritium.

En 1975, Luckey a permis une avancée majeure pour la WBA, en développant les écrans au phosphore qui possèdent des propriétés nettement supérieures aux émulsions photographiques en termes de sensibilité aux rayonnements<sup>223</sup>. Cette technologie, appelée autoradioluminographie, permet d'obtenir dans un temps dix fois plus court des images dont l'analyse permet la détermination directe de la quantité de radioactivité au sein des tissus ; ce qui a conduit par la suite au développement de l'autoradiographie quantitative sur corps entier (QWBA pour Quantitative Whole Body Autoradiography). Cependant, à l'instar des émulsions photographiques, les écrans au phosphore ne produisent que des images latentes, qui nécessitent une étape de révélation pour donner les images finales. Ainsi, l'exposition des échantillons se fait en aveugle, et bien souvent cette méthode rencontre des problèmes liés aux phénomènes de surexposition ou de sous-exposition. Il est également important de noter que le mode de détection de cette technologie est basé sur une mesure de la quantité d'énergie émise par l'échantillon. Ainsi, les émetteurs bêta de très faible énergie comme le tritium, qui est un radioélément fondamental en recherche biomédicale, sont mal détectés par ce dispositif.

L'analyse bidimensionnelle d'un émetteur bêta par autoradiographie est une méthode très ancienne qui est encore largement utilisée de nos jours. Cependant, elle est aujourd'hui en concurrence avec la radio-imagerie digitale, qui s'est développée en même temps que les

---

<sup>223</sup> Barthe N, Maîtrejean S, Cardona A. *High-Resolution Beta Imaging.*; 2012. doi:10.1016/B978-0-12-384873-4.00019-0

nouvelles technologies, et qui connaît un essor important en tant qu'outil de recherche depuis une vingtaine d'années.

## **2.4.2 Le BetaIMAGER™, un dispositif de radio-imagerie bêta digitale**

La technique classique sur film ou émulsions photographiques est aujourd'hui supplantée par des radio-imageurs très performants. Le BetaIMAGER™ développé par la société Biospace Lab est l'un des dispositifs les plus utilisés aujourd'hui.

### *2.4.2.1 Principe de fonctionnement du BetaIMAGER™*

Le BetaIMAGER™ est un dispositif de radio-imagerie digitale basé sur une technologie initialement développée par Georges Charpak pour la physique des particules (prix Nobel de physique en 1992), qui a été adaptée à la détection des particules bêta pour la radio-imagerie. Il s'agit d'un détecteur gazeux à scintillation appelé chambre à avalanches à faces parallèles, couplé à une caméra CCD intensifiée comme système d'acquisition<sup>224</sup> (Figure 25). Le principe de fonctionnement du BetaIMAGER™ est basé sur l'exploitation d'un gaz scintillant qui est un mélange d'argon et de triéthylamine. La chambre à gaz du détecteur est composée de deux grilles parallèles distantes de 5 mm, entre lesquelles règne un champ électrique intense (5,3 kV/cm). L'échantillon est introduit dans la chambre au contact de la grille inférieure. Les particules bêta émises par l'échantillon dans la chambre à gaz entraînent l'ionisation du mélange de gaz. Sous l'effet du champ électrique, ce phénomène d'ionisation est accéléré et les collisions successives qui sont générées produisent une avalanche d'électrons qui entraîne l'émission d'un signal lumineux par le mélange de gaz scintillant. La caméra CCD intensifiée enregistre ensuite chaque spot lumineux émis de cette façon pour chaque particule émise par l'échantillon biologique dans la chambre à gaz. Une fois que le signal vidéo de la caméra a été digitalisé, un algorithme de reconstruction permet de calculer les coordonnées spatiales de chacune des particules émises. L'analyse de chaque particule détectée donne, après une

---

<sup>224</sup> Biospace Lab. *β IMAGER™ User guide*. 2007:1-56.

accumulation du signal dans le temps, une image de la distribution spatiale en temps réel de l'activité de l'échantillon.

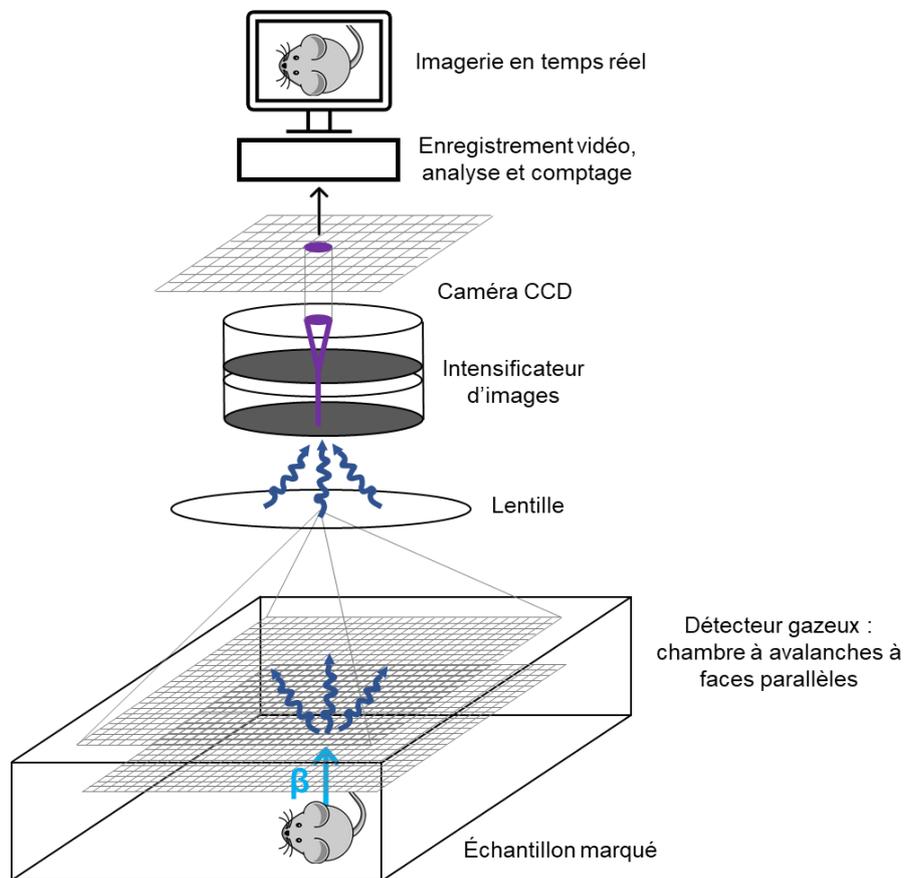


Figure 25 -Schéma du principe général de fonctionnement du BetaIMAGER™.

#### 2.4.2.2 Avantages et limitations du BetaIMAGER™

La radio imagerie bêta présente un certain nombre d'avantages par rapport à l'autoradiographie sur films photographique, que ce soit en termes de temps d'acquisition, de sensibilité de détection ou de quantification.

Contrairement à l'autoradiographie qui mesure la quantité d'énergie émise par l'échantillon, ce qui implique que chaque particule émise contribue au signal proportionnellement à son énergie, la radio-imagerie quantifie le nombre de particules qui sont émises dans le temps par l'échantillon. Ce système de détection est un avantage majeur puisqu'il permet la détection de

tous les rayonnements de type bêta, même ceux de faible énergie, et en particulier ceux du tritium<sup>225</sup>.

Un autre avantage majeur de la radio-imagerie digitale est qu'elle permet une visualisation en temps réel de l'image correspondant à l'acquisition en cours à mesure que les désintégrations se produisent, contrairement à l'autoradiographie qui forme une image latente qui ne sera visualisable qu'après une étape de révélation. Cette visualisation en temps réel permet d'éviter tous les problèmes de sous-exposition ou de surexposition. De plus, cela permet aussi d'adapter le temps d'acquisition en fonction de l'activité de l'échantillon, pour obtenir l'image la plus adaptée en attendant le nombre de désintégrations requis. Cette propriété peut être particulièrement utile dans un contexte où la quantité de radioactivité contenue dans l'échantillon est inconnue.

Les performances du BetaIMAGER™ en termes de sensibilité de détection et de linéarité de quantification donnent également un réel intérêt à ce type de détecteur en tant que nouveau moyen d'imagerie rapide en temps réel. En effet, les seuils de détection sont de 0,007 cpm/mm<sup>2</sup> et de 0,01 cpm/mm<sup>2</sup> pour le tritium et le carbone 14 respectivement<sup>226</sup>. Cette sensibilité est notamment due à l'insensibilité totale du détecteur aux rayonnements gamma, ce qui permet un bruit quasiment nul pour un certain nombre de radioéléments. La haute sensibilité du BetaIMAGER™ permet de réduire considérablement le temps d'acquisition des données, particulièrement pour le tritium où la rapidité de détection est jusqu'à cinq cent fois supérieure à celle d'un film photographique. De plus, la linéarité de quantification de la radio-imagerie établie avec des sources étalons calibrées a été jugée supérieure à 10<sup>4</sup>, ce qui représente une gamme dynamique plus large par rapport à l'autoradiographie (10<sup>2</sup>).

Néanmoins, bien qu'il soit possible d'optimiser la résolution spatiale du BetaIMAGER™ en réalisant des acquisitions en zoom optique, celle-ci demeure inférieure à celle de l'autoradiographie classique à l'aide d'émulsions photographiques. La résolution dépend de

---

<sup>225</sup> Barthe N, Maîtrejean S, Cardona A. *High-Resolution Beta Imaging.*; 2012. doi:10.1016/B978-0-12-384873-4.00019-0

<sup>226</sup> Biospace Lab. *β IMAGER™ User guide.* 2007:1-56.

l'énergie du rayonnement mais n'excède pas cinquante microns pour le tritium et cent microns pour le carbone 14.

### **2.4.3 Un outil puissant pour la multi détection**

La radio-imagerie digitale a la capacité de différencier plusieurs isotopes au sein d'un échantillon biologique. Pour cela, il faut nécessairement qu'il y ait des distinctions dans leurs propriétés, qui peuvent soit concerner l'énergie d'émission de la particule, ou soit la période de décroissance radioactive de l'élément.

#### *2.4.3.1 Séparation selon les énergies*

Une propriété intéressante du BetaIMAGER™ est sa capacité à distinguer les différents isotopes radioactifs par l'analyse de l'énergie émise par les différentes particules bêta<sup>227</sup>. En effet, les critères morphologiques des spots lumineux enregistrés par la caméra CCD, tels que la surface, l'intensité lumineuse ou l'ellipticité, donnent des informations sur l'énergie de la particule détectée. Pour les isotopes de faible énergie comme le tritium, les spots lumineux apparaissent ronds, brillants et au contour bien défini, tandis que les isotopes de plus haute énergie se présentent sous la forme de tâches plus diffuses et dont la luminosité est plus faible. Avec ce dispositif, il devient donc possible de séparer les différents isotopes en enregistrant les caractéristiques des spots lumineux pour chaque événement de désintégration, grâce à des algorithmes de reconnaissance de ces critères. Cette propriété de la radio-imagerie ouvre de nouveaux horizons vers le double marquage d'échantillons, ce qui donne un réel intérêt à ce système en tant que dispositif d'imagerie pour de nouvelles applications. Toutefois, les énergies maximales des différents isotopes doivent être éloignées les unes des autres pour que l'algorithme puisse s'appliquer. Ainsi, le nombre de couples d'isotopes candidats pour une telle séparation est tout de même limité. Un couple optimal est, par exemple, constitué par le tritium

---

<sup>227</sup> Barthe N. High-resolution beta imaging. *Med Nucl.* 2007;31(4 SPEC. ISS.):193-201.  
doi:10.1016/j.mednuc.2007.03.004

( $E_{\max} = 18 \text{ keV}$ ) et le carbone 14 ( $E_{\max} = 156 \text{ keV}$ ). Des références de chacun des isotopes purs sont également nécessaires pour définir les critères lumineux de chacun.

#### 2.4.3.2 Séparation selon les temps de demi-vie

Également, si l'on utilise des isotopes de demi-vie différentes, il devient possible de les distinguer en se basant sur les différences de vitesses de décroissance radioactive<sup>250</sup>. Ainsi, une première acquisition à un temps précoce, permet d'enregistrer les signaux cumulés des deux radioéléments, tandis qu'une deuxième acquisition plus tardive de même durée ne représentera que le signal émis par l'isotope de plus longue période. Par traitement des données, la soustraction de ce dernier à l'image initiale, permet de faire apparaître le signal correspondant à l'isotope de courte période. Les périodes de demi-vie des éléments doivent être suffisamment éloignées pour que cette séparation puisse s'appliquer. L'inconvénient majeur de cette méthode est qu'il est nécessaire d'attendre plusieurs demi-vies de l'isotope de courte période avant de procéder à la seconde acquisition et obtenir le résultat final ; ce qui peut nécessiter plusieurs mois, contrairement à la séparation par énergie d'émission de la particule qui est instantanée.

## 3 MMP-14 – UNE CIBLE THÉRAPEUTIQUE DANS LE TRAITEMENT DE CANCER

---

### 3.1 LES MÉTALLOPROTÉASES MATRICIELLES

#### 3.1.1 Fonctions biologiques

Les métalloprotéases matricielles (MMP pour Matrix MetalloProteinases) appartiennent à la superfamille des metzincines. Ce sont des endopeptidases dont l'activité catalytique est caractérisée par la dépendance à un ion  $Zn^{2+}$  retrouvé au sein de leur site catalytique (Figure 26). Les MMP sont des enzymes qui régulent l'activité cellulaire en catalysant la dégradation des composants de la matrice extracellulaire ainsi que celle des composants non matriciels<sup>228</sup>. Ces protéases sont peu exprimées dans les tissus sains, et leur activité n'est en général pas détectable dans des conditions physiologiques normales. Cependant, leur taux d'expression est augmenté lors de différents processus physiologiques de remodelage tissulaire tels que l'embryogenèse, la croissance osseuse ou la cicatrisation cutanée. Par ailleurs, une augmentation importante de leur expression peut entraîner une activité protéolytique anarchique conduisant à des déséquilibres tissulaires. À ce titre, les MMP sont des acteurs majeurs dans le développement de certains cancers et de nombreuses pathologies à composante inflammatoire<sup>229,230</sup>.

---

<sup>228</sup> Sagi I, Gaffney JP. *Matrix Metalloproteinase Biology.*; 2015. doi:10.1002/9781118772287

<sup>229</sup> Sagi I, Talmi-Frank D, Arkadash V, Papo N, Mohan V. *Matrix metalloproteinase protein inhibitors: highlighting a new beginning for metalloproteinases in medicine.* *Met Med.* 2016;Volume 3:31-47. doi:10.2147/mnm.s65143

<sup>230</sup> Vandembroucke RE, Libert C. *Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition?* *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(12):904-927. doi:10.1038/nrd4390

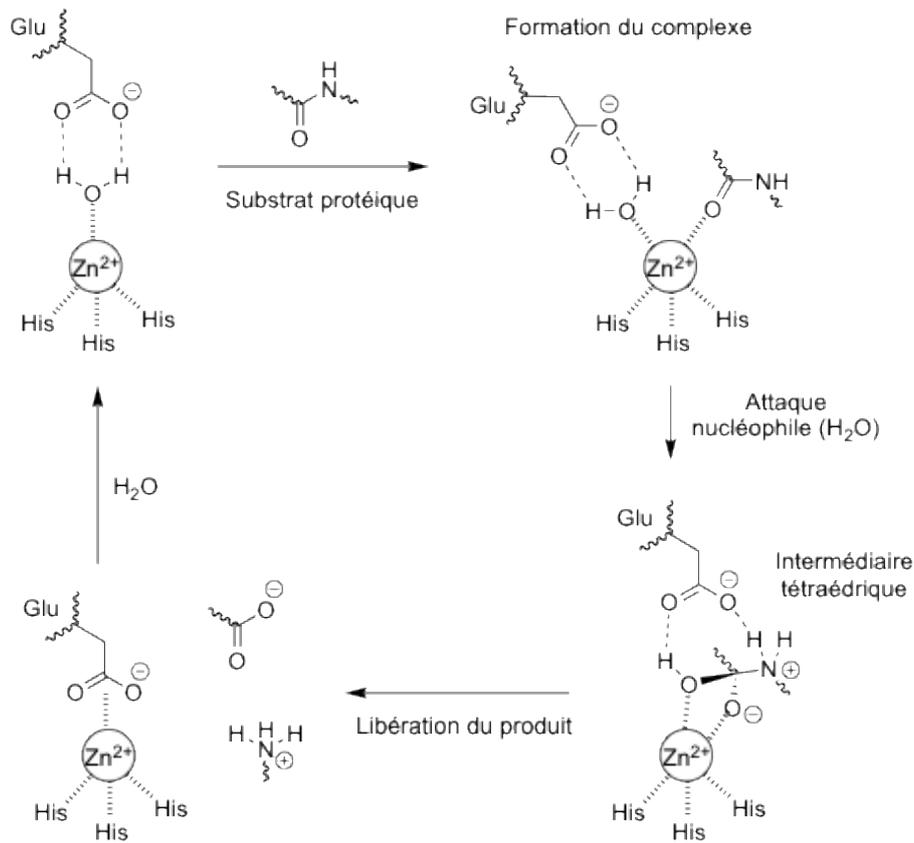


Figure 26 - Mécanisme réactionnel de la protéolyse catalysée par les MMP.

### 3.1.2 Classification

Chez l'homme, plus de vingt MMP ont été identifiées, et peuvent être classées en six groupes selon leur spécificité pour certains substrats et leur localisation cellulaire<sup>231</sup> : les collagénases (MMP-1, MMP-8 et MMP-13), les gélatinases (MMP-2 et MMP-9), les matrilysines (MMP-7 et MMP-26), les stromélysines (MMP-3, MMP-10 et MMP-11), les MMPs membranaires (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 et MMP-25) et un dernier groupe hétérogène (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23a/b, MMP-27 et MMP-28). Malgré une certaine spécificité de substrats pour chaque famille, le spectre protéolytique global est suffisamment étendu pour permettre la dégradation de l'ensemble des composants de la matrice extracellulaire.

<sup>231</sup> Sagi I, Gaffney JP. *Matrix Metalloproteinase Biology.*; 2015. doi:10.1002/9781118772287

### 3.1.3 Structure

Les MMP partagent une structure modulaire avec des éléments structuraux communs<sup>232</sup> (Figure 27). Parmi ceux-ci, on retrouve en N-terminal un peptide signal nécessaire à l'adressage intracellulaire de la protéase, le pro domaine contenant une séquence signature PRCGXPD et le domaine catalytique. Ce pro domaine s'étend dans la gorge catalytique contenant le site de coordination de l'ion Zn<sup>2+</sup>, formé par trois résidus histidine, bloquant l'accès au site catalytique et maintenant ainsi l'enzyme sous forme inactive (zymogène). Dans cette conformation, la fonction thiol de la cystéine du pro domaine joue le rôle de quatrième ligand du zinc. À l'exception des MMP-7, MMP-26, et MMP-23, on retrouve chez les autres MMP un quatrième domaine homologue à l'hémopexine, impliqué dans l'interaction avec le substrat et rattaché au domaine catalytique par une région flexible et riche en résidus proline. L'ancrage à la membrane cellulaire des MMP membranaires se fait *via* un domaine transmembranaire hydrophobe (MMP-14, MMP-15, MMP-16 et MMP-24) ou *via* un pont inositol phosphate (MMP-17 et MMP-25). La MMP-23, est structurellement différente des autres MMP, avec en C-terminal un domaine homologue immunoglobuline relié au domaine catalytique par une région riche en résidus cystéine. Par ailleurs, son ancrage à la membrane se fait *via* une séquence peptidique en N-terminal. La plupart des MMP sont activées à l'extérieur de la cellule par divers mécanismes, à l'exception des MMP-11, MMP-21, MMP-28 et des MMP membranaires activées en intracellulaire par la protéase à sérine furine.

---

<sup>232</sup> Sagi I, Gaffney JP. *Matrix Metalloproteinase Biology.*; 2015. doi:10.1002/9781118772287

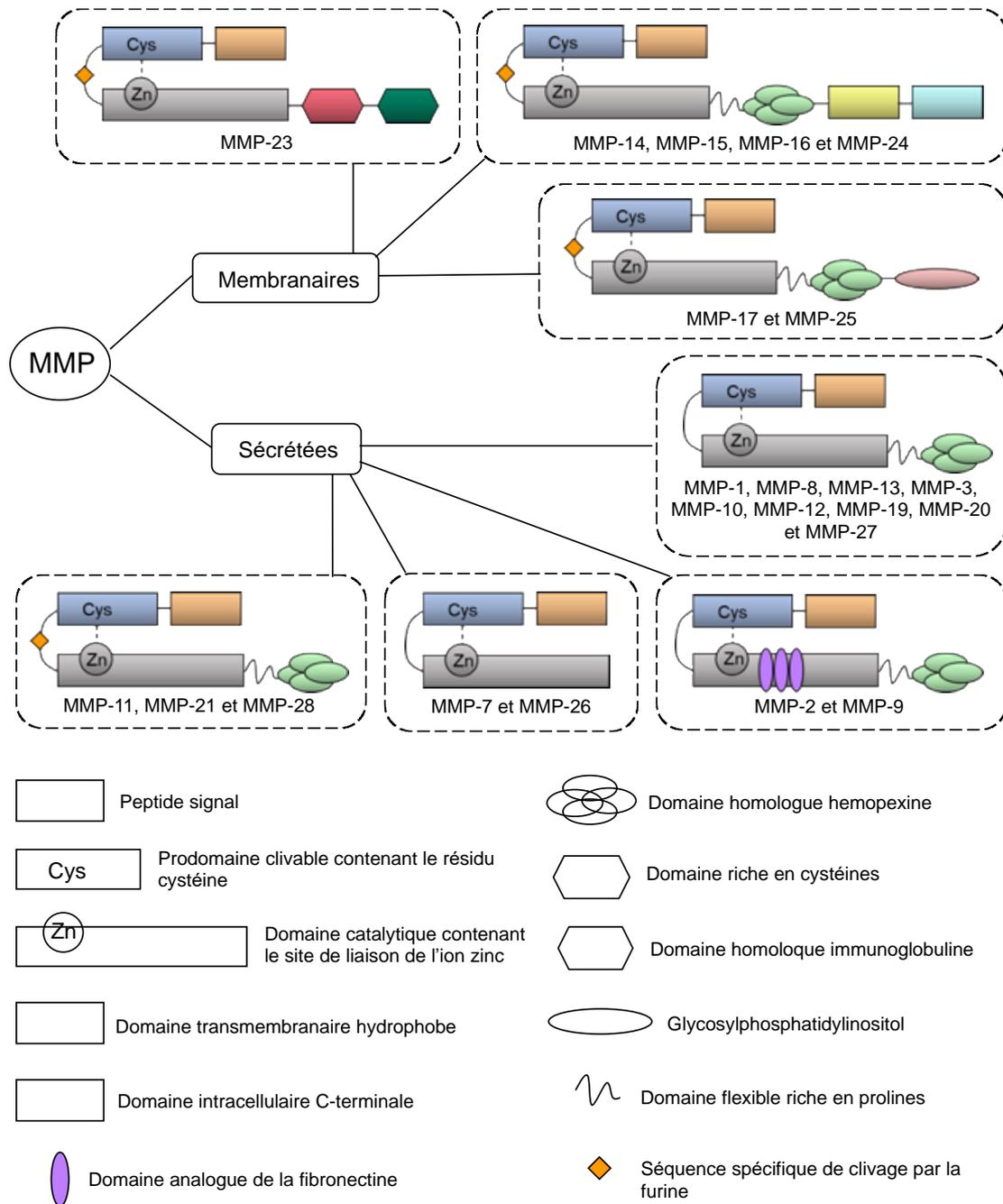


Figure 27 - Représentation schématique de la structure des protéases membres de la famille de MMP.

### 3.2 MMP-14, IMPLIQUÉE DANS LA PROLIFÉRATION MÉTASTATIQUE

La MMP-14 ou MT1-MMP (Membrane-Type 1 Matrix MetalloProteinase) est produite sous une forme zymogène inactive (~72 kDa), activée à l'intérieur de la cellule par coupure du pro

domaine par la furine au niveau du motif Arg108-Arg-Lys-Arg111<sup>233</sup> (Figure 28). La forme active de la MMP-14 (~60 kDa), commençant à la Tyr112, est ensuite acheminée jusqu'à la membrane cellulaire, où le domaine catalytique est exposé au milieu extracellulaire.

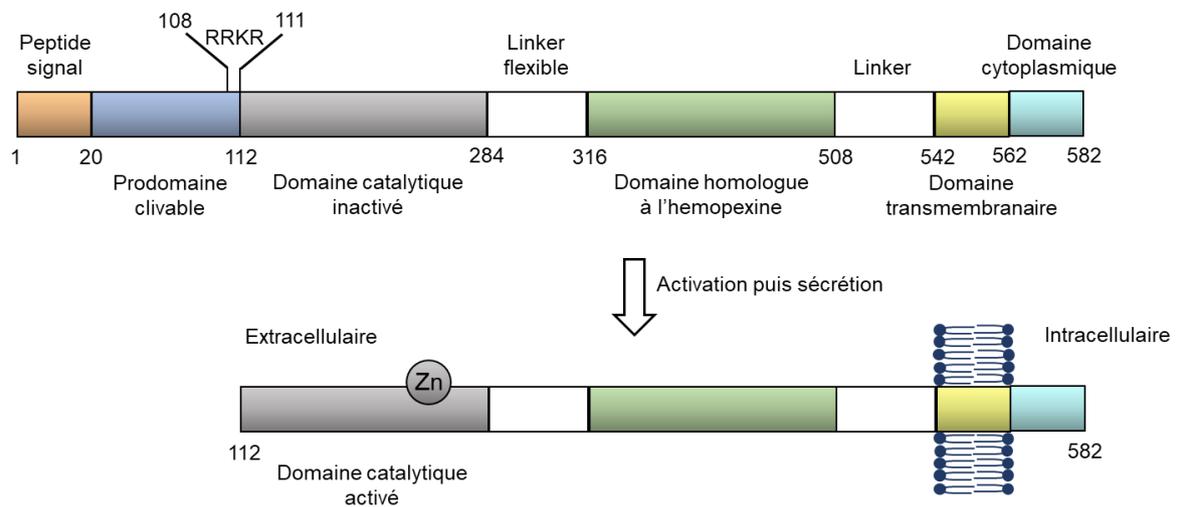


Figure 28 – Représentation des domaines structuraux de la ProMMP-14 et de la MMP-14.

La surexpression de la MMP-14 a été documentée dans de multiples types cellulaires : les cellules souches mésenchymateuses, les fibroblastes, les ostéoblastes, les ostéoclastes, les chondrocytes, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les adipocytes, les cellules myéloïdes, les neurones, les lymphocytes T et les lymphocytes B<sup>234</sup>. Considérant cette large expression de la MMP-14, une dérégulation de son activité protéolytique peut entraîner de multiples déséquilibres du microenvironnement cellulaire associés notamment au développement de certains cancers<sup>235</sup>.

<sup>233</sup> Sagi I, Gaffney JP. *Matrix Metalloproteinase Biology.*; 2015. doi:10.1002/9781118772287

<sup>234</sup> Itoh Y. *Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations.* *Matrix Biol.* 2015;44-46:207-223. doi:10.1016/j.matbio.2015.03.004

<sup>235</sup> Knapinska AM, Fields GB. *The expanding role of mt1-mmp in cancer progression.* *Pharmaceuticals.* 2019;12(2):15-20. doi:10.3390/ph12020077

## 3.2.1 Fonctions biologiques et implications dans le cancer

### 3.2.1.1 MMP-14 agit sur le micro-environnement cellulaire

La localisation transmembranaire de la MMP-14 lui confère la possibilité d'agir sur le comportement des cellules, en intervenant directement sur la réorganisation de l'espace péri cellulaire. Parmi les MMP transmembranaires, la MMP-14 présente la plus large spécificité de substrats au sein des composants de la matrice extracellulaire<sup>236</sup>. Considérée comme une collagénase membranaire, elle est la seule à pouvoir dégrader le collagène de type I, II et III, composants majoritaires de la matrice extracellulaire et premières barrières à la migration cellulaire<sup>237</sup>. La dégradation du collagène est essentielle, non seulement à la diffusion cellulaire dans le tissu, mais aussi à la croissance tumorale<sup>238</sup>.

### 3.2.1.2 MMP-14 favorise la migration cellulaire

La MMP-14 a été initialement découverte et caractérisée comme étant une protéase membranaire impliquée dans l'activation des ProMMP sécrétées sous leur forme inactive dans le milieu extracellulaire. L'activation de la ProMMP-2 par la MMP-14 a été largement étudiée. Ce mécanisme implique la formation d'un complexe tri moléculaire entre un homodimère de MMP-14, une protéine TIMP-2 (Tissue Inhibitor of MetalloProteinase 2) et la ProMMP-2<sup>239</sup> (Figure 29). Bien que TIMP-2 soit un inhibiteur endogène des MMP, il participe ici à la formation d'un complexe entre la MMP14 et son substrat, exacerbant ainsi l'activité catalytique de cette dernière. Dans un tel scénario, deux MMP-14 s'assemblent à la surface de la cellule pour former un homodimère, dont l'un des monomères est inhibé par le TIMP-2. La ProMMP-2 vient ensuite former un complexe trimoléculaire par interaction de son domaine hemopexine avec

---

<sup>236</sup> Itoh Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol.* 2015;44-46:207-223. doi:10.1016/j.matbio.2015.03.004

<sup>237</sup> Sagi I, Gaffney JP. *Matrix Metalloproteinase Biology.*; 2015. doi:10.1002/9781118772287

<sup>238</sup> Strongin AY. Proteolytic and non-proteolytic roles of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignancy. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2010;1803(1):133-141. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.04.009

<sup>239</sup> Hofmann UB, Westphal JR, Zendman AJW, Becker JC, Ruiter DJ, Van Muijen GNP. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type I matrix metalloproteinase (MTI-MMP) correlate with melanoma progression. *J Pathol.* 2000;191(3):245-256. doi:10.1002/1096-9896(2000)9999:9999::aid-path632>3.0.co;2-%23

l'extrémité C-terminal de TIMP-2. Dans cette configuration, la MMP-14 non inhibée peut venir hydrolyser la liaison Asn37-Leu38 au milieu du pro domaine de la ProMMP-2, induisant ensuite une auto-activation de la MMP-2. Contrairement à la MMP-14, la MMP-2 est capable de dégrader le collagène de type IV, constituant majoritaire de la lame basale<sup>260</sup>. Puisque les cellules cancéreuses ont besoin de traverser cette lame basale pour migrer et envahir d'autres organes, l'activation de la ProMMP-2 par la MMP-14 est considérée comme une étape clé de la prolifération métastatique<sup>240</sup>.

Il a également été démontré que la MMP-14 active la ProMMP-13 à la surface des cellules<sup>241</sup>. A ce jour, le mécanisme n'a pas été complètement élucidé, mais on sait que TIMP-2 n'intervient pas dans cette activation, tandis que le domaine hemopexine de la MMP-13 semble indispensable. A noter que, à l'instar de la MMP-14, la MMP-13 est une collagénase capable de dégrader le collagène de type I, II et III<sup>242</sup>. Etant donné que l'activité de la MMP-14 se restreint à l'espace péri cellulaire, l'activation de la MMP-13 permet une activité collagénase étendue au milieu extracellulaire, qui favorise la migration cellulaire.

### 3.2.1.3 MMP-14 stimule la motilité cellulaire

Initialement, le caractère invasif des cellules cancéreuses induit par l'expression de la MMP-14 était considéré comme dû à la dégradation de la matrice extracellulaire dans l'espace péri cellulaire. Cependant, il est devenu évident que l'ouverture d'un chemin au sein de la matrice extracellulaire ne suffit pas, et que la motilité cellulaire doit être stimulée pour provoquer la prolifération. CD44 et Syndecan-1 sont deux glycoprotéines transmembranaires impliquées dans l'adhérence à la fois intercellulaire mais aussi aux composants de la matrice extracellulaire. Le clivage par la MMP-14 de ces deux molécules d'adhésion a été décrit comme

---

<sup>240</sup> Sato H, Takino T. Coordinate action of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and MMP-2 enhances pericellular proteolysis and invasion. *Cancer Sci.* 2010;101(4):843-847. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01498.x

<sup>241</sup> Knäuper V, Bailey L, Worley JR, Soloway P, Patterson ML, Murphy G. Cellular activation of proMMP-13 by MT1-MMP depends on the C-terminal domain of MMP-13. *FEBS Lett.* 2002;532(1-2):127-130. doi:10.1016/S0014-5793(02)03654-2

<sup>242</sup> Sagi I, Gaffney JP. *Matrix Metalloproteinase Biology.*; 2015. doi:10.1002/9781118772287

étant directement corrélé au caractère pro-migratoire des cellules cancéreuses<sup>243,244</sup> (Figure 29). Bien que le mécanisme exact ne soit pas complètement identifié, la rupture du contact entre les cellules semble induire un remodelage du cytosquelette, nécessaire à la prolifération métastatique. L'implication indirecte de la MMP14 dans la promotion de la croissance et de la motilité cellulaire, par le biais des récepteurs à l'EGF (Epidermal Growth Factor) a également été démontrée. Dans ce cas, la MMP-14 clive la Lamiline-5, une glycoprotéine constituante de la lame basale, libérant ainsi un fragment analogue à l'EGF capable de venir interagir avec les récepteurs à l'EGF à la surface des cellules cancéreuses<sup>245</sup>.

#### 3.2.1.4 MMP-14 favorise l'angiogenèse

L'angiogenèse est le processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, permettant un approvisionnement en sang indispensable à de nombreux processus physio et pathologiques, notamment à la croissance tumorale. Ce mécanisme d'invasion cellulaire repose principalement sur les cellules endothéliales, qui, en se désolidarisant les unes des autres prolifèrent pour générer une structure tubulaire. La MMP-14 favorise l'angiogenèse à la fois en dégradant la matrice extracellulaire altérant ainsi les barrières à la migration des cellules endothéliales<sup>246</sup>, mais également en stimulant ce processus au niveau cellulaire. Dans ce cas, elle intervient de manière non-protéolytique *via* son domaine cytoplasmique dans des mécanismes de signalisation cellulaire. Il a ainsi été montré que la MMP-14 régule la fonction de VEGFR-2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) en formant un complexe bimoléculaire avec celui-ci<sup>247</sup> (Figure 29). Le complexe MMP-14-VEGFR-2 s'associe ensuite à la tyrosine kinase Src qui induit l'activation de Akt puis de mTOR par

---

<sup>243</sup> Kajita M, Itoh Y, Chiba T, et al. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol.* 2001;153(5):893-904. doi:10.1083/jcb.153.5.893

<sup>244</sup> Endo K, Takino T, Miyamori H, et al. Cleavage of Syndecan-1 by Membrane Type Matrix Metalloproteinase-1 Stimulates Cell Migration. *J Biol Chem.* 2003;278(42):40764-40770. doi:10.1074/jbc.M306736200

<sup>245</sup> Koshikawa N, Minegishi T, Sharabi A, Quaranta V, Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) is a processing enzyme for human laminin  $\gamma$ 2 chain. *J Biol Chem.* 2005;280(1):88-93. doi:10.1074/jbc.M411824200

<sup>246</sup> Itoh Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol.* 2015;44-46:207-223. doi:10.1016/j.matbio.2015.03.004

<sup>247</sup> Eisenach PA, Roghi C, Fogarasi M, Murphy G, English WR. MT1-MMP regulates VEGF-A expression through a complex with VEGFR-2 and Src. *J Cell Sci.* 2010;123(23):4182-4193. doi:10.1242/jcs.062711

phosphorylation, conduisant ainsi à une augmentation de la sécrétion du facteur de croissance pro-angiogénique VEGF-A.

### 3.2.2 Régulation de l'activité de la MMP-14

#### 3.2.2.1 Localisation

La dégradation de la matrice extracellulaire est indispensable à la migration des cellules au sein des tissus. Néanmoins, cette dégradation doit s'effectuer de manière polarisée afin de ne pas endommager l'intégralité du microenvironnement, support essentiel de l'activité cellulaire. Les cellules cancéreuses utilisent les filaments d'actine pour former une excroissance dans leur membrane plasmique, située au niveau du front de migration, appelé "*invadopodia*". Au sein de cette excroissance membranaire, la MMP-14 a été identifiée comme étant la protéase majoritaire<sup>248</sup> (Figure 29). Cette localisation privilégiée est guidée par l'association de la MMP-14 *via* son domaine hemopexine à la glycoprotéine d'adhésion cellulaire CD44, elle-même interagissant avec le cytosquelette d'actine par son domaine cytoplasmique<sup>249</sup>. La formation de ce complexe MMP-14-CD44 permet une association indirecte de la protéase aux filaments d'actine, et son acheminement jusqu'à "*l'invadopodia*".

#### 3.2.2.2 Dimérisation

A la surface de la cellule, deux MMP-14 forment un homo-dimère par interaction symétrique des domaines hemopexine entre eux. Il a été montré par mutation des acides aminés impliqués dans l'interaction, que la conformation dimérique est indispensable à l'activation de la ProMMP-2 par la MMP-14<sup>250</sup>. Il a aussi été démontré que l'incorporation de ces mutations

---

<sup>248</sup> Nakahara H, Howard L, Thompson EW, et al. Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(15):7959-7964. doi:10.1073/pnas.94.15.7959

<sup>249</sup> Mori H, Tomari T, Koshikawa N, et al. CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain. *EMBO J*. 2002;21(15):3949-3959. doi:10.1093/emboj/cdf411

<sup>250</sup> Tochowicz A, Goettig P, Evans R, et al. The dimer interface of the membrane type 1 matrix metalloproteinase hemopexin domain: Crystal structure and biological functions. *J Biol Chem*. 2011;286(9):7587-7600. doi:10.1074/jbc.M110.178434

inhibe considérablement la dégradation du collagène et l'invasion cellulaire dans une matrice de collagène tridimensionnelle<sup>273</sup>. Le développement d'un système de FRET, capable de détecter l'assemblage de deux MMP-14 dans les cellules, a permis de mettre en évidence que la dimérisation de la protéase est un processus dynamique, qui ne se produit qu'au niveau du front de migration lors de la migration cellulaire<sup>251</sup>. La dimérisation, opérée par le cytosquelette d'actine est donc un mécanisme régulateur, qui permet de contrôler l'activité protéolytique de la MMP-14 de manière polarisée à la surface de la cellule, lors de la migration cellulaire<sup>272</sup>.

### 3.2.2.3 Inhibition

La MMP-14 est présentée à la surface des cellules sous sa forme activée, son inhibition est donc un moyen essentiel pour réguler son activité protéolytique. On compte quatre TIMP (Tissue Inhibitors of MetalloProteinase) : TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4, inhibiteurs endogènes des MMP partageant une organisation structurale commune<sup>252</sup>. En outre, pour chacun, l'inhibition du site catalytique de la protéase se fait par l'extrémité N-terminal, sous la forme d'un complexe stœchiométrique de haute affinité. L'ensemble des TIMP inhibent les MMP sécrétées, à l'exception du TIMP-1, incapable de bloquer l'activité protéolytique des MMP membranaires<sup>253</sup>. Le TIMP-2 semble être l'inhibiteur endogène privilégié de la MMP-14 (Figure 29). Cependant, son activité inhibitrice n'est obtenue qu'à forte concentration et c'est son rôle activateur qui est favorisé à plus faible concentration<sup>254,255</sup>.

---

<sup>251</sup> Itoh Y, Palmisano R, Anilkumar N, Nagase H, Miyawaki A, Seiki M. Dimerization of MT1-MMP during cellular invasion detected by fluorescence resonance energy transfer. *Biochem J.* 2011;440(3):319-326. doi:10.1042/BJ20110424

<sup>252</sup> Sagi I, Gaffney JP. *Matrix Metalloproteinase Biology.*; 2015. doi:10.1002/9781118772287

<sup>253</sup> Itoh Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol.* 2015;44-46:207-223. doi:10.1016/j.matbio.2015.03.004

<sup>254</sup> Hofmann UB, Westphal JR, Zendman AJW, Becker JC, Ruiter DJ, Van Muijen GNP. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. *J Pathol.* 2000;191(3):245-256. doi:10.1002/1096-9896(2000)9999:9999::aid-path632>3.0.co;2-%23

<sup>255</sup> D'Alessio S, Ferrari G, Cinnante K, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 binding to membrane-type 1 matrix metalloproteinase induces MAPK activation and cell growth by a non-proteolytic mechanism. *J Biol Chem.* 2008;283(1):87-99. doi:10.1074/jbc.M705492200

RECK (REversion-inducing-Cysteine-rich protein with Kazal motifs), une protéine ancrée à la membrane, est également capable d'inhiber les métalloprotéases en général et les MMP en particulier. Il a notamment été montré que RECK était capable de bloquer l'activité protéolytique de la MMP-14, mais également de la MMP-2<sup>256</sup>.

La régulation de l'activité protéolytique de la MMP-14 peut se faire à l'intérieur de la cellule via son domaine cytoplasmique. En effet, il a été montré que la protéine MTCBP-1 (Membrane-Type 1 matrix metalloproteinase Cytoplasmic tail-Binding Protein-1) forme un complexe avec le domaine cytoplasmique de la MMP-14. Cette interaction rompt la liaison du domaine cytoplasmique de la protéase aux filaments d'actine, ce qui entraîne la délocalisation de la MMP-14 de "l'*invadopodia*"<sup>257</sup>, et qui induit une inhibition des activités pro-migratoires<sup>258</sup>.

#### 3.2.2.4 Endocytose et recyclage

L'endocytose est un processus fondamental de la vie cellulaire qui consiste en l'internalisation vers des compartiments intracellulaires de protéines membranaires, permettant ainsi de réguler leur activité. L'internalisation de la MMP-14 par des mécanismes d'endocytose dépendant de la clathrine a été décrite<sup>259</sup> (Figure 29). Quatre résidus du domaine cytoplasmique de la MMP-14 interviennent dans le mécanisme d'endocytose : la palmylation du résidu Cys574 est indispensable au processus, tandis que les trois résidus Leu571-Leu-Tyr573 interagissent avec AP2 (Adaptor Protein 2), complexe adaptateur à la clathrine, pour permettre l'internalisation de la protéine. Cette internalisation pourrait être considérée comme un mécanisme de régulation négative de l'activité protéolytique. Cependant, des

---

<sup>256</sup> Oh J, Takahashi R, Kondo S, et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell*. 2001;107(6):789-800. doi:10.1016/S0092-8674(01)00597-9

<sup>257</sup> Qiang L, Cao H, Chen J, et al. Pancreatic tumor cell metastasis is restricted by MT1-MMP binding protein MTCBP-1. *J Cell Biol*. 2019;218(1):317-332. doi:10.1083/jcb.201802032

<sup>258</sup> Uekita T, Gotoh I, Kinoshita T, et al. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail-binding protein-1 is a new member of the cupin superfamily: A possible multifunctional protein acting as an invasion suppressor down-regulated in tumors. *J Biol Chem*. 2004;279(13):12734-12743. doi:10.1074/jbc.M309957200

<sup>259</sup> Uekita T, Itoh Y, Yana I, Ohno H, Seiki M. Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity. *J Cell Biol*. 2001;155(7):1345-1356. doi:10.1083/jcb.200108112

données contradictoires laissent entendre que cette internalisation serait essentielle à l'activité pro-migratoire des cellules cancéreuses<sup>282</sup>.

Après l'internalisation, il a été démontré que la MMP-14 est transportée jusqu'au trans-Golgi par les endosomes précoces, avant d'être acheminée à nouveau à la surface de la cellule dans une durée de 60 minutes<sup>260</sup>. Les trois résidus de l'extrémité C-terminal Asp-Lys-Val582 sont requis pour permettre le recyclage de la protéase à la membrane.

### 3.2.2.5 Dégradation protéolytique

Bien qu'une partie de la MMP-14 internalisée soit recyclée à la surface cellulaire, il a été montré qu'une autre partie est transportée des endosomes précoces vers les lysosomes exprimant la glycoprotéine CD63 à leur surface<sup>261</sup> (Figure 29). Le domaine hemopexine de la MMP-14 interagit avec le domaine N-terminal de CD63, entraînant sa dégradation par protéolyse.

Outre cette dégradation lysosomale, la MMP-14 peut aussi être inactivée par dégradation à la membrane, causée par un mécanisme autocatalytique ou non-autocatalytique<sup>262</sup> (Figure 29). Le mécanisme autocatalytique se caractérise par l'hydrolyse de la liaison Gly284-Gly285 entre le domaine catalytique et le domaine hemopexine. Le domaine catalytique ainsi libéré est immédiatement clivé entre les résidus Ala255 et Ile256 conduisant à la formation d'un fragment final (environ 18 kDa) ne présentant aucune activité catalytique. Ainsi, cette dégradation autocatalytique a été identifiée comme étant un mécanisme spécifique d'élimination de l'activité catalytique de la MMP-14.

La dégradation non-autocatalytique de la MMP-14 à la surface cellulaire donne, quant à elle, plusieurs fragments solubles de 35 kDa, 50 kDa et 56 kDa, dont certains sont toujours capables

---

<sup>260</sup> Wang X, Ma D, Keski-Oja J, Pei D. Co-recycling of MT1-MMP and MT3-MMP through the trans-Golgi network: Identification of DKV582 as a recycling signal. *J Biol Chem.* 2004;279(10):9331-9336. doi:10.1074/jbc.M312369200

<sup>261</sup> Takino T, Miyamori H, Kawaguchi N, Uekita T, Seiki M, Sato H. Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;304(1):160-166. doi:10.1016/S0006-291X(03)00544-8

<sup>262</sup> Toth M, Hernandez-Barrantes S, Osenkowski P, et al. Complex pattern of membrane type 1 matrix metalloproteinase shedding. Regulation by autocatalytic cell surface inactivation of active enzyme. *J Biol Chem.* 2002;277(29):26340-26350. doi:10.1074/jbc.M200655200

de lier le TIMP-2, suggérant qu'ils contiennent un site catalytique intact. Ces mécanismes de dégradation permettent une régulation de l'activité de la MMP-14 dans l'espace péri cellulaire, en libérant différents fragments solubles actifs ou inactifs dans le milieu extracellulaire<sup>263</sup>.

---

<sup>263</sup> Toth M, Hernandez-Barrantes S, Osenkowski P, et al. Complex pattern of membrane type 1 matrix metalloproteinase shedding. Regulation by autocatalytic cell surface inactivation of active enzyme. *J Biol Chem.* 2002;277(29):26340-26350. doi:10.1074/jbc.M200655200

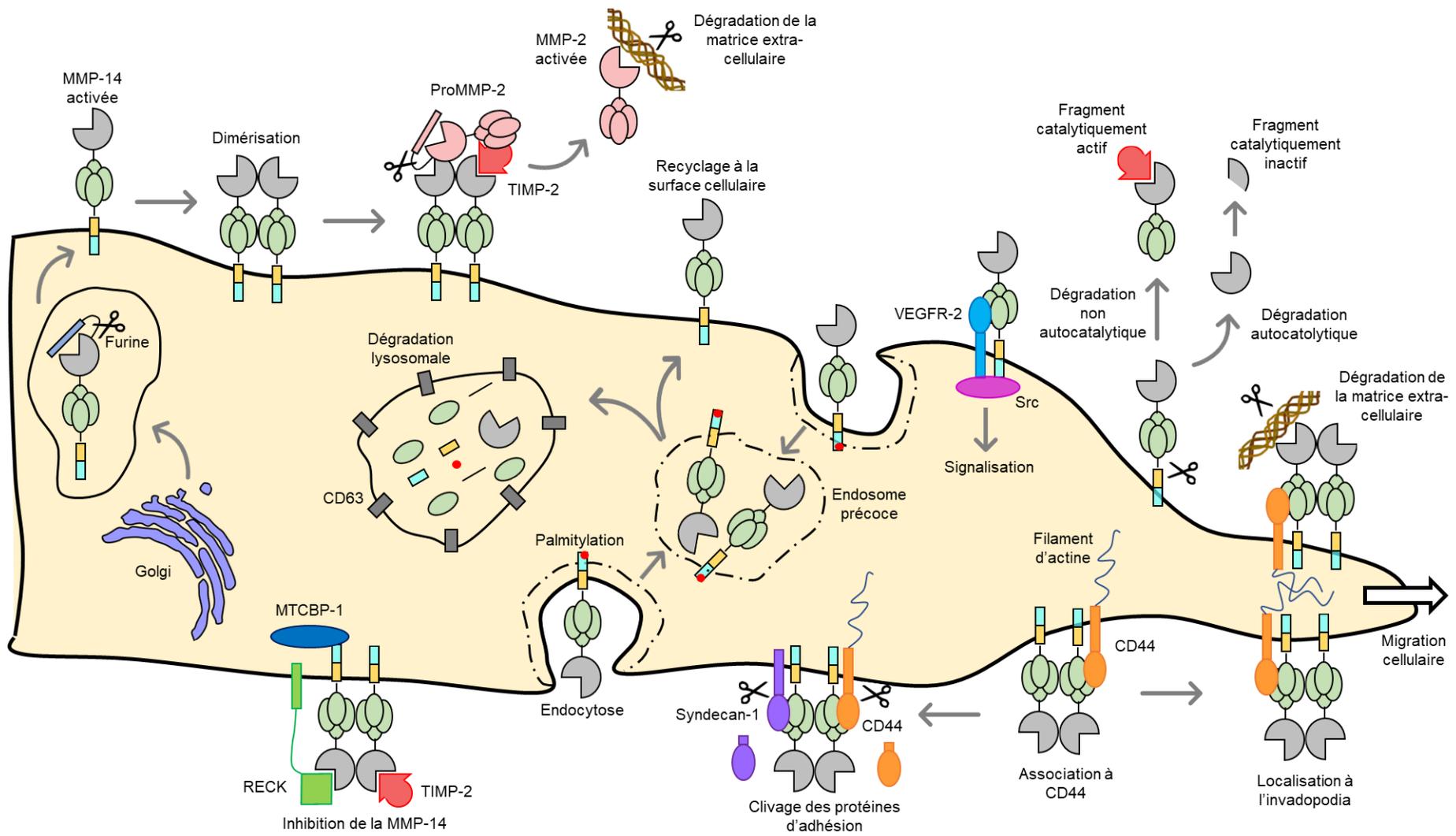


Figure 29 - Représentation schématique de l'activation, des fonctions et des mécanismes de régulation de la MMP-14 à la surface des cellules.

### 3.3 LES THÉRAPIES ANTI-CANCÉREUSES CIBLANT LA MMP-14

Dès la fin des années 80, les MMP ont été considérées comme des cibles thérapeutiques pertinentes dans le traitement de nombreux cancers, conduisant à l'évaluation de plus de cinquante inhibiteurs de MMP dans le cadre d'essais cliniques. Ces essais, dans l'ensemble décevants, ont non seulement mis en évidence le rôle complexe et ambivalent des MMP lors de la croissance tumorale, la prolifération métastatique, et l'angiogenèse, mais ont également montré qu'il était nécessaire de développer des approches ciblées afin d'interférer de façon plus spécifique ces protéases<sup>264,265</sup>.

#### 3.3.1 Les inhibiteurs à large spectre

Les premiers efforts dans le développement d'inhibiteurs synthétiques des MMP se sont concentrés sur des composés contenant un groupement chélateur interagissant spécifiquement avec l'ion  $Zn^{2+}$  catalytique. Plusieurs inhibiteurs compétitifs ont ainsi été synthétisés, pouvant être classés en deux catégories : les composés contenant une fonction acide hydroxamique et ceux contenant d'autres fonctions chélatantes.

##### 3.3.1.1 Les composés contenant une fonction acide hydroxamique

Les premiers inhibiteurs de type « hydroxamate » contenaient un squelette pseudo-peptidique inspiré de la séquence du collagène, substrat naturel des MMP, incorporant une fonction acide hydroxamique en N-ter (Figure 30A)<sup>266</sup>.

---

<sup>264</sup> Overall CM, Kleinfeld O. Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(3):227-239. doi:10.1038/nrc1821

<sup>265</sup> Shay G, Lynch C, Fingleton B. Moving targets: emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis. *Matrix Biol*. 2015;176(1):200-206. doi:10.1016/j.gde.2016.03.011

<sup>266</sup> Vandenbroucke RE, Libert C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(12):904-927. doi:10.1038/nrd4390

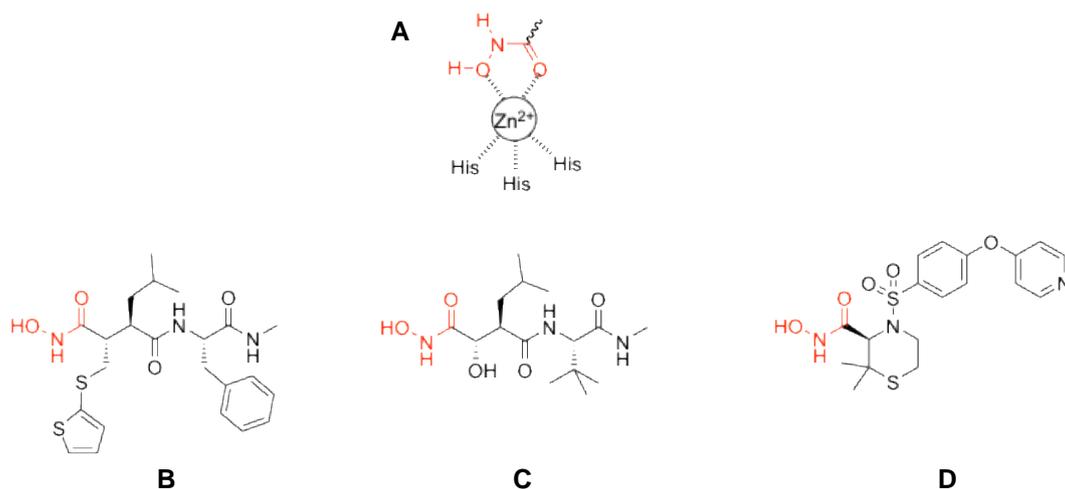


Figure 30 - Structure des inhibiteurs à large spectre contenant une fonction acide hydroxamique. (A) Le site catalytique des MMP contenant l'ion Zn<sup>2+</sup> chélaté par un acide hydroxamique. (B) Le Batimastat<sup>®</sup>. (C) Le Marimastat<sup>®</sup>. (D) Le Prinomastat<sup>®</sup>.

Le Batimastat<sup>®</sup> (Figure 30B) a été le premier inhibiteur de MMP à avoir accédé aux essais cliniques<sup>267</sup>. Plusieurs études précliniques ont montré une activité anti tumorale prometteuse dans différents modèles précliniques. Cependant, cette molécule a aussi montré une mauvaise solubilité dans les milieux aqueux, entraînant une faible biodisponibilité. Ces essais cliniques n'ont pas été poursuivis, et le Marimastat<sup>®</sup> (Figure 30C), présentant une meilleure biodisponibilité par voie orale a été développée<sup>268</sup>. Les résultats des essais cliniques ont été rapidement décevants, le Marimastat<sup>®</sup> étant inefficace à des doses déjà associées à des effets toxiques musculo-articulaires de type inflammatoires, et ont donc été arrêtés en phase III. Les effets secondaires qui ont été observés durant ces essais cliniques sont maintenant considérés comme ayant été causés par l'inhibition de métallo protéases de la famille des ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinases) et ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinases with Thrombospondin Motifs)<sup>269</sup>. En effet, il s'est révélé que l'acide hydroxamique est un puissant

<sup>267</sup> Rasmussen HS, McCann PP. Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: A review with special focus on Batimastat and Marimastat. *Pharmacol Ther.* 1997;75(1):69-75. doi:10.1016/S0163-7258(97)00023-5

<sup>268</sup> Rosenbaum E, Zahurak M, Sinibaldi V, et al. Marimastat in the treatment of patients with biochemically relapsed prostate cancer: A prospective randomized, double-blind, phase I/II trial. *Clin Cancer Res.* 2005;11(12):4437-4443. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2252

<sup>269</sup> Vandenbroucke RE, Libert C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(12):904-927. doi:10.1038/nrd4390

chélateur, réduisant la contribution de la partie peptidique lors de l'interaction, et faisant ainsi de ces molécules des inhibiteurs large spectre de l'ensemble des métalloprotéases.

Par la suite, une seconde génération de composés contenant toujours un acide hydroxamique ont été développés. La conception de ces inhibiteurs s'est notamment appuyée sur les nombreuses structures cristallographiques de MMP obtenues ces vingt dernières années. Le squelette pseudo-peptidique a ainsi été abandonné pour une structure non peptidique contenant une longue chaîne hydrophobe s'insérant dans la cavité S1' caractéristique des MMP (Figure 31). Bien que ces nouveaux inhibiteurs non peptidiques présentent une spécificité pour la famille des MMP parmi toutes les autres metzincines, ils restent cependant large spectre au sein cette famille. Un exemple de cette classe d'inhibiteurs qui a atteint le stade des essais cliniques est le Prinomastat® (Figure 30D). Les essais cliniques se sont cependant terminés prématurément notamment pour un manque de bénéfice thérapeutique de la molécule<sup>270</sup>.

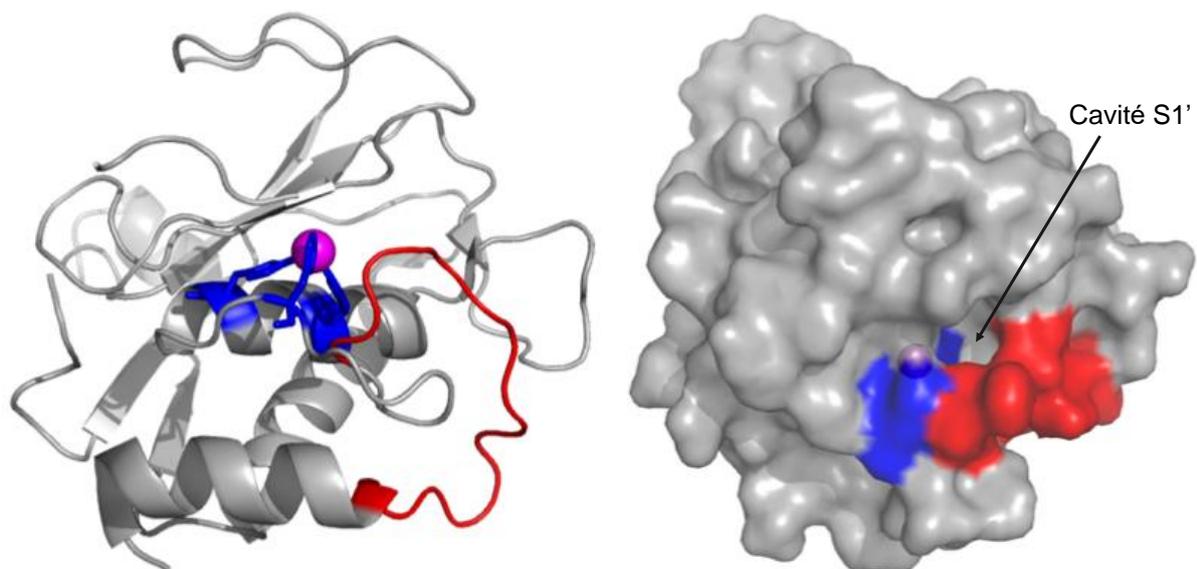


Figure 31 – Structure du domaine catalytique de la MMP-14. Au fond de la gorge catalytique, l'atome de zinc catalytique (sphère magenta) est chélaté par trois résidus histidine (en bleu). La cavité S1' formée par la boucle en rouge est ciblée par les inhibiteurs.

Créée à partir de : 1BUV.pdb

<sup>270</sup> Vandembroucke RE, Libert C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(12):904-927. doi:10.1038/nrd4390

### 3.3.1.2 Les composés contenant une autre fonction chélatante

Pour pallier la labilité métabolique et le fort pouvoir chélatant de l'acide hydroxamique, d'autres fonctions chimiques telles que les acides carboxyliques, les thiols, ou les phosphinates ont été utilisées. Par exemple, le Rebimastat® sélectif pour les MMP-1, -2, -3, -8, -9, -13 et -14, a été l'une des premières molécules de cette nouvelle classe d'inhibiteurs<sup>293</sup>. Il contient une fonction thiol chélatante et une structure non peptidique analogue du collagène (Figure 32A). Le Tanomastat® est, quant à lui, un inhibiteur des MMP-2, -3, -9, -13 et -14 contenant un acide carboxylique comme fonction chélatante et une longue chaîne hydrophobe s'insérant dans cavité S1' des MMP<sup>271</sup> (Figure 32B). Bien qu'aucune de ces deux molécules n'aient causé de douleurs musculo-articulaires durant les essais cliniques, le Tanomastat® a induit des perturbations hématologiques (anémie, thrombocytopenie, fluctuation des électrolytes), et le Rebimastat® est responsable de problèmes dermatologiques. Ces deux molécules ont été abandonnées par manque de bénéfice thérapeutique<sup>294</sup>.

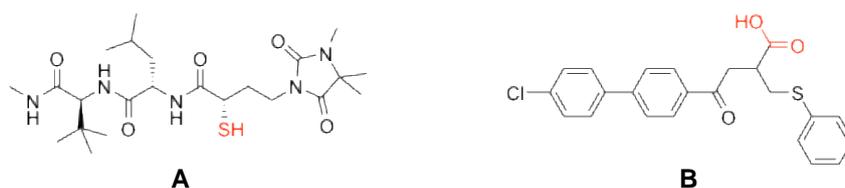


Figure 32 - Structure des inhibiteurs à large spectre des MMP contenant de nouvelles fonctions chélatantes. (A) le Rebimastat® et (B) le Tanomastat®.

L'échec de ces inhibiteurs large spectre en tant qu'anti-cancéreux ainsi que de nombreuses études dans des modèles précliniques ont rétrospectivement permis de mieux comprendre le rôle complexe des MMP dans le cancer. Il est aujourd'hui clair qu'une MMP donnée peut avoir un rôle ambivalent pouvant parfois résulter en une stimulation ou en une inhibition du développement tumoral, ce rôle pouvant évoluer selon le stade de la pathologie<sup>272</sup>. Par ailleurs, les études cliniques réalisées sur des patients atteints de cancer ont été effectuées à des stades

<sup>271</sup> Winer A, Adams S, Mignatti P. Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy: Turning past failures into future successes. *Mol Cancer Ther.* 2018;17(6):1147-1155. doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0646

<sup>272</sup> Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Ahmad R, Kaur G. Matrix metalloproteinases and cancer - Roles in threat and therapy. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2014;15(3):1085-1091. doi:10.7314/APJCP.2014.15.3.1085

avancés de la pathologie, pour lesquels les étapes impliquant les MMP (telles que l'angiogenèse ou la prolifération métastatique) s'étaient déjà produites<sup>273</sup>, suggérant qu'il faille intervenir à un stade précoce de la maladie.

Dans ce contexte, l'idée de cibler le site actif de l'ensemble des MMP, apparaissait comme une stratégie risquant de bloquer l'action bénéfique de certaines protéases. Des efforts considérables ont donc été faits depuis plusieurs années pour développer de nouvelles molécules, beaucoup plus sélectives n'interférant qu'avec les activités délétères de certaines MMP. La recherche pour le développement d'inhibiteurs sélectifs a par ailleurs évolué vers l'utilisation d'autres formats moléculaires comme les protéines, notamment les anticorps, capables d'interagir avec une plus grande surface d'interaction, pouvant ainsi conduire à une meilleure sélectivité<sup>274</sup>. Dans le cas de la MMP-14, ces nouveaux formats ont notamment permis d'accéder à des inhibiteurs compétitifs mais également à des inhibiteurs adoptant un autre mode d'action.

---

<sup>273</sup> Fields GB. *The Rebirth of Matrix Metalloproteinase Inhibitors: Moving Beyond the Dogma*. *Cells*. 2019;8(9):984. doi:10.3390/cells8090984

<sup>274</sup> Santamaria S, de Groot R. *Monoclonal antibodies against metzincin targets*. *Br J Pharmacol*. 2019;176(1):52-66. doi:10.1111/bph.14186

INHIBITEUR	STRUCTURE	CHÉLATANT	MMP CIBLÉES	OBSERVATIONS	RÉSULTAT
<b>Batimastat®</b>	Pseudo-peptidique	Acide hydroxamique	Large spectre	Faible biodisponibilité Pas de toxicité majeure	Retiré en phase III
<b>Marimastat®</b>	Pseudo-peptidique	Acide hydroxamique	Large spectre	Toxicité musculo-articulaire Pas de bénéfice sur la survie	Retiré en phase III
<b>Prinomastat®</b>	Non peptidique	Acide hydroxamique	MMP-2, -3, -9, -13, -14	Toxicité musculo-articulaire Pas de bénéfice sur la survie	Retiré en phase III
<b>Tanomastat®</b>	Non peptidique	Acide carboxylique	MMP-2, -3, -9, -13, -14	Perturbations hématologiques Pas de bénéfice sur la survie	Retiré en phase III
<b>Rebimastat®</b>	Non peptidique	Thiol	MMP-1, -2, -3, -8, -9, -13, -14	Problèmes dermatologiques Pas de bénéfice sur la survie	Retiré en phase III

Tableau 5 – Propriétés des principaux inhibiteurs synthétiques à large spectre des MMP.

### 3.3.2 Les inhibiteurs spécifiques de la MMP-14

#### 3.3.2.1 Les inhibiteurs compétitifs

DX-2400 est le premier anticorps capable d'inhiber l'activité de la MMP-14 ( $K_i = 0,8 \text{ nM}$ ) avec plus d'un facteur 1000 de sélectivité sur les MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -12, -15, -16, -17 et -24<sup>275</sup>. Il a été identifié par screening d'une librairie de Fabs humains par phage display sur le domaine catalytique de la MMP-14. Sous sa forme IgG, cet anticorps a été testé dans différents modèles et s'est montré capable d'inhiber la croissance tumorale et la prolifération métastatique *in vitro* et *in vivo*.

Peu de temps après, le peptideG de séquence GACFSIAHECGA et cyclisé par formation d'un pont disulfure a été décrit comme étant un inhibiteur de la MMP-14 ( $IC_{50} = 150 \text{ }\mu\text{M}$ ) qui n'impacte pas l'activité des MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, 10, -11, -12, -13, -15, -17 et -20<sup>276</sup>. *In vitro*, il a montré une inhibition de la prolifération métastatique, tandis qu'*in vivo* il a montré une inhibition de la croissance tumorale dans un modèle de carcinome. L'activité du peptide a été attribuée à sa structure cyclique, une mutation des résidus cystéine en sérine faisant perdre l'interaction avec la MMP-14.

Plus récemment, le Fab 3369 ( $IC_{50} = 62 \text{ nM}$ ) a été identifié par screening d'une librairie de Fabs humains par phage display sur une protéine de fusion, constituée du domaine extra cellulaire de la MMP-14 activée en fusion avec le domaine Fc d'un anticorps<sup>277</sup>. Sous sa forme Fab, il inhibe la collagénolyse *in vitro*, tandis qu'il a été montré dans un modèle de cancer du sein triple négatif que la forme IgG est capable d'inhiber la croissance tumorale et la prolifération métastatique *in vivo*.

Pour pallier les problèmes associés aux coûts de production des anticorps et à l'immunogénicité qu'ils peuvent induire, une équipe s'est également intéressée au développement d'un

---

<sup>275</sup> Devy L, Huang L, Naa L, et al. Selective inhibition of matrix metalloproteinase-14 blocks tumor growth, invasion, and angiogenesis. *Cancer Res.* 2009;69(4):1517-1526. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3255

<sup>276</sup> Suojanen J, Salo T, Koivunen E, Sorsa T, Pirilä E. A novel and selective membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) inhibitor reduces cancer cell motility and tumor growth. *Cancer Biol Ther.* 2009;8(24):2362-2370. doi:10.4161/cbt.8.24.10139

<sup>277</sup> Ling B, Watt K, Banerjee S, et al. A novel immunotherapy targeting MMP-14 limits hypoxia, immune suppression and metastasis in triple-negative breast cancer models. *Oncotarget.* 2017;8(35):58372-58385. doi:10.18632/oncotarget.17702

inhibiteur compétitif protéique, mais pas de type anticorps. En associant une méthode de modélisation informatique à du yeast surface display, ils ont réussi à identifier un inhibiteur hautement sélectif pour la MMP-14, en mutant uniquement cinq résidus du domaine N-terminal de l'inhibiteur endogène à large spectre TIMP-2<sup>278</sup> (Figure 33A). Ce mutant N-TIMP-2<sub>D</sub> présente une affinité 900 fois supérieure à celle de l'inhibiteur endogène wild type (Figure 33B), ce qui en fait l'inhibiteur le plus puissant de l'activité catalytique de la MMP-14 reporté à ce jour. Cependant, on note que ces mutations ont également amélioré l'affinité pour la MMP-9, avec seulement environ un facteur 10 de sélectivité.

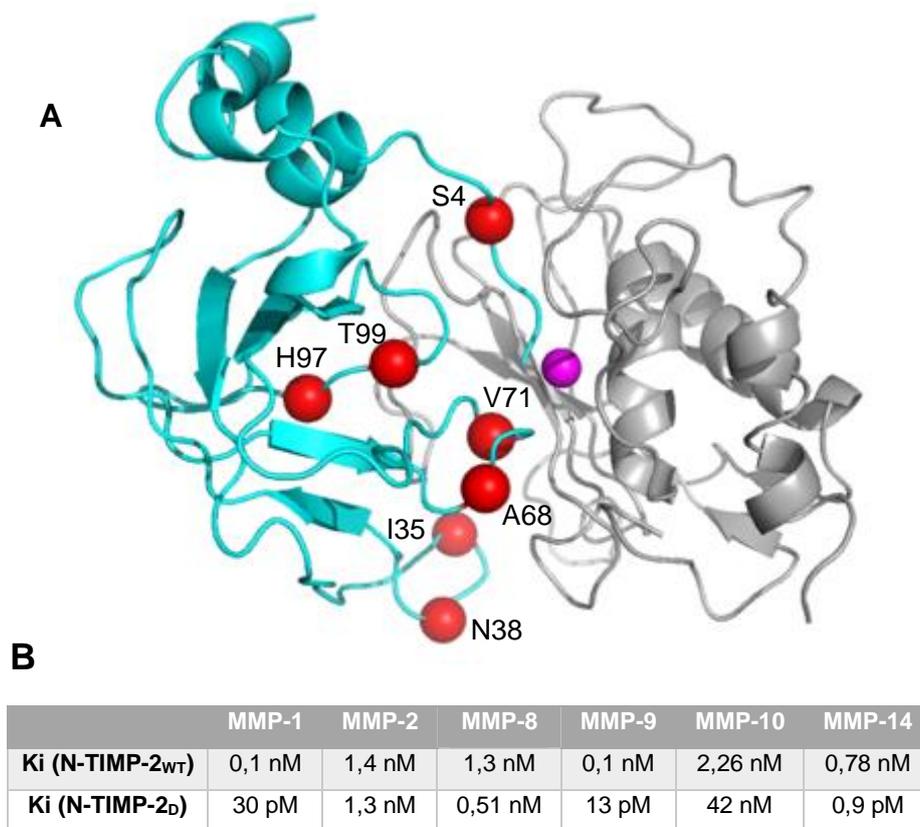


Figure 33 - Obtention du mutant TIMP-2<sub>D</sub> par mutation de cinq résidus impliqués dans l'interaction avec la MMP-14. (A) Structure de l'interface du complexe entre la partie N-terminale de l'inhibiteur endogène TIMP-2 (en cyan) et le domaine catalytique de la MMP-14 (en gris) contenant l'atome de zinc catalytique (sphère magenta). Les cinq résidus mutés sont précisés sur la structure (en rouge). (B) Comparaison des constantes d'inhibition de l'inhibiteur endogène TIMP-2 wild type et du mutant TIMP-2<sub>D</sub> vis-à-vis des MMP-1, -2, -8, -9, -10 et -14.

Créée à partir de : 1BUV.pdb

<sup>278</sup> Arkadash V, Yosef G, Shirian J, et al. Development of high affinity and high specificity inhibitors of matrix metalloproteinase 14 through computational design and directed evolution. *J Biol Chem.* 2017;292(8):3481-3495. doi:10.1074/jbc.M116.756718

### 3.3.2.2 Les inhibiteurs non compétitifs ciblant le domaine catalytique

La compréhension des différents modes d'action de la MMP-14 a mené à la conclusion que l'activité de la protéase peut également être inhibée en ciblant des structures moléculaires en dehors du site catalytique. De façon importante, alors qu'il existe peu de différences structurales entre les MMP au sein de leur gorge catalytique, à l'exception de la cavité S1', les différences au niveau de leurs exosites sont nombreuses. Le ciblage de ces régions avec des petites molécules ou des anticorps pourrait donc conduire à des composés plus spécifiques<sup>279</sup>.

Une stratégie prometteuse a été de cibler la boucle MT présente au sein du domaine catalytique des MMP transmembranaires (Figure 34). Pour la MMP-14, cette boucle, allant des résidus 163 à 170, contient un exosite essentiel à l'interaction de TIMP-2 avec la protéase. Cet exosite est également impliqué dans l'interaction avec les protéines d'adhésion cellulaire nécessaires à la localisation de la MMP-14 à l'invadopodia. Deux IgG appelés 9E8<sup>280</sup> ( $K_D = 0,6$  nM) sélectif pour la MMP-14 vis-à-vis des MMP-2 et -3, et Loop<sub>Ab</sub><sup>281</sup> ( $K_D$  non déterminé) ciblant cette boucle MT ont été développés et ces deux anticorps sont capables d'inhiber l'activation de la ProMMP-2 par la MM-14, tout en n'ayant aucun impact sur l'activité collagénolytique de cette dernière. Ces deux anticorps sont totalement sélectifs pour la MMP-14 puisque cette boucle MT diffère en longueur et en séquence entre toutes les MMP membranaires.

---

<sup>279</sup> Santamaria S, de Groot R. Monoclonal antibodies against metzincin targets. *Br J Pharmacol.* 2019;176(1):52-66. doi:10.1111/bph.14186

<sup>280</sup> Shiryayev SA, Remacle AG, Golubkov VS, et al. A monoclonal antibody interferes with TIMP-2 binding and incapacitates the MMP-2-activating function of multifunctional, pro-tumorigenic MMP-14/MT1-MMP. *Oncogenesis.* 2013;2(12):e80-7. doi:10.1038/oncsis.2013.44

<sup>281</sup> Woskowicz AM, Weaver SA, Shitomi Y, Ito N, Itoh Y. MT-LOOP-dependent localization of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to the cell adhesion complexes promotes cancer cell invasion. *J Biol Chem.* 2013;288(49):35149-35158. doi:10.1074/jbc.M113.496067

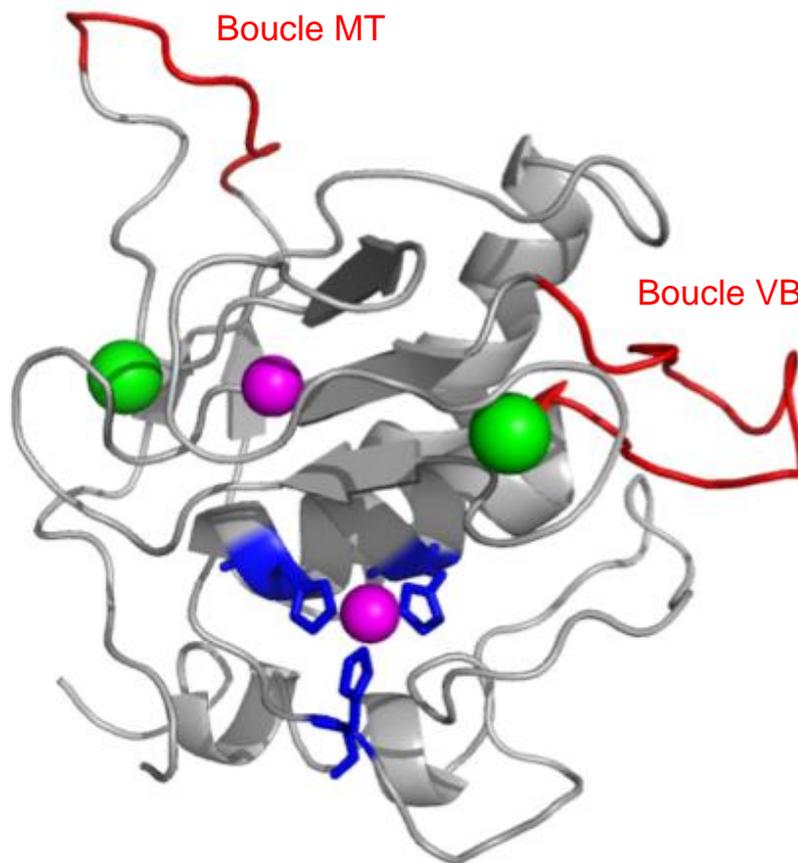


Figure 34 – Structure du domaine catalytiques de la MMP-14. Au fond de la gorge catalytique, l'atome de zinc catalytique (sphère magenta) est chélaté par trois résidus histidine (en bleu). La stabilité du domaine est aussi assurée par la présence de cations : un atome de zinc additionnel (sphère magenta) et deux atomes de calcium (sphères vertes) interagissant avec des résidus portés par des boucles situées à la surface de la protéine. Les boucles MT (résidus 163 à 170) et VB (résidus 218 à 233) sont des exosites ciblés par des anticorps spécifiques (en rouge).

Créée à partir de : 5H0U.pdb

La boucle VB est également un exosite au sein du domaine catalytique qui est divergent entre toutes les MMP (Figure 34). Un Fab appelé LEM-2/15 a alors été obtenu en immunisant des souris avec un peptide cyclique contenant la séquence de la boucle VB de la MMP-14, allant des résidus 218 à 233<sup>282</sup>. Il a été montré que la liaison de ce Fab LEM-2/15 ( $K_D = 2,3$  nM) à la boucle VB n'a pas d'impact sur l'activation de la ProMMP-2, mais inhibe l'activité

<sup>282</sup> Gálvez BG, Matías-Román S, Albar JP, Sánchez-Madrid F, Arroyo AG. Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase is Activated during Migration of Human Endothelial Cells and Modulates Endothelial Motility and Matrix Remodeling. *J Biol Chem.* 2001;276(40):37491-37500. doi:10.1074/jbc.M104094200

collagénolytique de la protéase. Ce Fab exerce un effet allostérique, induisant un changement de conformation du domaine catalytique.

Plus récemment, un screening d'une librairie de scFv par phage display sur la ProMMP-14 a permis d'isoler plusieurs scFv interagissant avec un autre exosite du domaine catalytique<sup>283</sup>. Après une sélection sur leur capacité à dégrader le collagène et une étape de maturation pour améliorer l'affinité, deux clones A4\_7 ( $K_D = 4$  nM) et E2\_C6 ( $K_D = 0,11$  nM) ont été isolés. C'est sous la forme scFv-Fc qu'ils ont été évalués *in vivo*, et qu'ils ont montré une inhibition de la croissance tumorale et de la prolifération métastatique.

### 3.3.2.3 Les inhibiteurs non compétitifs ciblant le domaine hemopexine

L'importance du domaine hemopexine de la MMP-14 dans les interactions protéine-protéine nécessaires aux différents modes d'action de la protéase a largement été démontrée. Dans ce contexte, il y a un intérêt croissant pour le ciblage des exosites au sein de ce domaine, avec objectif principal d'inhiber les fonctions non-enzymatiques de la MMP14.

Les premiers travaux d'identification des exosites au sein du domaine hemopexine ont consisté en la mutation de la région la plus extérieure (S4) de chacun des quatre sous-domaines<sup>284</sup> (Figure 35). Cette étude a permis d'identifier l'implication du premier sous-domaine IS4 dans l'hétérodimérisation de la MMP-14 avec CD44, et celle du quatrième sous-domaine IVS4 dans l'homodimérisation de la protéase. Des petites séquences peptidiques Ac-VMDGYPMP-NH<sub>2</sub> et Ac-GYPKSALR-NH<sub>2</sub> inspirées des séquences de région IS4 et IVS4 respectivement, ont ensuite été produites et testées sur différentes lignées cellulaires pour leur capacité à interférer avec les processus d'homo et d'hétérodimérisation. Les deux peptides ont permis l'inhibition de la prolifération métastatique *in vivo*.

---

<sup>283</sup> Botkjaer KA, Kwok HF, Terp MG, et al. Development of a specific affinity-matured exosite inhibitor to MT1-MMP that efficiently inhibits tumor cell invasion *in vitro* and metastasis *in vivo*. *Oncotarget*. 2016;7(13):16773-16792. doi:10.18632/oncotarget.7780

<sup>284</sup> Zarrabi K, Dufour A, Li J, et al. Inhibition of Matrix Metalloproteinase 14 (MMP-14)-mediated cancer cell migration. *J Biol Chem*. 2011;286(38):33167-33177. doi:10.1074/jbc.M111.256644

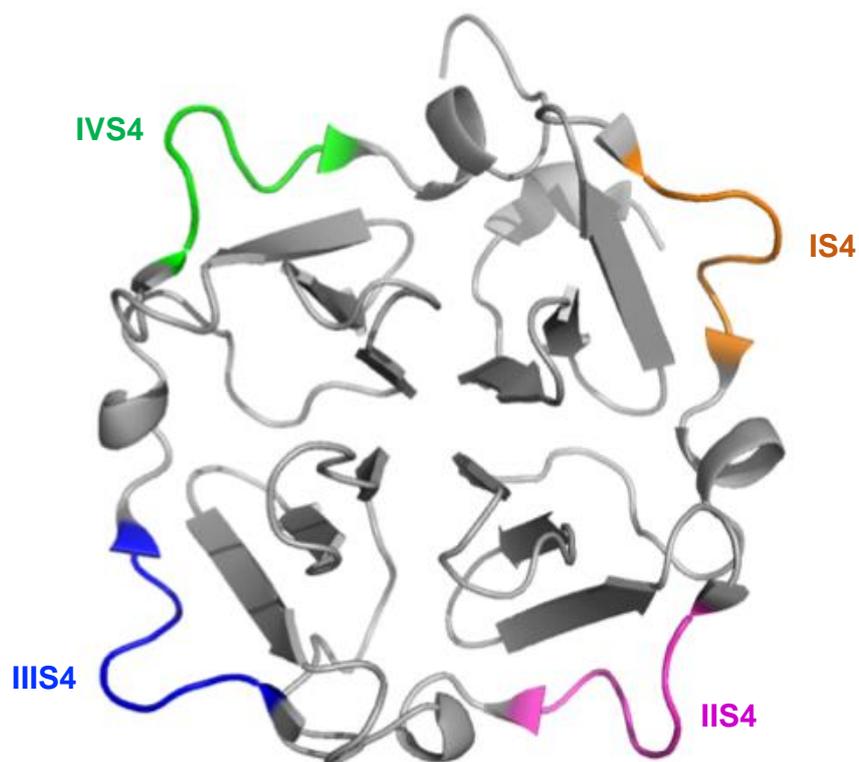


Figure 35 – Structure du domaine hemopexine des MMP. Le domaine hemopexine est composé de quatre sous-domaines (I à IV). Les régions les plus à l'extérieur (S4) de chaque sous-domaines sont appelées IS4 à IVS4 et sont colorées en orange, rose, bleu et vert respectivement.

Créée à partir de : 3C7X.pdb

Le screening de la librairie d'environ 275 000 composés du programme de développement thérapeutique NCI/NIH a également permis d'identifier une petite molécule appelée NSC405020 (Figure 36) capable de se lier au domaine hemopexine de la MMP-14<sup>285</sup>. NSC405020 inhibe l'homodimérisation de la protéase ainsi que l'activité collagénolytique (IC<sub>50</sub> > 100 µM) de différents types cellulaires *in vitro*.

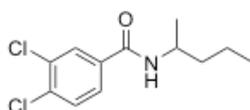


Figure 36 - Structure de la molécule NSC405020.

<sup>285</sup> Remacle AG, Golubkov VS, Shiryayev SA, et al. Novel MT1-MMP small-molecule inhibitors based on insights into hemopexin domain function in tumor growth. *Cancer Res.* 2012;72(9):2339-2349. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-4149

Enfin, un screening d'une librairie de scFv par phage display sur le domaine hemopexine de la MMP-14 a permis de montrer que les différentes fonctions de la protéase dépendent de différents exosites, qui peuvent être ciblés individuellement. Deux scFvs appelés CHA ( $K_D = 10,7$  nM) et CHL ( $K_D = 169$  nM), capables de s'associer au domaine hemopexine de la MMP-14 et présentant des modes d'inhibition différents ont été isolés<sup>286</sup>. En effet CHA inhibe le clivage de CD44 par la MMP-14, tandis que CHL inhibe l'association aux fibres de collagène. Cependant, les deux scFvs inhibent la prolifération métastatique *in vitro*.

### 3.3.3 Les thérapies ciblées

La MMP-14 n'est que peu ou pas exprimée dans la majorité des tissus sains chez l'adulte, mais est largement surexprimée dans de nombreux types de tumeurs solides tels que le cancer de la prostate, du sein, des poumons, du tractus digestif, le mélanome, ou le carcinome ovarien. De plus, le caractère invasif et agressif qu'elle donne à ces différents cancers est souvent associé à une mauvaise efficacité de traitement par des méthodes conventionnelles<sup>287</sup>. Bien qu'il n'y ait encore que peu d'exemples pour le démontrer, la MMP-14 apparaît comme une cible moléculaire intéressante pour le développement de thérapies ciblées. Alors que plusieurs anticorps sélectifs de la MMP14 ont été décrits, aucun ADC n'a encore été reporté à notre connaissance. Néanmoins, deux approches distinctes s'appuyant sur le TIMP2 et un peptide cyclique ont été récemment décrites.

#### 3.3.3.1 TIMP2-drug conjugate

Le TIMP-2 comme vecteur moléculaire est ici couplé à la Lidamycine, un antibiotique et anticancéreux considéré comme l'un des plus puissants cytotoxiques<sup>288</sup>. Ce conjugué a montré

---

<sup>286</sup> Basu B, Correa De Sampaio P, Mohammed H, et al. Inhibition of MT1-MMP activity using functional antibody fragments selected against its hemopexin domain. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(2):393-403. doi:10.1016/j.biocel.2011.11.015

<sup>287</sup> Gobin E, Bagwell K, Wagner J, et al. A pan-cancer perspective of matrix metalloproteases (MMP) gene expression profile and their diagnostic/prognostic potential. *BMC Cancer.* 2019;19(1):1-10. doi:10.1186/s12885-019-5768-0

<sup>288</sup> Xu J, Liu XJ, Li L, et al. An engineered TIMP2-based and enediyne-integrated fusion protein for targeting MMP-14 shows potent antitumor efficacy. *Oncotarget.* 2015;6(28):26322-26334. doi:10.18632/oncotarget.4709

une forte activité anti-angiogénique *in vitro* ainsi qu'une capacité à inhiber la croissance tumorale *in vivo*.

### 3.3.3.2 Bicycle-drug conjugates

Un peptide bicyclique capable de lier le domaine hemopexine de la MMP-14 a été identifié par Bicycle Therapeutics *via* leur technologie propriétaire de screening de leur librairie de peptides bicycliques par phage display<sup>289</sup>. Plusieurs étapes de maturation d'affinité et d'incorporation d'acides aminés non naturels ont conduit à un peptide présentant une haute affinité et une meilleure stabilité métabolique. Le puissant cytotoxique DM1 a ensuite été conjugué à l'extrémité N-terminal du peptide, *via* un linker clivable disulfide, pour donner le conjugué BT1718 (Figure 37) qui est actuellement évalué en phase II d'essai clinique.

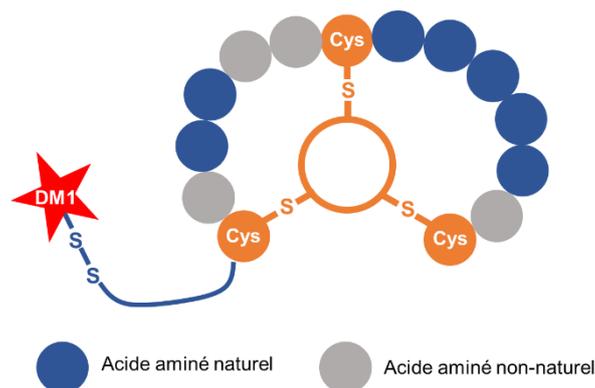


Figure 37 - Structure du bicycle-drug conjugate BT1718

<sup>289</sup> Harrison H, Bennett G, Blakeley D, et al. Abstract 5144: BT1718, a novel bicyclic peptide-maytansinoid conjugate targeting MT1-MMP for the treatment of solid tumors: Design of bicyclic peptide and linker selection. 2017:5144-5144. doi:10.1158/1538-7445.am2017-5144

Inhibiteur	Structure	Cible	K <sub>D</sub>	K <sub>i</sub>	IC <sub>50</sub>	Sélectivité	Observations
DX-2400	IgG	Site catalytique	-	0.8 nM	-	N'inhibe pas les MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -12, -15, -16, -17 et -24 jusqu'à 1 µM	Inhibe l'activité catalytique
Peptide G	Peptide cyclique	Site catalytique	-	-	150 µM	N'inhibe pas les MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -15, -17 et -20 jusqu'à 250 µM	Inhibe l'activité catalytique
3369	IgG/Fab	Site catalytique	-	-	62 nM	Non déterminé	Inhibe l'activité catalytique
N-TIMP-2 <sub>D</sub>	Protéine	Site catalytique	-	0.9 pM	-	K <sub>i</sub> (MMP-9) = 13 pM K <sub>i</sub> (MMP-1) = 30 pM Les autres MMP K <sub>i</sub> > 0,5 nM	Inhibe l'activité catalytique
9E8	IgG	Domaine catalytique boucle MT	0.6 nM	-	-	Ne lie pas les MMP-2 et -3	Inhibe l'activation de la ProMMP-2
Loop <sub>Ab</sub>	IgG	Domaine catalytique boucle MT	Non déterminé			Non déterminé	Inhibe l'activation de la ProMMP-2
LEM-2/15	Fab	Domaine catalytique boucle VB	2.3 nM	-	-	Ne lie pas les MMP-7, -9 et -12	Inhibe l'activité catalytique
E2_C6	scFv-Fc	Domaine catalytique	0.11 nM	-	-	Non déterminé	Inhibe l'activation de la ProMMP-2 Inhibe le clivage de CD44
IS4	Peptide	Domaine hemopexine	Non déterminé			Ne lie pas les MMP-9 et -25	Inhibe l'hétérodimérisation avec CD44
IVS4	Peptide	Domaine hemopexine	Non déterminé			Ne lie pas les MMP-9 et -25	Inhibe l'homodimérisation

<b>NSC405020</b>	Petite molécule	Domaine hemopexine	-	-	>100 µM	Non déterminé	Inhibe l'homodimérisation
<b>CHA</b>	scFv	Domaine hemopexine	10.7 nM	-	-	Non déterminé	Inhibe le clivage de CD44
<b>CHL</b>	scFv	Domaine hemopexine	169 nM	-	-	Non déterminé	Inhibe la liaison au collagène

*Tableau 6 - Propriétés des principaux inhibiteurs spécifiques de la MMP-14.*

### 3.4 DE NOUVEAUX ANTICORPS INSPIRÉS DES CAMÉLIDÉS COMME INHIBITEURS DE PROTÉASES

Il est largement reconnu que le système immunitaire est l'outil privilégié pour générer des molécules capables de lier spécifiquement une large variété de protéines. Cependant, le nombre d'anticorps conventionnels agissant comme inhibiteurs compétitifs d'enzymes reste relativement limité<sup>290</sup>. Ceci est principalement attribué à un manque de complémentarité structurale entre le site enzymatique, correspondant souvent à une cavité enfouie au sein de la protéine, et le paratope d'anticorps conventionnels, constitué de parties variables de la chaîne lourde et de la chaîne légère<sup>291</sup>. Ce paratope peut lui-même former une légère cavité ou une surface plane s'insérant difficilement dans un site catalytique enfoui. Dans le cas des MMP, la probabilité de générer des anticorps présentant une forme convexe, analogue à celle des inhibiteurs endogènes (TIMP), capable de s'insérer dans la gorge catalytique reste faible, soulignant la nécessité d'avoir recours à des formats moins conventionnels.

#### 3.4.1 Les anticorps de camélidés comme inhibiteurs d'enzymes

##### 3.4.1.1 Structure des anticorps de camélidés

En plus des anticorps conventionnels de type IgG (Figure 38A), les camélidés produisent, et en quantité non négligeable, des anticorps particuliers (Figure 38B) appelés Heavy-Chain Antibodies (HCAbs) qui sont dénués de chaîne légère et du premier domaine constant (CH1)<sup>292</sup>. Le paratope de ces HCAbs est composé de trois domaines hypervariables ou CDRs (Complementarity-Determining Regions) appelés CDR-H1, CDR-H2 et CDR-H3 à l'extrémité N-terminal du domaine variable (VHH), contrairement aux anticorps conventionnels dont le paratope est composé de six domaines hypervariables, CDR-H1, CDR-H2 et CDR-H3 dans le

---

<sup>290</sup> Santamaria S, de Groot R. Monoclonal antibodies against metzincin targets. *Br J Pharmacol.* 2019;176(1):52-66. doi:10.1111/bph.14186

<sup>291</sup> Forsman A, Beirnaert E, Aasa-Chapman MM, et al. Llama Antibody Fragments with Cross-Subtype Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Neutralizing Properties and High Affinity for HIV-1 gp120. *J Virol.* 2008;82(24):12069-12081. doi:10.1128/jvi.01379-08

<sup>292</sup> Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature.* 1993;363(6428):446-448. doi:10.1038/363446a0

domaine variable (VH) de la chaîne lourde, et CDR-L1, CDR-L2, et CDR-L3 au sein du domaine variable (VL) de la chaîne légère.

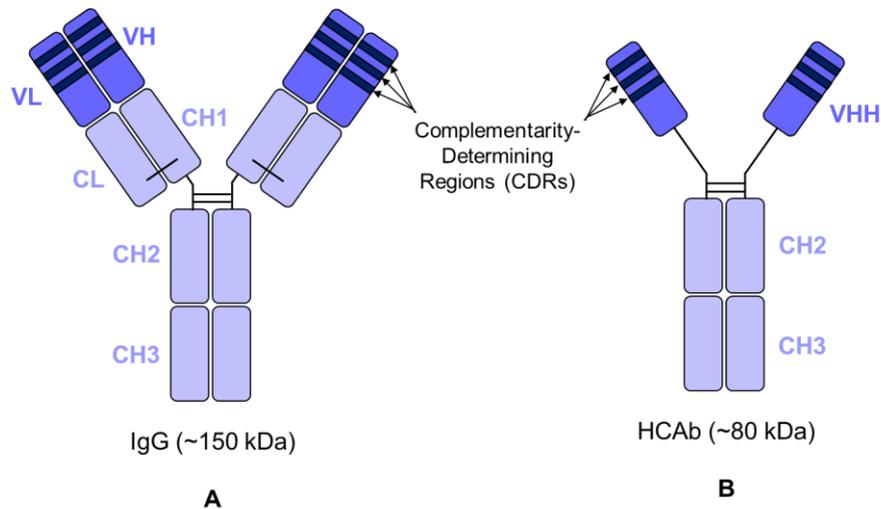


Figure 38 – Représentation schématique de la structure des anticorps. (A) Anticorps conventionnels et (B) Anticorps de camélidés.

La deuxième particularité de ces HCABs se trouve dans la structure et dans la composition du domaine hypervariable CDR-H3. En effet, cette région composée habituellement de 9 ou 12 résidus dans la structure IgG, est allongée jusqu'à en moyenne 19 résidus<sup>293</sup>, formant ainsi une boucle exposée. Par rapport aux IgG humaines, le CDR-H3 des camélidés est enrichi en cystéine et peut contenir un pont disulfure aidant à maintenir cette structure de boucle flexible. Globalement, la composition de ce domaine CDR-H3 est également enrichie en résidus chargés positivement (Arg et Lys) et en résidus hydrophiles (Ser, Thr, Gln et Asn) et appauvrie en résidus hydrophobes (Phe, Val et Ile), contribuant ainsi à une meilleure exposition au solvant de cette boucle.

<sup>293</sup> Nam DH, Rodriguez C, Remacle AG, Strongin AY, Ge X. Active-site MMP-selective antibody inhibitors discovered from convex paratope synthetic libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(52):14970-14975. doi:10.1073/pnas.1609375114

### 3.4.1.2 Un domaine CDR-H3 capable de d'inhiber l'activité enzymatique

Ces observations sur la structure particulière des anticorps de camélidés ont conduit à l'hypothèse selon laquelle, le domaine CDR-H3 pouvait former un paratope convexe capable de s'insérer au sein d'une cavité enzymatique<sup>294</sup>. C'est en 1996 que la première structure cristallographique de la boucle CDR-H3 d'un HCABs inséré au sein du site actif du lysozyme a été résolue<sup>295</sup>. Depuis, plusieurs études ont décrit des HCABs comme inhibiteurs d'enzyme, confirmant ainsi la forme convexe de la boucle CDR-H3 et sa capacité à s'insérer dans des sites catalytiques de structure variable<sup>296</sup>.

## 3.4.2 Développement de nouveaux inhibiteurs de la MMP-14

Bien que l'efficacité de l'utilisation des HCABs comme inhibiteur d'enzyme ait été prouvée, leur utilisation reste limitée pour deux raisons principales : i) ces anticorps isolés du sang des lamas après immunisation sont disponibles en petites quantités, et ii) l'utilisation de ces anticorps chez l'homme peut présenter des risques d'immunogénicité.

Pour répondre à ces problématiques, l'équipe du Dr. Xin Ge (Université de Californie à Riverside) a développé des bibliothèques de Fabs humains synthétiques dans lesquels un long domaine CDR-H3 analogue à celui des camélidés a été introduit. S'appuyant sur l'hypothèse que seul ce domaine portait le pouvoir inhibiteur de HCABs, il a dédié cette approche au développement de nouveaux inhibiteurs de la MMP-14.

### 3.4.2.1 1F8 un inhibiteur identifié par greffage de CDR

La première bibliothèque de Fabs synthétiques a ainsi été construite en greffant, au sein du domaine CDR-H3, un motif peptidique ciblant la MMP14. Le choix s'est porté sur le peptide G, de

---

<sup>294</sup> De Genst E, Silence K, Decanniere K, et al. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(12):4586-4591. doi:10.1073/pnas.0505379103

<sup>295</sup> Desmyter A, Transue TR, Ghahroudi MA, et al. Crystal structure of a camel single-domain V(H) antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat Struct Biol*. 1996;3(9):803-811. doi:10.1038/nsb0996-803

<sup>296</sup> Forsman A, Beirnaert E, Aasa-Chapman MMI, et al. Llama Antibody Fragments with Cross-Subtype Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Neutralizing Properties and High Affinity for HIV-1 gp120. *J Virol*. 2008;82(24):12069-12081. doi:10.1128/jvi.01379-08

séquence GACFSIAHECGA cyclisé par un pont disulfure, liant la MMP-14 avec une faible affinité ( $IC_{50} = 150 \mu M$ )<sup>297</sup>. S'appuyant sur le fait que les résidus exocycliques n'étaient pas impliqués dans l'interaction, deux séquences minimales avec et sans cystéines (CFSIAHEC et FSIAHE) ont été introduites dans la boucle CDR-H3 (Figure 39). La librairie a été construite en incorporant de part et d'autre de ces deux séquences d'autres acides aminés, et des séquences totalement aléatoires pour les cinq autres CDRs, générant ainsi  $5 \times 10^8$  variants différents.

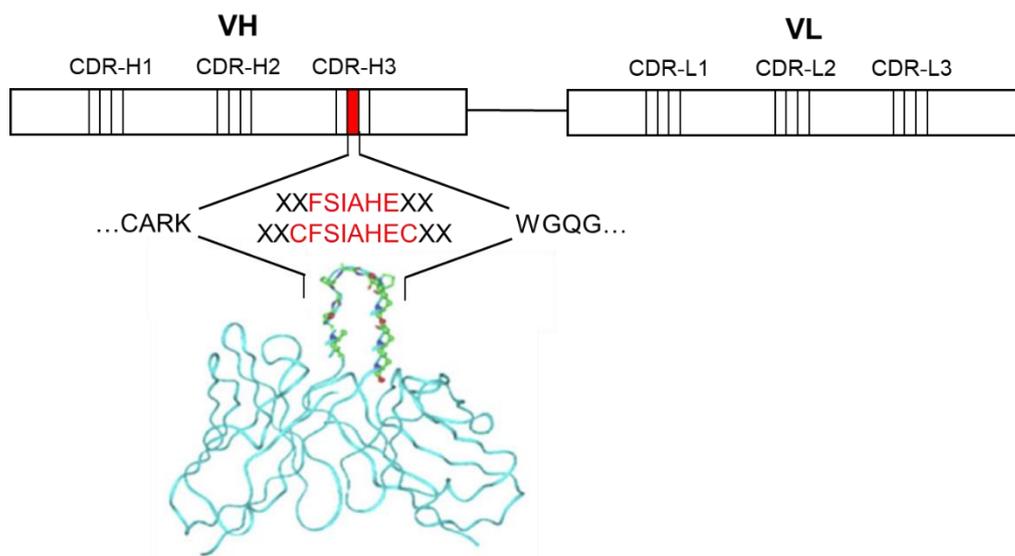


Figure 39 – Schéma de la construction de la librairie de Fabs incorporant la séquence du peptide G au sein du CDR-H3.

Comme illustré par la figure 40, après quatre tours consécutifs de criblage par phage display sur le domaine catalytique de la MMP-14 immobilisé, 288 colonies ont été sélectionnées aléatoirement. Sur ces 288 colonies, 19 d'entre elles ont montré un signal positif lors d'un test ELISA de mesure d'affinité. Ces 19 Fabs ont été isolés et séquencés, et tous contenaient l'une ou l'autre des séquences du peptide G (7 Fabs avec le motif contenant les cystéines et 12 Fabs sans le motif cystéines). Les 19 Fabs ont ensuite été produits dans *E. coli* et l'affinité des Fabs purifiés a été évaluée. La plupart des Fabs ont montré une faible affinité, de l'ordre du  $\mu M$ , à

<sup>297</sup> Suojanen J, Salo T, Koivunen E, Sorsa T, Pirilä E. A novel and selective membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) inhibitor reduces cancer cell motility and tumor growth. *Cancer Biol Ther.* 2009;8(24):2362-2370. doi:10.4161/cbt.8.24.10139

l'exception d'un Fab, appelé 1F8 qui présente une affinité  $EC_{50} = 8.3 \text{ nM}$  pour le domaine catalytique de la MMP-14, et une inhibition  $K_i = 110 \text{ nM}$  en compétition avec un petit substrat fluorogénique. Cet inhibiteur est totalement sélectif pour la MMP-14 vis-à-vis de la MMP-9.

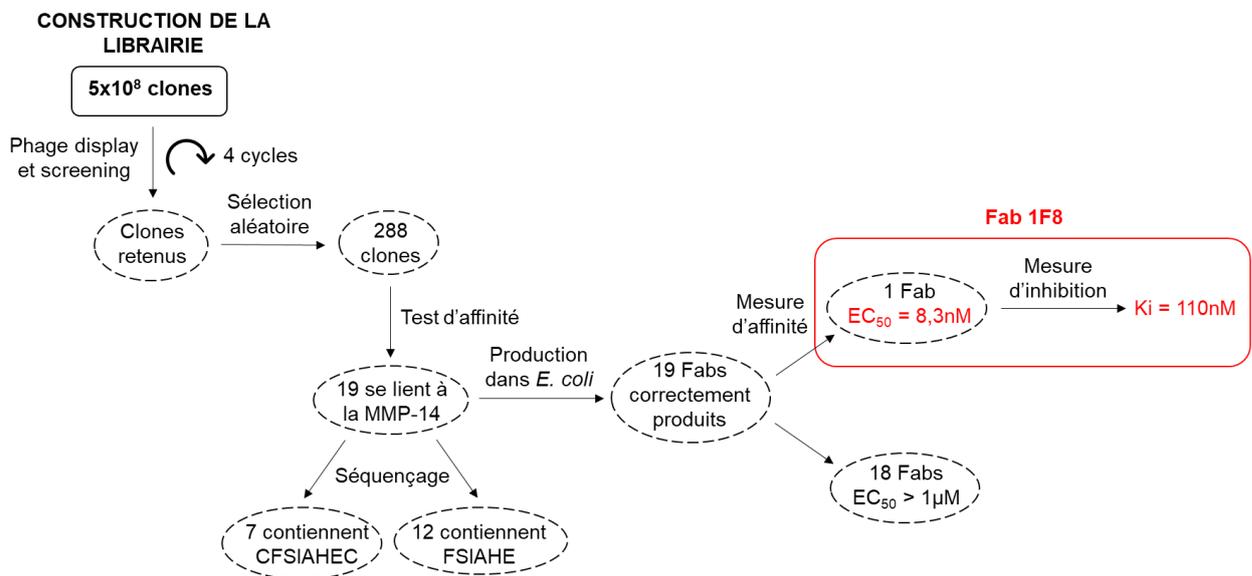


Figure 40 – Représentation schématique des étapes pour aboutir à l'isolement du Fab 1F8.

Cette première librairie synthétique a permis de démontrer qu'il était possible de convertir un inhibiteur peptidique de MMP-14 de faible affinité en un Fab avec un long paratope convexe présentant une constante d'inhibition de 110 nM, soit un gain d'affinité d'un facteur 1000<sup>53</sup>.

### 3.4.2.2 3A2 un inhibiteur identifié par screening d'une librairie synthétique

Dans le but d'avoir des inhibiteurs de MMP-14 plus puissants et d'accéder à une librairie synthétique universelle permettant d'accéder à pour une plus grande variété d'inhibiteurs d'enzymes, l'équipe de Xin Ge a conçu une deuxième librairie de Fabs synthétique<sup>50</sup>. Dans ce cas et afin d'obtenir des anticorps avec un CDR-H3 significativement plus long que dans les IgGs humaines, une longueur de 23, 25 ou 27 résidus de séquence aléatoire a été imposée. Le choix a ensuite été pris de maintenir la séquence des domaines CDR-L1 et CDR-L2, et de fixer une longueur allant de 3 à 7 résidus aléatoires pour les CDR-H1, CDR-H2 et CDR-L3. La librairie ainsi

générée comporte  $1,25 \times 10^9$  clones répartis comme suit :  $4,6 \times 10^8$  CDR-H3-23 ;  $3,4 \times 10^8$  CDR-H3-25 ; et  $4,5 \times 10^8$  CDR-H3-27.

Le processus appliqué à cette librairie pour l'identification potentielle d'inhibiteurs compétitifs de la MMP-14 est similaire à celui suivi précédemment et détaillé dans la figure 40. Après trois tours consécutifs de criblage, 288 colonies retenues ont été sélectionnées aléatoirement. Sur ces 288 colonies, 20 d'entre elles ont montré un signal lors d'un test ELISA de mesure d'affinité ainsi que la présence d'une longue boucle CDR-H3 par séquençage. Les 20 Fabs ont été produits dans *E. coli* et l'affinité des Fabs purifiés a été évaluée. Les Fabs ont montré des affinités allant de  $EC_{50} = 3,8$  nM à  $1,6$   $\mu$ M, dont 3 Fabs (15%) présentent des affinités inférieures à 10 nM. Sur les 20 Fabs, 14 (70%) ont été capables d'inhiber l'activité protéolytique de la MMP-14 en présence d'un substrat modèle, avec des constantes d'inhibition allant de  $K_i = 9,7$  nM à  $8$   $\mu$ M (Tableau 7).

Clones	Séquence du CDR-H3 (longueur)	$K_D$	$K_i$	Sélectivité
<b>3A2</b>	VKLQKDKSHQWIRNLVATPYGRYVMDY (27)	3,8 nM	9,7 nM	Aucune inhibition des MMP-2 et -9
<b>3E2</b>	GIKGLVFTGSQMKMLRRGNYNWYVMDY (27)	47 nM	42 nM	Aucune inhibition des MMP-2 et -9
<b>3D9</b>	RLMAYHGSCSSRLCQTAISPQRYAMDY (27)	6,4 nM	61 nM	Aucune inhibition des MMP-2 et -9
<b>2B5</b>	IGVNAWAVKMSQRMLATRGSGWYVMDY (27)	24 nM	240 nM	Aucune inhibition des MMP-2 et -9
<b>3G9</b>	ATNEKFRRKSLQVRLLMRSWLAYAMDY (27)	160 nM	390 nM	Facteur 16,7 de sélectivité avec les MMP-2 et -9
<b>33D2</b>	SKYGPASRQLASRTSWSGPRGKYGMDY (27)	120 nM	420 nM	Facteur 9,6 de sélectivité avec les MMP-2 et -9
<b>3F3</b>	LYNGWLMVEGIGSAREGPTWYAMDY (25)	34 nM	970 nM	Non déterminé
<b>33F3</b>	GVRGNKLRLLSSRGLMESHYVMDY (25)	1,0 $\mu$ M	2,3 $\mu$ M	Non déterminé
<b>33D4</b>	SVHMKLSNKILSGWSWNNSFYAMDY (25)	460 nM	3,9 $\mu$ M	Non déterminé
<b>32D1</b>	MSLHRNFNQGRSRLGRMPRTYGMDY (27)	350 nM	4,2 $\mu$ M	Non déterminé
<b>3A6</b>	RPCKACRTRLELVRRGMDSGLRYGMDY (27)	980 nM	4,2 $\mu$ M	Non déterminé

<b>33C4</b>	PTTSRVNKKLFRVSVLHPGSYGM DY (25)	220 nM	4,6 $\mu$ M	Non déterminé
<b>3E9</b>	NGRYPGFLKRAHKRLNFKAYVMDY (25)	51 nM	6,0 $\mu$ M	Non déterminé
<b>32C2</b>	SQHAKKSTIIRMLEHQSRSGMQYVMDY (27)	150 nM	8,0 $\mu$ M	Non déterminé
<b>32E10</b>	LDRDRYIHVGRAGNTYSNYYYVMDY (25)	9,7 nM	Non inhibiteur	Non déterminé
<b>32C11</b>	EIHMLSRQARYLRDGRPRGSMYVMDY (27)	29 nM	Non inhibiteur	Non déterminé
<b>2H9</b>	GTSFQVRCVLYRLLSPGRYVMDY (23)	120 nM	Non inhibiteur	Non déterminé
<b>3B2</b>	STAATLSRMSRSYWTIQLPYGM DY (25)	590 nM	Non inhibiteur	Non déterminé
<b>2E4</b>	SARLRLRGNHRRRSKSVYYR PYVMDY (27)	840 nM	Non inhibiteur	Non déterminé
<b>33F5</b>	NFRVESAGRPGKTVLRKDGKYAM DY (25)	1,6 $\mu$ M	Non inhibiteur	Non déterminé

Tableau 7 – Caractéristiques des 20 clones anti-MMP-14 isolés de la librairie synthétique de Fabs.

Le Fab 3A2 ( $EC_{50}$  = 3,8 nM et  $K_i$  = 9,7 nM), le meilleur inhibiteur identifié, a été étudié plus en détails pour déterminer son mécanisme d'inhibition ainsi que son mode de liaison<sup>50</sup>. Un test compétitif par ELISA a montré qu'une concentration croissante en TIMP-2 réduit la liaison du Fab 3A2 à la MMP-14, suggérant un chevauchement de leur site de liaison respectif. Pour identifier le site de liaison du Fab 3A2, différents résidus au sein du site catalytique de la MMP-14 ont été mutés en alanine. Seul le mutant F260A a montré une activité protéolytique en présence du Fab 3A2, démontrant ainsi que cette mutation entraîne la perte de l'interaction avec l'inhibiteur. Ces résultats ont permis de conclure que le Fab 3A2 est un inhibiteur compétitif de la MMP-14 et qu'une partie de son CDR-H3 s'insère dans le sous-site S1' du site catalytique (Figure 41).

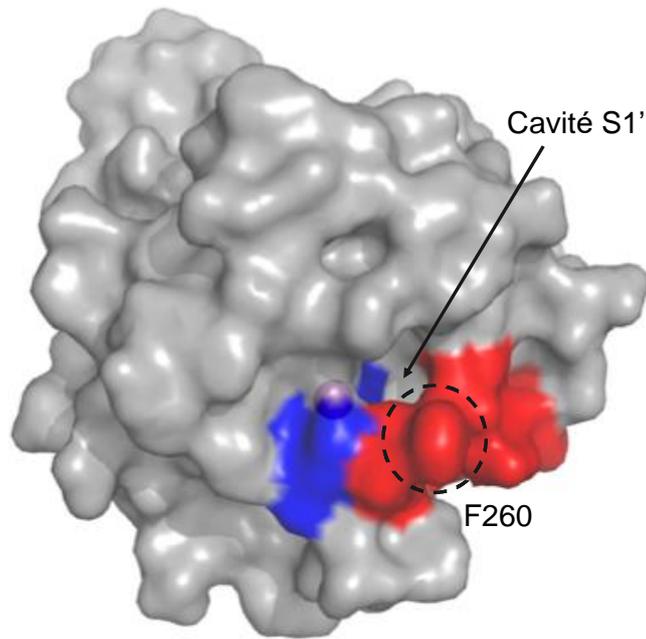


Figure 41 – La structure du domaine catalytique de la MMP-14. Les trois résidus histidine (en bleu) chélatent l'atome de zinc catalytique (sphère magenta). Un test d'inhibition a montré que le Fab 3A2 lie la F260 (entouré en noir) qui appartient à la boucle rouge qui forme la cavité S1'.

Créée à partir de : 5H0U.pdb

*In vitro*, il a été montré que le Fab 3A2 inhibe l'activité collagénolytique de la MMP-14 et l'activation de la ProMMP-2. Sous sa forme IgG, 3A2 a été évalué dans un modèle 4T1 de carcinome mammaire murin<sup>54</sup>. Les souris ont été traitées par 100 µg d'anticorps tous les deux jours pendant 30 jours. A l'issue du traitement, une inhibition significative de la croissance tumorale a été observée chez les souris traitées en comparaison des souris contrôles (Figure 42A). A l'issue de ces 30 jours, une diminution du nombre de métastases dans le foie et dans les poumons de 94,2% et 94,7% respectivement a également été constatée (Figure 42B).

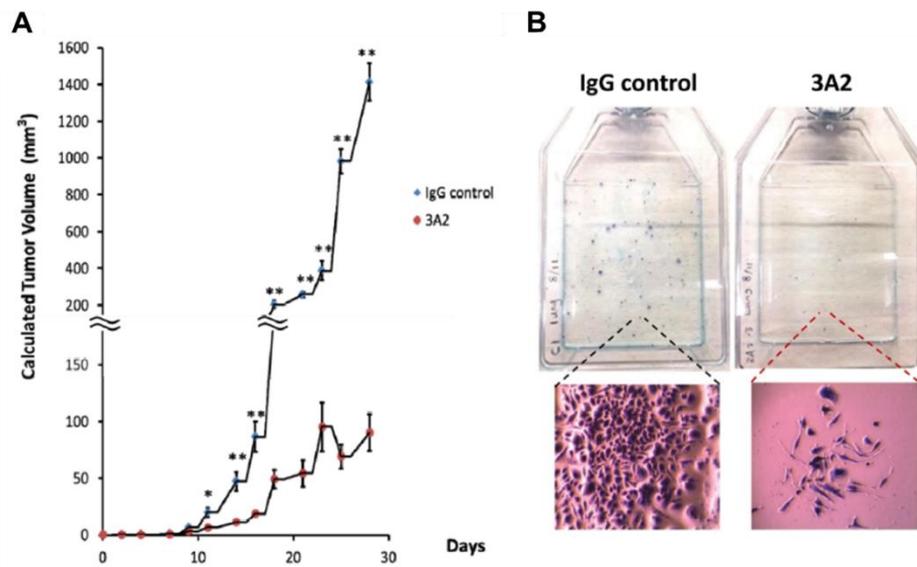


Figure 42 – Le traitement par l'IgG 3A2 réduit la croissance tumorale et le nombre de métastases. (A) Suivi du volume tumoral (n=11) et (B) Evaluation du nombre de métastases au poumon.

Figure extraite de : *Oncotarget*, 2018, Vol. 9 (No. 50), pp : 29431-29444

Ainsi, le screening d'une librairie synthétique de Fabs a permis d'isoler le clone 3A2, un inhibiteur compétitif de la MMP-14, montrant un potentiel thérapeutique prometteur dans le traitement des cancers métastatiques.

## 4 OBJECTIFS

---

Les ADC sont une classe de thérapies ciblées émergentes qui révolutionnent le traitement de certains cancers en optimisant la distribution de puissantes molécules cytotoxiques aux cellules et tissus cibles. Durant les trente dernières années, des avancées considérables ont été faites dans la conception de ces molécules et dans la compréhension de leur mode d'action, ce qui a permis d'améliorer significativement leur bénéfice thérapeutique. Cependant, la fenêtre thérapeutique de nombreux ADC dans les études cliniques ou précliniques reste trop étroite, notamment dans le traitement des tumeurs solides ; ce qui nécessite des efforts supplémentaires pour continuer d'améliorer leur efficacité. Le développement d'un ADC efficace exige i) l'optimisation des éléments de conception, comprenant le choix de la cible et de l'anticorps, les positions et le mode de conjugaison, le DAR ainsi que la stabilité du lien entre le cytotoxique et l'anticorps, et ii) une compréhension approfondie de sa pharmacocinétique, de sa biodistribution dans l'ensemble du corps et du ciblage tumoral. Cette thèse s'inscrit dans ce contexte d'optimisation des performances et d'amélioration de la compréhension des propriétés des ADC, et présente un double objectif. Il s'agit dans un premier temps de concevoir de nouveaux ADC ayant un design optimisé et un mode d'action original, et dans un second temps de développer une méthode d'analyse de la pharmacocinétique et de la biodistribution des ADC.

Tous les ADC ayant été approuvés par la FDA ainsi que les nombreux autres actuellement évalués en phases cliniques ciblent tous un antigène membranaire, et leur mode d'action cytotoxique est exercé par la petite molécule après internalisation du conjugué au sein des cellules. Dans le cas des ADC construits à partir d'une IgG1, une faible part de l'activité anti-tumorale peut être également attribuée aux fonctions effectrices médiées par le fragment Fc. Le premier objectif de cette thèse consiste à développer une approche différente, dans laquelle le composant anticorps cible une enzyme impliquée dans le développement tumoral, et apporterait ainsi une contribution à l'activité thérapeutique des conjugués en inhibant l'activité de cette enzyme. Pour cela, nous travaillons en collaboration avec l'équipe du Dr. Xin Ge (Université de Californie à Riverside), pour développer des ADC incorporant l'anticorps 3A2 inhibiteur compétitif de la MMP-14, une métalloprotéase de la matrice extracellulaire impliquée dans la prolifération métastatique. L'ADC obtenu par la conjugaison de cet anticorps

3A2 à un puissant cytotoxique, présente un double mode d'action : d'un côté l'anticorps inhibe l'activité catalytique pro-cancéreuse de la MMP-14 et réduit ainsi la prolifération métastatique, tandis que de l'autre côté la petite molécule induit la mort cellulaire et diminue le volume tumoral. De plus, dans le contexte de ce projet, nous avons fait le choix de travailler avec le fragment fonctionnel Fab, pour permettre d'une part de maximiser la distribution des conjugués au sein du modèle de tumeur mammaire 4T1 surexprimant la MMP-14, et d'autre part de réduire la durée des études de pharmacocinétique et de biodistribution compte tenu de la plus courte demi-vie de ce fragment d'anticorps.

Le second objectif de cette thèse est de développer une méthode analytique qui permettrait de simplifier la bioanalyse des ADC. En effet, en raison de leur composition unique, de leur nature hétérogène et de leur capacité à subir diverses biotransformations *in vivo*, de multiples méthodes analytiques, combinant des techniques utilisées pour les molécules biologiques et les petites molécules, sont utilisées pour la caractérisation et la quantification des ADC. Pour cela, nous envisageons une méthode polyvalente basée sur le double radiomarquage des conjugués, qui permettrait de distinguer le cytotoxique et l'anticorps respectivement marqués au  $^3\text{H}$  et au  $^{14}\text{C}$  (Figure 43A). Ce double marquage permettrait à la fois i) de mesurer simultanément la concentration des deux composants en circulation, évaluant ainsi la stabilité et la pharmacocinétique des ADC, et ii) de suivre et quantifier l'anticorps et la petite molécule dans les différents organes et dans le tissu pathologique cible, par double radio-imagerie *ex vivo* (Figure 43B). Cette méthode, qui est adaptable à n'importe quel ADC, sera ici appliquée à l'étude *in vivo* de cette nouvelle classe de conjugués ciblant la MMP-14.

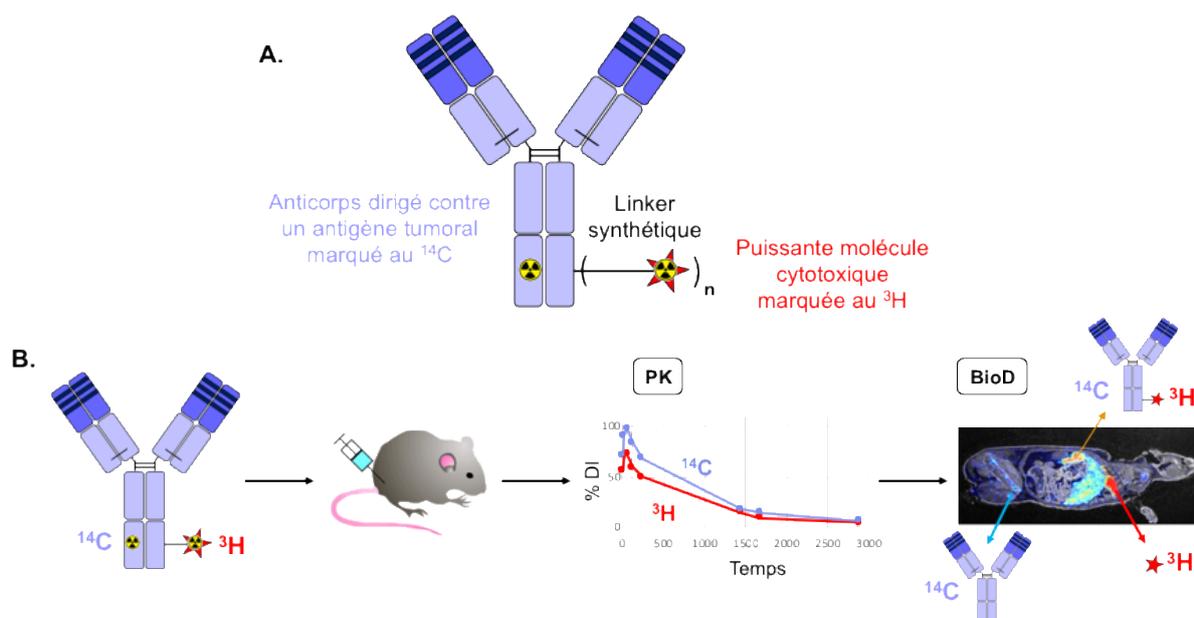


Figure 43 - Le double marquage radioactif  $^3\text{H}$  et  $^{14}\text{C}$  d'un ADC est un outil permettant de suivre et de quantifier les composants du conjugué *in vivo*. (A) Le double marquage d'ADC. (B) La quantification de la radioactivité dans les fluides et les tissus biologiques permet l'établissement du profil de pharmacocinétique et de biodistribution des conjugués. PK : Pharmacocinétique ; BioD : Biodistribution.

Les conjugués doublement marqués sont obtenus par la conjugaison simultanée de la molécule cytotoxique tritiée et d'une molécule marquée au  $^{14}\text{C}$  qui joue le rôle d'étiquette radioactive sur l'anticorps. Pour limiter les problèmes relatifs à l'hétérogénéité du DAR des ADC, nous avons fait le choix d'utiliser des méthodes de conjugaison régio-spécifiques, incluant des méthodes chimiques et des méthodes enzymatiques, qui permettent de produire des conjugués homogènes ayant une stoechiométrie définie et uniforme.

Dans un premier chapitre, nous verrons l'identification des positions réactives au sein de la séquence du Fab3A2 conduisant au développement de méthodes de conjugaison régio-spécifiques. Un deuxième chapitre sera consacré au marquage radioactif au tritium du cytotoxique ainsi qu'à la synthèse d'une molécule radiomarquée au carbone 14. Dans un troisième chapitre, nous montrerons que l'utilisation d'une combinaison de plusieurs méthodes de conjugaison régio-spécifiques permet l'obtention d'ADC doublement marqués. Et enfin, le quatrième chapitre présentera l'évaluation *in vivo* de ces conjugués doublement marqués.

Les molécules présentées dans les chapitres de résultats sont numérotées comme suit. Les molécules dont la synthèse est présentée dans la partie expérimentale sont numérotées en chiffre arabe. Les versions non-marquées "froides", et radiomarquées "chaudes" d'une même molécule numérotée X sont notées Xa et Xb respectivement. Les molécules dont la synthèse n'est pas présentée dans la partie expérimentale sont numérotées en chiffre romain.

# CHAPITRE 2

## IDENTIFICATION DE POSITIONS RÉACTIVES, VERS L'OBTENTION DE MÉTHODES DE MARQUAGE RÉGIO-SPÉCIFIQUES

L'obtention d'un conjugué doublement marqué par deux radioisotopes distincts à la fois sur la partie anticorps et sur le cytotoxique nécessite de disposer de méthodes de bioconjugaison orthogonales. Par ailleurs, afin de limiter les effets de ces conjugaisons sur la pharmacocinétique et la biodistribution des conjugués résultant, ces méthodes doivent être régio-spécifiques, permettant ainsi de produire des objets ayant une structure définie et homogène. Dans ce contexte, le choix a été fait d'utiliser des méthodes chimique et enzymatique ciblant les résidus cystéine et glutamine ou lysine respectivement.

## 1 LA TRANGLUSTAMINASE BACTÉRIENNE, UN OUTIL POUR LA MODIFICATION DES RÉSIDUS GLUTAMINE ET LYSINE

---

Les transglutaminases (TG) sont des enzymes appartenant à la famille des  $\gamma$ -glutamyltransférases, que l'on retrouve chez les mammifères, les microorganismes, les plantes, les invertébrés, les amphibiens, les poissons et les oiseaux, et qui catalysent la modification post-traductionnelle « calcium et GTP (Guanosine-5'-TriPhosphate) dépendante » de protéines<sup>298</sup>. Les TG catalysent les réactions de transamidation entre la fonction  $\gamma$ -carboxamide de la chaîne latérale de la glutamine et une lysine ou une amine primaire, ainsi que la réaction inverse d'hydrolyse des liaisons isopeptidiques  $\gamma$ - $\epsilon$ <sup>299</sup> (Figure 1). Ces enzymes sont impliquées dans divers processus physiologiques, tels que la coagulation du sang ou la cicatrisation cutanée.

---

<sup>298</sup> Schneider, H., Deweid, L., Avrutina, O. & Kolmar, H. Recent progress in transglutaminase-mediated assembly of antibody-drug conjugates. *Anal. Biochem.* **595**, 113615 (2020).

<sup>299</sup> Strop, P. Versatility of microbial transglutaminase. *Bioconjug. Chem.* **25**, 855–862 (2014).

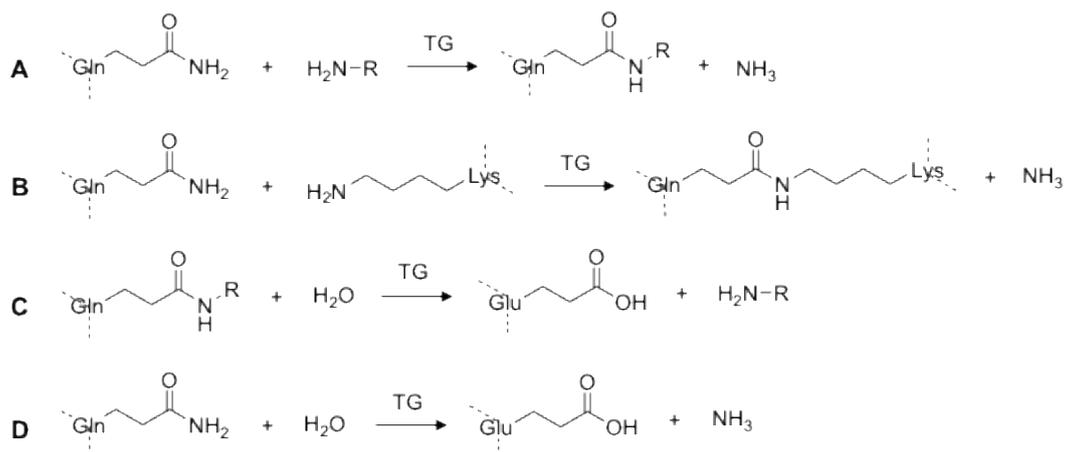


Figure 1 – Les différentes activités catalytiques des transglutaminases. (A) La conjugaison d'une amine primaire. (B) La réticulation des protéines. (C) L'activité isopeptidase. (D) La désamidation de glutamine.

## 1.1 CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DE LA TRANSGLUTAMINASE BACTÉRIENNE

Les transglutaminases bactériennes (BTG) ont été découvertes par screening de différents microorganismes dans le but d'obtenir des sources peu coûteuses de TG pour des applications biotechnologiques<sup>300</sup>. Les BTG catalysent la même réaction que les TG de mammifères, bien qu'elles n'aient aucune homologie de séquence ou de structure. De plus, contrairement aux TG de mammifères, l'activité des BTG n'est pas dépendante du calcium ou du GTP. Il a également été montré que les BTG présentent une spécificité étendue à une plus large gamme de substrats et une activité isopeptidase réduite<sup>301</sup>.

À ce jour, c'est la BTG isolée de *Streptomyces mobaraensis* qui est la mieux caractérisée et la plus largement utilisée. Elle est produite sous une forme zymogène, dans laquelle son extrémité N-terminal forme une hélice occupant le site catalytique et bloquant l'accès au substrat<sup>302</sup>. Le pro peptide de quarante-cinq acides aminés est clivé par des protéases endogènes pour libérer l'enzyme sous une forme active (38 kDa). La BTG contient au sein de son site actif la triade catalytique Cys<sup>64</sup>, Asp<sup>255</sup> et His<sup>274</sup> et son mécanisme réactionnel est similaire à celui des

<sup>300</sup> Rachel, N. M. & Pelletier, J. N. *Biotechnological applications of transglutaminases*. *Biomolecules* **3**, 870–888 (2013).

<sup>301</sup> Strop, P. *Versatility of microbial transglutaminase*. *Bioconjug. Chem.* **25**, 855–862 (2014).

<sup>302</sup> Kashiwagi, T. et al. *Crystal structure of microbial transglutaminase from Streptovorticillium mobaraense*. *J. Biol. Chem.* **277**, 44252–44260 (2002).

protéases à cystéine (Figure 2). Il a aussi été montré que cette BTG est capable de catalyser la réaction sur une large gamme de pH allant de 4 à 9 avec un pH optimal entre 5 et 8. Elle est également active entre 0 et 70°C avec une température optimale de 55°C, bien qu'elle perde rapidement de son activité à cette température<sup>303</sup>. Ce sont ces propriétés remarquables qui en font un outil polyvalent pour la modification des glutamines et des lysines, notamment pour la formation d'ADC<sup>304</sup>, de conjugués protéine-ADN<sup>305</sup>, protéine-polymère<sup>306</sup>, ou protéine-protéine<sup>307</sup>.

---

<sup>303</sup> Ando, H. et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2613–2617 (1989).

<sup>304</sup> Strop, P. et al. Location matters: Site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates. *Chem. Biol.* **20**, 161–167 (2013).

<sup>305</sup> Tominaga, J. et al. An enzymatic method for site-specific labeling of recombinant proteins with oligonucleotides. *Chem. Commun.* 401–403 (2007) doi:10.1039/b613793h.

<sup>306</sup> Mero, A., Spolaore, B., Veronese, F. M. & Fontana, A. 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 (2009).

<sup>307</sup> Kamiya, N. et al. S-peptide as a potent peptidyl linker for protein cross-linking by microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*. *Bioconjug. Chem.* **14**, 351–357 (2003).

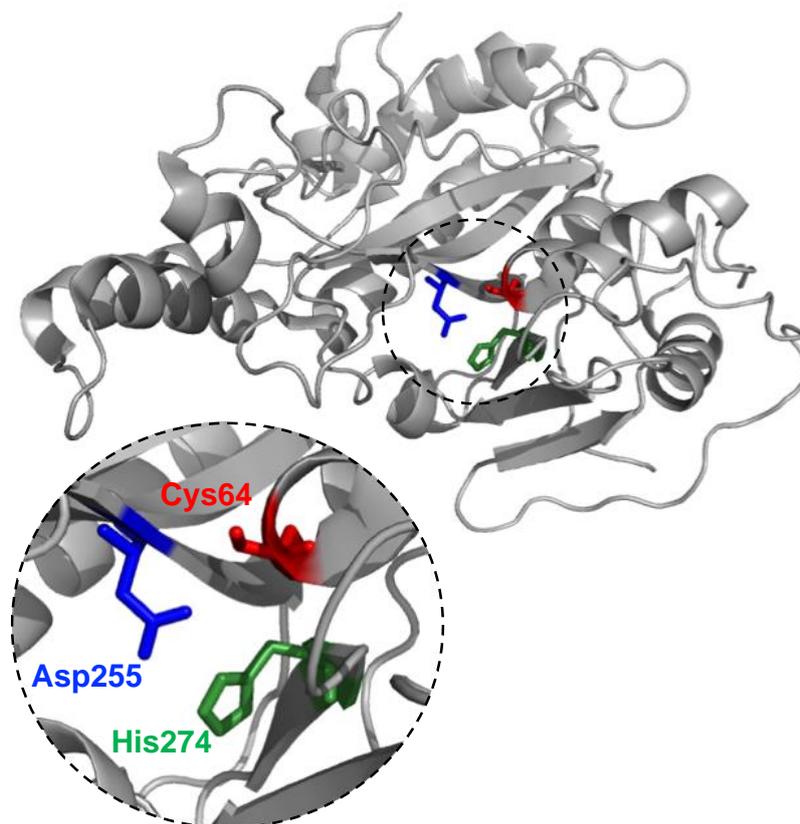


Figure 2 – Structure tridimensionnelle de la BTG isolée de *Streptomyces mobaraensis*. Représentation en mode cartoon avec les trois résidus Cys64 (en rouge), Asp255 (en bleu) et His274 (en vert) qui forment la triade catalytique.

Créée à partir de : 1IU4.pdb

## 1.2 LES DIFFÉRENTES APPLICATIONS DE LA TRANSGLUTAMINASE BACTÉRIENNE POUR LA GÉNÉRATION DE BIOCONJUGUÉS

### 1.2.1 La modification des résidus glutamine

La stratégie de modification des résidus glutamine est la plus décrite et la plus utilisée compte tenu de la facilité d'obtention de substrats (petite molécule, linker, fluorophore, etc...) portant une amine primaire réactive. Dans le contexte des ADC, la bioconjugaison a été décrite à partir de glutamines natives ou introduites par ingénierie de l'anticorps (Figure 3).

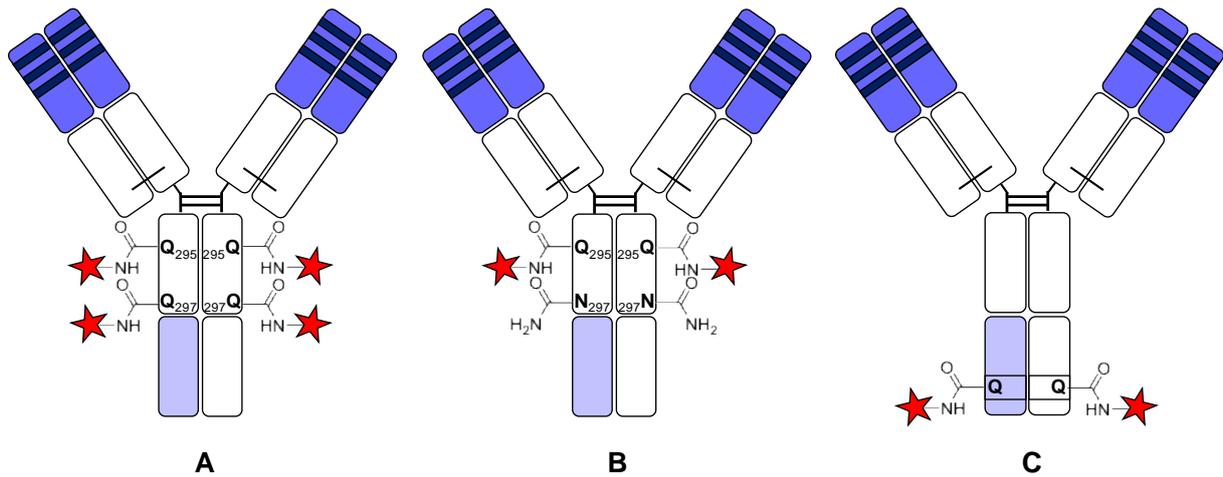


Figure 3 – Les différentes méthodes de conjugaison régio-spécifique des résidus glutamine au sein de la structure d’une IgG. (A) La mutation ponctuelle N297Q conduit à un DAR 4. (B) La déglycosylation de la position N297 rend le résidu Q295 réactif. (C) L’incorporation d’un motif peptidique spécifique au sein de la séquence permet d’introduire un résidu réactif.

C’est en 2008 que Schibli et ses collaborateurs se sont intéressés pour la première fois à la réactivité de la BTG vis-à-vis de la structure native d’une IgG<sup>308</sup>. En présence d’un fluorophore équipé d’un linker de type cadavérine, très peu de marquages de glutamine avaient été observés avec seulement un ratio moyen de 0,1 fluorophore introduit par anticorps. Cependant, une amélioration significative du marquage jusqu’à quatre fluorophores introduits par anticorps a été reportée dans le cas d’une IgG génétiquement déglycosylée par mutation du site de glycosylation N297Q. Cette observation a ensuite été plus largement étudiée, et une analyse par spectrométrie de masse a permis de prouver la modification stoechiométrique (4:1) de l’anticorps muté et d’identifier les deux positions modifiées : la Gln295 et la Gln297 (Figure 3A). De façon similaire, une étape de déglycosylation enzymatique d’une IgG native par la PNGaseF avant la conjugaison par la BTG a permis l’obtention de conjugués avec une stoechiométrie 2:1<sup>309</sup> (Figure 3B). Ces résultats donnent ainsi accès à une méthodologie

<sup>308</sup> Mindt, T. L. et al. Modification of different IgG1 antibodies via glutamine and lysine using bacterial and human tissue transglutaminase. *Bioconjug. Chem.* **19**, 271–278 (2008).

<sup>309</sup> Jeger, S. et al. Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **49**, 9995–9997 (2010).

performante, permettant l'obtention d'ADC avec une valeur de DAR homogène et définie (2 ou 4), et qui a depuis été exemplifiée par d'autres groupes<sup>310,311</sup>.

En plus de la déglycosylation d'une IgG native, l'incorporation d'un motif peptidique spécifique est une stratégie courante pour la modification régio-spécifique de protéines par la BTG (Figure 3C). En 2013, Strop et ses collaborateurs ont été les pionniers dans ce domaine, en introduisant un "tag" glutamine contenant la séquence LLQGA capable d'être spécifiquement modifiée par la BTG<sup>312</sup>. Par ingénierie de l'anticorps, cette séquence a été introduite à environ quatre-vingt-dix positions exposées différentes au sein de la séquence d'une IgG. Douze des positions étudiées ont été efficacement modifiées, démontrant ainsi la grande permissivité de cette enzyme. L'analyse par spectrométrie de masse d'ADC générés par introduction de cette séquence LLQGA en C-terminal de la chaîne lourde et de la chaîne légère d'une IgG, a permis de confirmer la bonne régio-spécificité de la réaction, avec seulement 1,3% de marquage non spécifique de la Gln295, correspondant à la portion d'anticorps naturellement non-glycosylé<sup>313</sup>. La même expérience réalisée sur l'anticorps dont le site de conjugaison secondaire a été muté (Q295N) a permis l'obtention d'ADC sélectivement modifiés sur la position LLQGA à 99,8%. Bien que d'autres séquences spécifiques aient été développées - comme le "tag" Myc (EQKLISEEDL)<sup>314</sup> ou le "tag" SPI7G (DIPIGQGMTG)<sup>315</sup> - le "tag" LLQGA reste le plus largement utilisé.

---

<sup>310</sup> Puthenveetil, S. et al. 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 (2016).

<sup>311</sup> Lhospice, F. et al. Site-Specific conjugation of monomethyl auristatin e to Anti-CD30 antibodies improves their pharmacokinetics and therapeutic index in rodent models. *Mol. Pharm.* **12**, 1863–1871 (2015).

<sup>312</sup> Strop, P. et al. Location matters: Site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates. *Chem. Biol.* **20**, 161–167 (2013).

<sup>313</sup> Farias, S. E. et al. Mass spectrometric characterization of transglutaminase based site-specific antibody-drug conjugates. *Bioconjug. Chem.* **25**, 240–250 (2014).

<sup>314</sup> Dennler, P., Bailey, L. K., Spycher, P. R., Schibli, R. & Fischer, E. Microbial transglutaminase and c-myc-tag: A strong couple for the functionalization of antibody-like protein scaffolds from discovery platforms. *ChemBioChem* **16**, 861–867 (2015).

<sup>315</sup> Ebenig, A. et al. Efficient Site-Specific Antibody–Drug Conjugation by Engineering a Nature-Derived Recognition Tag for Microbial Transglutaminase. *ChemBioChem* **20**, 2411–2419 (2019).

### 1.2.2 La modification des résidus lysine

Toutes les approches présentées ci-dessus utilisent l'anticorps comme substrat glutamine pour la réaction de transamidation catalysée par la BTG. Cependant, certaines études ont également décrit la procédure inverse, qui cible les résidus lysine à la surface de la protéine comme site de conjugaison (Figure 4). Dans le but d'identifier des lysines natives et réactives, divers types d'anticorps comprenant des variantes chimériques, humanisées ou humaines, et qui incorporent des chaînes légères  $\kappa$  ou  $\lambda$ , ont été mis en réaction avec la transglutaminase<sup>316</sup>. Cependant, comme aucune des environ quatre-vingt-dix lysines natives n'a été modifiée par le substrat modèle Z-QG conjugué à la biotine, les auteurs ont développé un "tag" de séquence GGSTKHKIPGGS (Figure 4A). Cette séquence peptidique, contenant deux sites de conjugaison, a été introduite à l'extrémité C-terminal de la chaîne lourde et de la chaîne légère des anticorps. Alors que la chaîne légère a été doublement modifiée comme attendu, l'analyse ESI-MS a révélé une triple modification de la chaîne lourde et, la Lys447, qui est l'extrémité C-terminal native de l'anticorps, a été identifiée comme étant le troisième site de conjugaison. Les auteurs ont alors suggéré qu'un clivage enzymatique de la Lys447 en C-terminal a lieu lors de la production des anticorps en cellules HEK293, et que l'ajout d'acides aminés supplémentaires inhiberait cette protéolyse<sup>19</sup>. L'incorporation d'acides aminés simples en position 448 a permis de confirmer leur hypothèse, car une conjugaison efficace de la Lys447 a été observée pour tous les acides aminés incorporés, à l'exception de Glu, Asp, Lys et Arg qui n'inhibent pas la protéolyse de l'extrémité C-terminal, et Pro qui diminue significativement l'efficacité de transamidation par la BTG (Figure 4B). Les auteurs ont également identifié et reporté plusieurs positions au sein de la structure d'une IgG1, qui peuvent être ponctuellement mutées en lysine, pour permettre une conjugaison régio-spécifique et efficace d'un substrat glutamine à l'anticorps<sup>19</sup> (Figure 4C).

---

<sup>316</sup> Spidel, J. L. et al. Site-Specific Conjugation to Native and Engineered Lysines in Human Immunoglobulins by Microbial Transglutaminase. *Bioconjug. Chem.* **28**, 2471–2484 (2017).

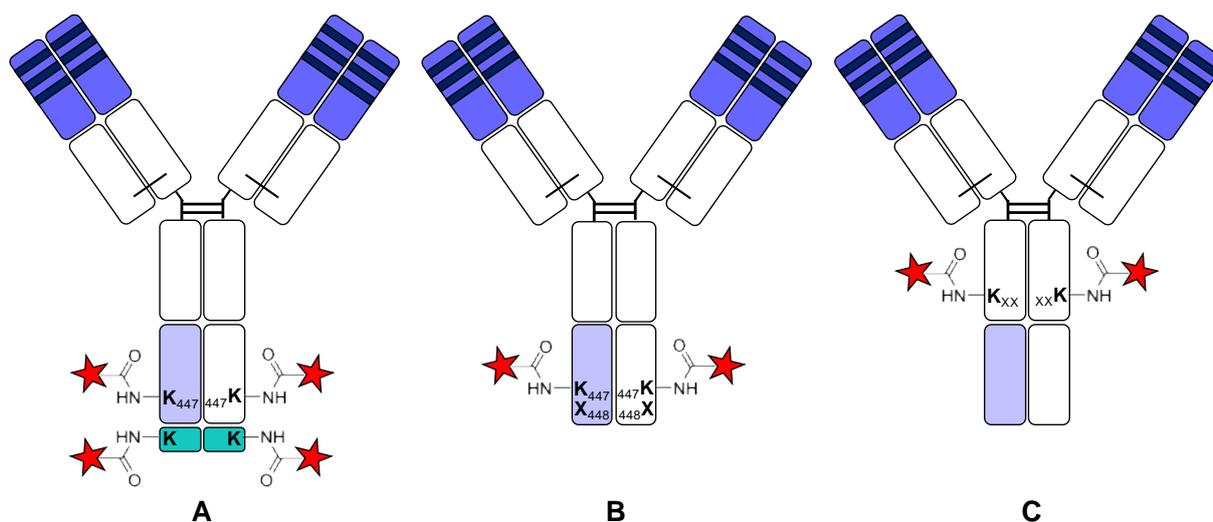


Figure 4 - Les différentes méthodes de conjugaison régio-spécifique de résidus lysine au sein de la structure d'une IgG. (A) L'incorporation d'un motif peptidique spécifique à l'extrémité N-terminal de la chaîne lourde permet d'introduire un résidu réactif et de protéger la position Lys447 de la protéolyse (B) L'incorporation d'un acide aminé en position N-terminal protège la Lys447 de la protéolyse. (C) Des mutations ponctuelles de la séquence au niveau de positions exposées deviennent des lysines réactives.

### 1.2.3 Avantages et limitations de la méthode

Par rapport aux méthodes traditionnelles de conjugaison, la bioconjugaison catalysée par la BTG présente certains avantages. En comparaison avec d'autres enzymes utilisées pour la génération d'ADC, la BTG ne nécessite pas l'introduction d'une séquence peptidique "tag" très longue, qui aurait plus de chance d'interférer avec la stabilité de l'anticorps<sup>317</sup>, ni sa localisation à une position précise<sup>318</sup>; ce qui permet ainsi une certaine flexibilité d'utilisation. De plus, la liaison isopeptidique formée est très stable et empêche une libération prématurée du cytotoxique durant la phase de circulation, ce qui est aussi un avantage considérable de cette technologie<sup>319</sup>. Cependant, il est important de noter que les IgGs natives ne sont malheureusement pas des substrats naturels de la BTG. En effet, l'introduction de mutations au sein de la séquence, ou une étape de traitement est nécessaire pour obtenir une modification quantitative, et s'accompagnent d'avantages et d'inconvénients. La

<sup>317</sup> Schneider, H., Deweid, L., Avrutina, O. & Kolmar, H. Recent progress in transglutaminase-mediated assembly of antibody-drug conjugates. *Anal. Biochem.* **595**, 113615 (2020).

<sup>318</sup> Strop, P. et al. Location matters: Site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates. *Chem. Biol.* **20**, 161–167 (2013).

<sup>319</sup> Strop, P. Versatility of microbial transglutaminase. *Bioconjug. Chem.* **25**, 855–862 (2014).

déglycosylation enzymatique pour exposer la Gln295 peut être appliquée à n'importe quel anticorps de manière simple et directe, mais le clivage du glycane augmente l'hydrophobie de l'anticorps et le rend plus sensible aux variations de pH et de température<sup>320</sup>. Néanmoins dans certains cas, l'incorporation d'un motif peptidique au sein de la séquence de l'anticorps, si petit soit-il, peut avoir un impact sur la stabilité et la structure globale de la protéine<sup>20</sup>. Dans ce contexte, la mutation ponctuelle d'un résidu natif en une lysine réactif apparaît comme la meilleure stratégie pour minimiser l'altération des propriétés intrinsèques de l'anticorps. Toutefois, cela implique des étapes de synthèse plus laborieuses du substrat glutamine apparenté, étant donné qu'il n'existe que peu de substrats commerciaux adaptés.

## 2 L'UTILISATION DE LA TRANSGLUTAMINASE BACTÉRIENNE POUR LE MARQUAGE DU FAB3A2

---

L'utilisation de la BTG comme d'un outil de conjugaison a été appliquée au Fab3A2, le fragment fonctionnel d'anticorps inhibiteur de l'activité catalytique de la MMP-14, afin d'identifier des résidus glutamine ou lysine pouvant donner lieu à des positions de conjugaison régio-spécifique.

### 2.1 LA MODIFICATION ENZYMATIQUE DES RÉSIDUS GLUTAMINE

Dans l'objectif de modifier un résidu glutamine, l'utilisation de ce format d'anticorps réduit nous prive du résidu Gln295 contenu au sein du fragment Fc et naturellement réactif vis-à-vis de la BTG lorsque le résidu Asn297 est déglycosylé<sup>321</sup>. A cet égard, il apparaît nécessaire d'introduire un site de conjugaison défini en réalisant une mutation ponctuelle de la séquence protéique. C'est la séquence peptidique LLQGA, que nous avons décidé d'introduire en C-

---

<sup>320</sup> Reusch, D. & Tejada, M. L. Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes. *Glycobiology* **25**, 1325–1334 (2015).

<sup>321</sup> Mindt, T. L. et al. Modification of different IgG1 antibodies via glutamine and lysine using bacterial and human tissue transglutaminase. *Bioconj. Chem.* **19**, 271–278 (2008).

terminal de la chaîne légère, une position qui a été décrite comme étant hautement conjugable<sup>322</sup>.

*Escherichia coli* est l'hôte bactérien le plus utilisé pour la production de protéines recombinantes. Les bactéries de Gram négatif telle que *E.coli* possèdent deux membranes délimitant trois espaces. La membrane plasmique est la plus interne et délimite l'espace cytoplasmique, tandis que la membrane externe sépare l'environnement bactérien de l'espace extracellulaire. Le périplasme, localisé entre ces deux membranes, est un compartiment qui constitue un milieu oxydant favorable au repliement des protéines. Lors de la production, une séquence peptidique signal est fusionnée à l'extrémité N-terminal de la protéine pour l'adresser à l'espace périplasmique.

La production du Fab3A2 et du mutant LC-LLQGA dans le périplasme de la bactérie *E.coli* a été validée par notre collaborateur Xin Ge. Nous avons ensuite montré que l'introduction de la séquence LLQGA ne modifiait pas les propriétés du Fab3A2 en termes de capacité à inhiber l'activité catalytique de la MMP-14 (Figure 5).

---

<sup>322</sup> Strop, P. et al. Location matters: Site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates. *Chem. Biol.* **20**, 161–167 (2013).

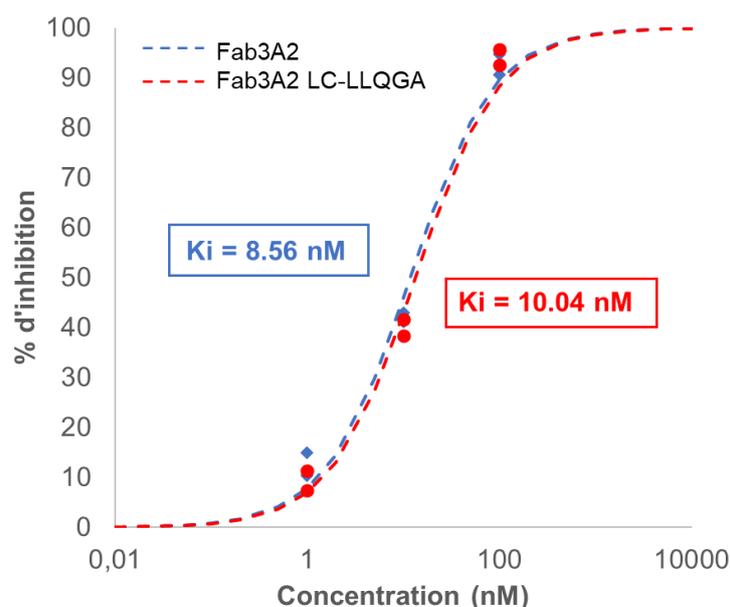


Figure 5 - L'insertion du motif peptidique LLQGA en C-terminal de la chaîne légère ne modifie pas la capacité du Fab à inhiber l'activité catalytique de la MMP-14.

### 2.1.1 L'identification des positions réactives

La réactivité de ce Fab3A2 LC-LLQGA vis-à-vis de la BTG a ensuite été évaluée en présence d'une molécule modèle **3a** (Figure 6). La structure de cette molécule a été choisie de la façon suivante : les deux acides aminohexanoïque (Ahx) permettent d'introduire à la fois une fonction amine primaire et un bras espaceur qui la rende suffisamment accessible, la lysine a été choisie pour sa fonction amine sur sa chaîne latérale qui nous permet d'introduire facilement de la radioactivité par réaction avec le N-(propionyloxy)succinimide tritié ( $[^3\text{H}]$ -NPS) et la tyrosine en C-terminal sert de chromophore afin de faciliter la détection et le dosage UV de la molécule.

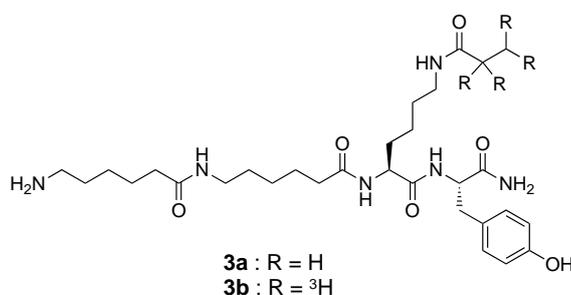


Figure 6 - Structure de la molécule amine primaire utilisée pour la conjugaison des résidus glutamine en présence de BTG.

La réaction de la molécule **3a** avec le Fab3A2 LC-LLQGA en présence de BTG a d'abord été suivie en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Figure 7). Bien que cette méthode analytique n'ait pas la précision suffisante dans les hauts poids moléculaires pour pouvoir donner la masse exacte de la protéine de départ et du conjugué obtenu (+573 Da par molécule conjuguée), il a été néanmoins possible de distinguer deux pics ayant un déplacement de +588 Da et +1072 Da par rapport à la masse initiale du Fab3A2. Ces deux pics correspondent respectivement à un conjugué de DAR1 et de DAR2 ; suggérant l'existence d'au moins deux résidus Gln réactifs au sein de la séquence (Figure 7A).

L'analyse de la forme réduite du Fab, permettant de différencier la chaîne légère (environ 23 kDa) de la chaîne lourde (environ 26 kDa), a permis d'obtenir plus d'informations quant à la localisation des différents sites de conjugaison (Figure 7B). Ainsi, l'incrément de +606 Da mesuré sur la chaîne légère contenant la séquence LLQGA, correspond à la conjugaison d'une seule molécule. La chaîne lourde, quant à elle, n'a pas été visualisée lors de l'analyse du conjugué sous forme réduite ; suggérant que cette dernière a été modifiée par la BTG et que l'introduction de cette modification change ses propriétés de désorption et/ou d'ionisation.

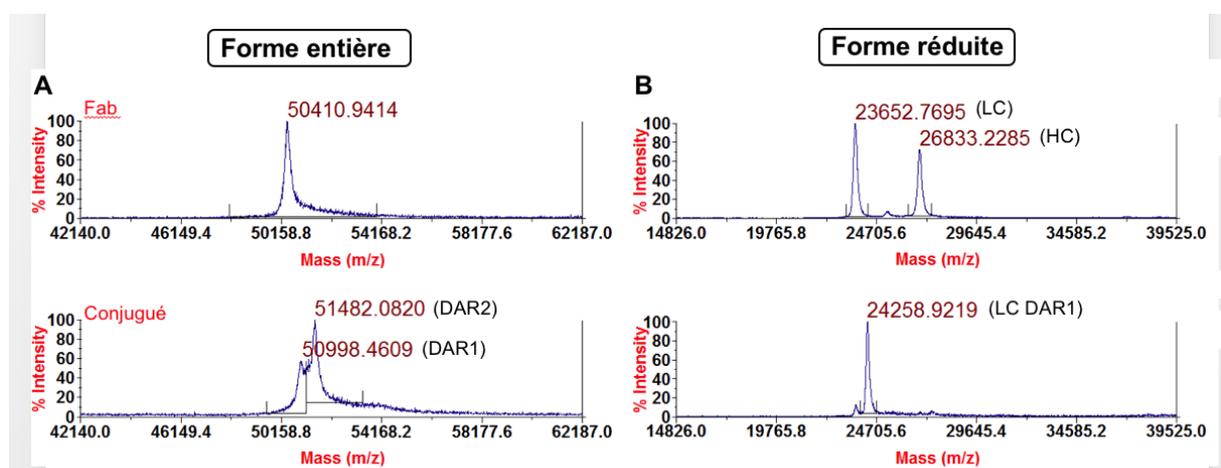


Figure 7 - Analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF du Fab3A2 et du conjugué obtenu après modification par la BTG. (A) L'analyse des protéines sous forme entière (environ 50 kDa). (B) L'analyse de la forme réduite des protéines permet de distinguer la chaîne légère (environ 23 kDa) de la chaîne lourde (environ 26 kDa).

L'analyse MALDI-TOF des peptides issus de la digestion trypsique du Fab3A2 a permis d'identifier deux fragments conjugués dont la séquence a été vérifiée par fragmentation

MS/MS (Figure 8). En effet, comme attendu, la séquence peptidique C-terminal LLQGA a été efficacement modifiée par la BTG ; ce qui est caractérisé par la disparition du peptide de masse 1465 Da (H-SFNRGEC(CAM)GLLQGA-OH) et l'apparition de la forme conjuguée correspondante de masse 2038 Da (Figure 8A). Un seul autre site de conjugaison a pu être attribué aux modifications supplémentaires. Il s'agit de la Gln108 contenue dans le peptide H-SHQWIR-OH (826 Da) localisé au sein du long domaine CDR-H3, et donnant le peptide conjugué de masse 1399 Da (Figure 8B). L'analyse MS/MS des peptides conjugués a montré des fragments signatures (140 Da ; 310 Da ; 411 Da ; 477 Da et 591 Da) caractéristiques de la présence de la modification. A noter, qu'il n'existe aucune homologie entre les séquences LLQGA et SHQWI qui aurait pu permettre de prédire la réactivité de cette seconde position.

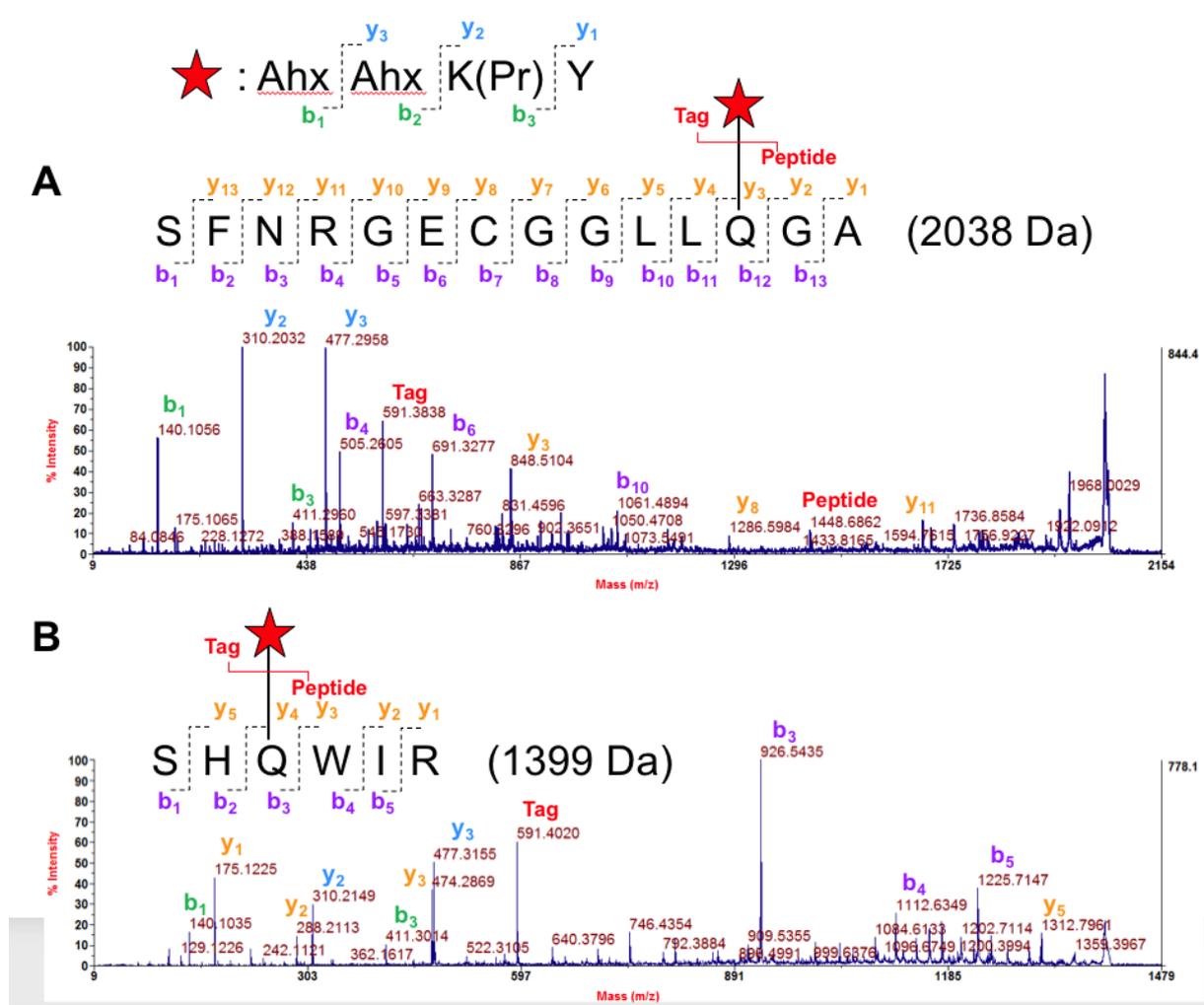


Figure 8 – L'identification des résidus glutamine réactifs par fragmentation MS/MS des peptides issus d'une digestion trypsique. (A) La modification de la position LLQGA donne un peptide conjugué de masse 2038 Da. (B) La modification de la Gln108 au sein du domaine CDR-H3 donne un peptide conjugué de masse 1399 Da.

Afin d'expliquer la réactivité inattendue de la position HC-Gln108, nous nous sommes appuyés sur les travaux de plusieurs groupes qui ont cherché à déterminer l'impact des acides aminés entourant la glutamine sur sa réactivité. Une première étude s'est basée sur un heptapeptide de séquence GGGQGGG, pour lequel chaque résidu glycine a été individuellement substitué à plusieurs acides aminés<sup>323</sup>. Ces mutations ont révélé que l'incorporation de résidus hydrophobes à l'extrémité N-terminal de la glutamine (positions -3, -2 et -1) accélère la réaction. Dans une seconde étude, les auteurs ont cherché à identifier des substrats qui présentent une haute affinité pour la BTG, en réalisant le screening d'une librairie de 10<sup>11</sup> peptides linéaires par phage display<sup>324</sup>. La plupart des clones qui ont été retenus contenaient un acide aminé aromatique (Trp, Phe ou Tyr) aux positions -5 à -3, un résidu Arg ou hydrophobe aux positions +1 ou +2, ainsi que des résidus hydrophobes aux positions -2 et -1. Hormis la présence d'acides aminés hydrophobes en position +1 (W) et +2 (I), la HC-Gln108 ne répond pas aux autres critères de réactivité qui ont été établis.

Cependant, en plus de la séquence primaire en acides aminés qui entourent le résidu glutamine, il a été suggéré que la structure secondaire locale au sein de la protéine joue également un rôle important dans la réactivité d'un résidu glutamine vis-à-vis de la BTG. En effet, il a été postulé que l'absence de structure secondaire et la flexibilité de la chaîne peptidique améliorent la réactivité de la glutamine<sup>325</sup>. Dans l'ensemble, la spécificité de la BTG est ainsi gouvernée par plusieurs facteurs : la séquence primaire, la structure secondaire, ainsi que la flexibilité autour de la glutamine et son accessibilité par la BTG. Dans le cas de la HC-Gln108 au sein du long domaine CDR-H3 flexible, il semblerait que l'absence de structure secondaire soit prévalente sur la séquence primaire en acides aminés. Dans un cas plus général, la combinaison de tous ces éléments rend difficile de prédire si une glutamine donnée sera un substrat de la BTG ; par conséquent, l'approche expérimentale reste la plus adaptée pour tester la réactivité.

---

<sup>323</sup> Ohtsuka, T., Ota, M., Nio, N. & Motoki, M. Comparison of substrate specificities of transglutaminases using synthetic peptides as acyl donors. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* vol. 64 2608–2613 (2000).

<sup>324</sup> Sugimura, Y., Yokoyama, K., Nio, N., Maki, M. & Hitomi, K. Identification of preferred substrate sequences of microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* using a phage-displayed peptide library. *Arch. Biochem. Biophys.* **477**, 379–383 (2008).

<sup>325</sup> Spolaore, B. et al. Local unfolding is required for the site-specific protein modification by transglutaminase. *Biochemistry* **51**, 8679–8689 (2012).

### 2.1.2 La différence de réactivité entre les résidus glutamine

En faisant varier les conditions réactionnelles, telles que le temps de réaction ou le nombre d'équivalents de la molécule amine primaire, une différence de réactivité a pu être observée entre les deux résidus glutamine. Ainsi, en condition stoechiométrique de **3b**, une seule bande radiomarquée à environ 25 kDa a été observée en conditions réductrice, suggérant un marquage exclusif d'une des deux chaînes (Figure 9A). Par ailleurs, l'analyse en radio-HPLC du digestat tryptique, ne fait apparaître qu'un seul pic ; confirmant une sélectivité de marquage pour une seule position (Figure 9B). Enfin, l'analyse en spectrométrie de masse du digestat tryptique du Fab3A2 modifié par **3a** dans les mêmes conditions et le séquençage MS/MS du seul peptide modifié (2038 Da) montrent une modification unique de la glutamine au sein de la séquence LLQGA (Figure 9C).



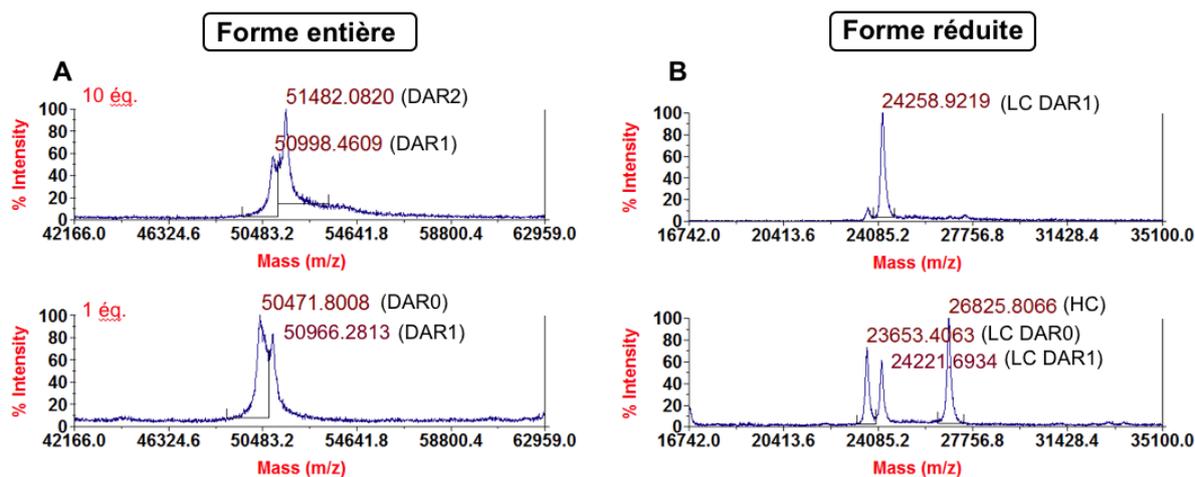


Figure 10 - Analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF des conjugués obtenus après modification par la BTG en présence de 1 ou 10 équivalents de la molécule **3a**. (A) L'analyse des protéines sous forme entière (environ 50 kDa). (B) L'analyse de la forme réduite des protéines permet de distinguer la chaîne légère (environ 23 kDa) de la chaîne lourde (environ 26 kDa).

La HC-Gln108 est localisée au sein du domaine CDR-H3 à une distance de trois résidus des acides aminés impliqués dans l'interaction inhibante avec le site actif de la MMP-14<sup>326</sup> (Figure 11A). Nous avons montré que le Fab3A2 conjugué avec un DAR2 sur les positions HC-Gln108 et LC-LLQGA possède des propriétés équivalentes au Fab3A2 de départ en termes de capacité à inhiber l'activité catalytique de la MMP-14 (Figure 11B).

<sup>326</sup> Lee, K. B., Dunn, Z. & Ge, X. Reducing proteolytic liability of a MMP-14 inhibitory antibody by site-saturation mutagenesis. *Protein Sci.* **28**, 643–653 (2019).

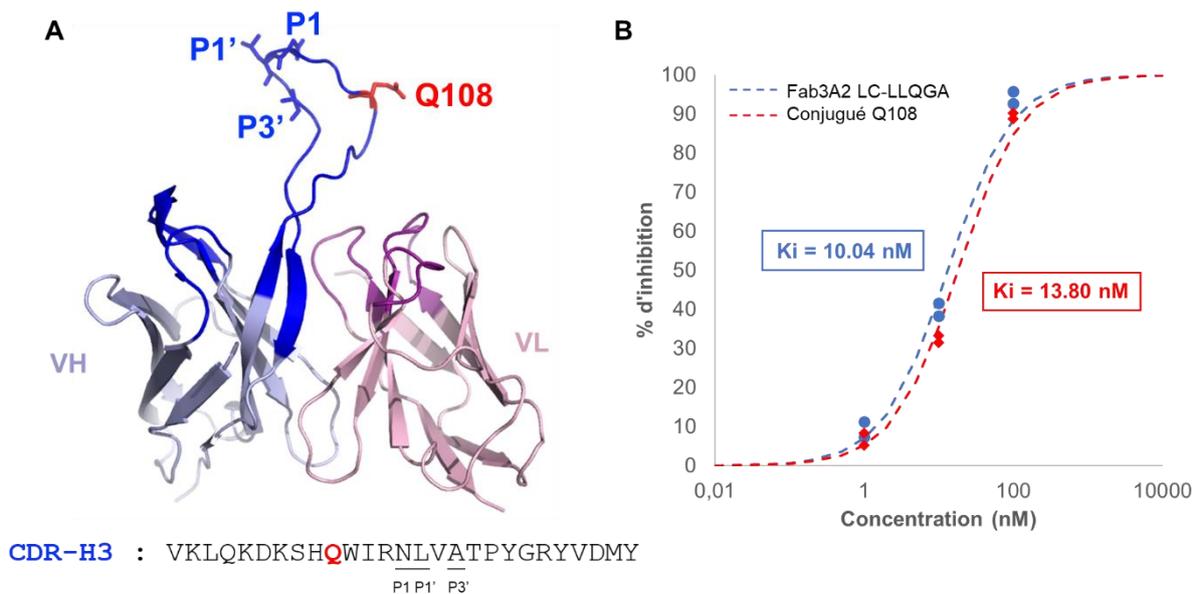


Figure 11 - La modification du résidu HC-Gln108 localisé au sein du domaine CDR-H3 ne modifie pas sa capacité à inhiber l'activité catalytique de la MMP-14. (A) Model 3D de la structure des domaines VH (en bleu) et VL (en rose) du Fab3A2 mettant en évidence la localisation des résidus Asn112 ; Leu113 et Ala115 (en bleu) impliqués dans l'interaction avec la gorge catalytique de la MMP-14 et le résidu Gln108 réactif (en rouge). (B) Détermination de la constante d'inhibition ( $K_i$ ) du Fab3A2 et du conjugué Q108.

L'ensemble de ces résultats suggère :

1. À partir de ce Fab3A2 LC-LLQGA, seule l'introduction simultanée de deux modifications sur les positions LLQGA et HC-Gln108 peut se faire de manière quantitative.
2. Cette double conjugaison peut être réalisée tout en préservant les propriétés de liaison de la protéine au site catalytique de la MMP-14.
3. Afin d'obtenir un DAR1, il n'est pas nécessaire d'introduire une séquence spécifique LLQGA dans la séquence du Fab3A2 natif. Dans ce cas, seule la HC-Gln108 serait conjuguée.

## 2.2 LA MODIFICATION ENZYMATIQUE DES RÉSIDUS LYSINE

Dans l'optique d'une éventuelle conjugaison sur les résidus lysine, nous avons cherché à identifier des résidus lysine réactifs au sein de la séquence native.

### 2.2.1 L'identification des positions réactives

La stratégie qui a été suivie pour l'identification des résidus lysine réactifs au sein du Fab3A2 est la même que celle décrite précédemment pour celle des glutamines (section 2.1.1). La structure du térapeptide modèle **5** employé ici (Figure 12) a été choisie de la façon suivante : on retrouve à l'extrémité N-terminal le dipeptide glutaminyglycine protégé par un groupement carbobenzyloxy (CBz), un substrat glutamine de haute affinité pour la BTG<sup>327</sup>, qui est fonctionnalisé en C-terminal par le dipeptide Val-Ala utilisé comme linker clivable dans le développement d'ADC. La conjugaison de ce térapeptide à une protéine correspond à un incrément de +490 Da.

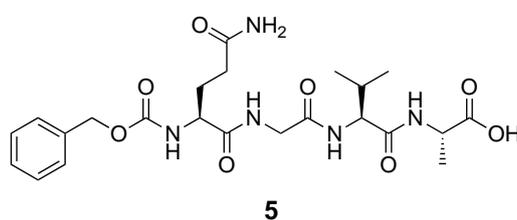


Figure 12 - Structure du substrat glutamine modèle utilisé pour la modification des résidus lysine en présence de BTG.

L'analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF de la protéine sous forme entière, montre un mélange de deux espèces protéiques de masse 50891 Da (+481 Da) et 51280 (+870 Da) correspondant aux conjugués de DAR1 et de DAR2 respectivement (Figure 13A). L'analyse de la forme réduite du Fab modifié n'a montré aucune modification de la chaîne légère ; ce qui a permis de conclure qu'il existe au moins deux résidus lysine réactifs au sein de la séquence de la chaîne lourde (Figure 13B). D'une manière similaire à ce qui a été observé dans le cadre de la conjugaison des résidus glutamine, les modifications introduites sur la chaîne lourde changent ses propriétés d'ionisation et/ou de désorption.

<sup>327</sup> Spycher, P. R. et al. Dual, Site-Specific Modification of Antibodies by Using Solid-Phase Immobilized Microbial Transglutaminase. *ChemBioChem* **18**, 1923–1927 (2017).

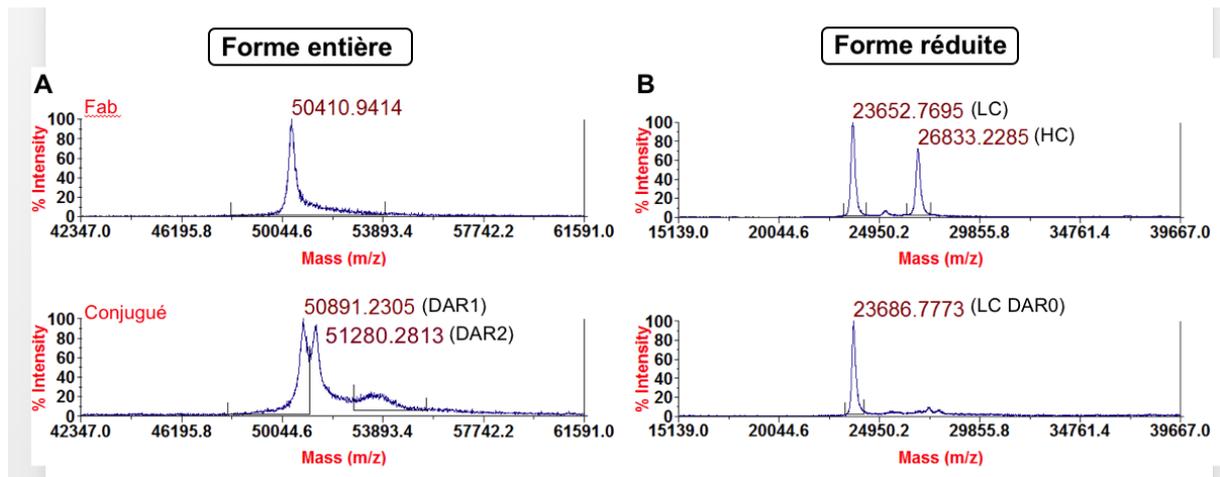


Figure 13 – Analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF du Fab3A2 et du conjugué obtenu après modification par la BTG. (A) L'analyse des protéines sous forme entière (environ 50 kDa). (B) L'analyse de la forme réduite des protéines permet de distinguer la chaîne légère (environ 23 kDa) de la chaîne lourde (environ 26 kDa).

L'analyse MALDI-TOF des peptides issus de la digestion trypsique du Fab3A2 a permis d'identifier deux fragments conjugués dont les séquences ont été vérifiées par fragmentation MS/MS (Figure 14). Il s'agit des peptides de masse 1559 Da et 2160 Da contenant respectivement les résidus HC-Lys105 et HC-Lys241. La Lys105 se situe dans le domaine CDR-H3 en position -3 de la HC-Gln108 précédemment identifiée comme un résidu glutamine réactif, tandis que la Lys241 est localisée quelques résidus en amont de la séquence poly-histidine en C-terminal de la chaîne lourde. Il n'existe, là encore, aucune homologie de séquence entre ces deux résidus, illustrant une fois de plus, que l'accessibilité et la structure secondaire prédominent dans la détermination du caractère réactif d'un résidu<sup>328</sup>.

<sup>328</sup> Spolaore, B. et al. Local unfolding is required for the site-specific protein modification by transglutaminase. *Biochemistry* **51**, 8679–8689 (2012).

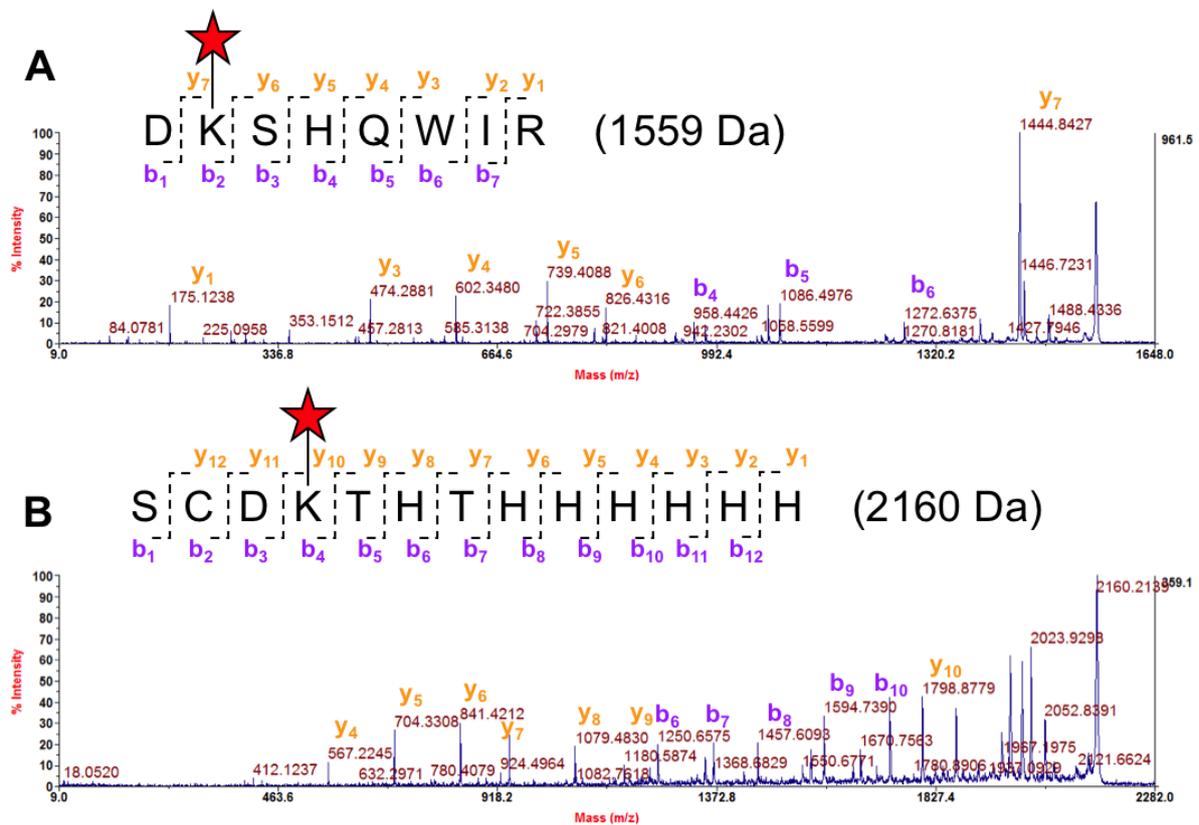


Figure 14 - L'identification des résidus lysine réactifs par fragmentation MS/MS des peptides issus d'une digestion trypsique. (A) La modification de la Lys105 au sein du domaine CDR-H3 donne un peptide conjugué de masse 1559 Da. (B) La modification de la position Lys241 donne un peptide conjugué de masse 2160 Da.

## 2.2.2 La différence de réactivité entre les résidus lysine

Tandis que deux positions réactives ont été identifiées par l'analyse MALDI-TOF du digestat trypsique, un mélange des conjugués de DAR1 et de DAR2 a été observé par spectrométrie de masse (Figure 13) ; ce qui suggère une modification partielle d'au moins une des positions.

La modification de la chaîne latérale de la lysine par la BTG inhibe l'activité protéolytique de la trypsine au niveau de la liaison C-terminal du résidu (Figure 15A). Ainsi, deux peptides parents ont pu être suivis comme fragments signature de l'avancement de la modification de la lysine par la BTG. Dans le cas de la modification de la HC-Lys105, c'est la disparition du peptide H-SHQWIR-OH de masse 826 Da qui a été suivie, le peptide H-DK-OH étant trop petit pour être observé par cette méthode analytique. De la même façon, c'est le peptide H-THTHHHHHHH-OH de masse 1180 Da qui a permis d'évaluer la modification de la HC-Lys241 par la BTG tandis que le peptide H-SCDK-OH n'étant pas observable. La disparition complète du fragment de masse

826 Da accompagnée de la présence du peptide de masse 1180 Da a permis de conclure que la HC-Lys105 est le résidu le plus réactif. Il peut être modifié de manière quantitative, tandis que la conjugaison sur la HC-Lys241 n'est que partielle (Figure 15B).

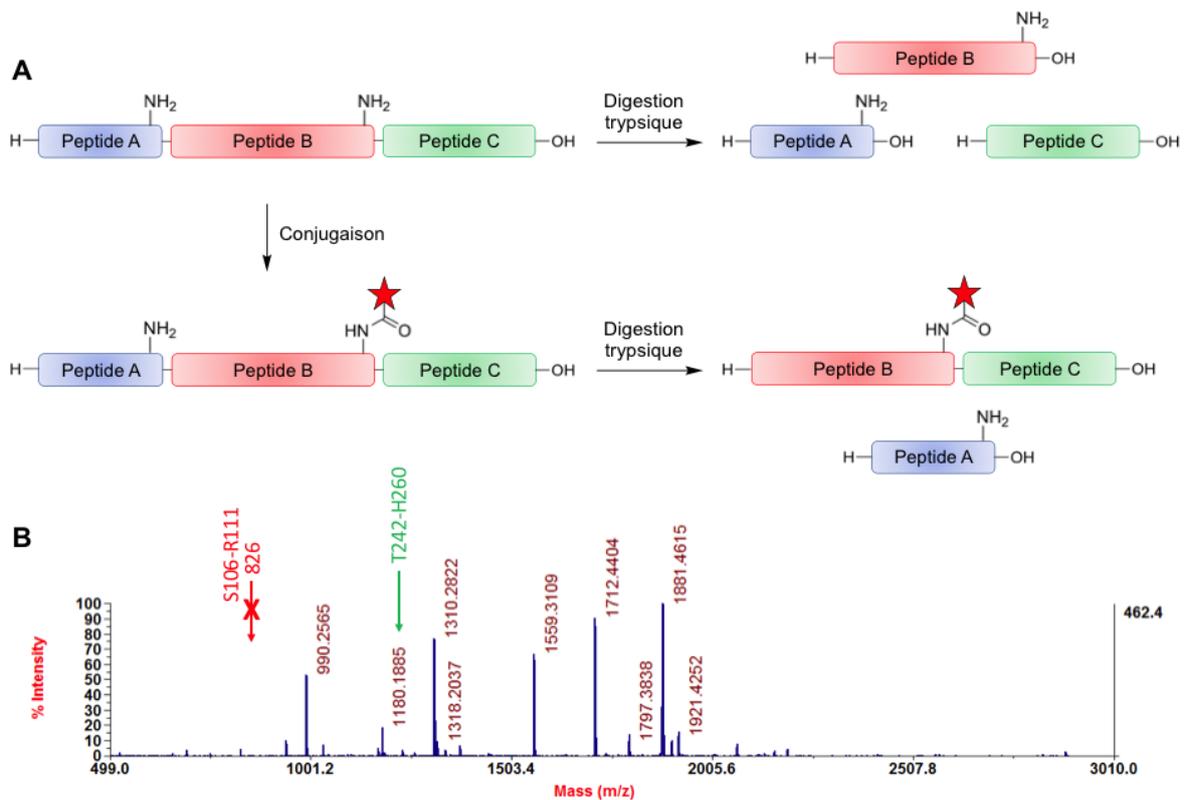


Figure 15 – L'analyse des peptides issus de la digestion trypsique met en évidence la plus grande réactivité de la position HC-Lys105 par rapport à HC-Lys241. (A) La modification de la chaîne latérale de la lysine par la BTG inhibe l'activité protéolytique de la trypsine au niveau de la liaison C-terminal du résidu. (B) L'analyse MALDI-TOF du digestat trypsique met en évidence la présence du fragment de masse 1180 Da.

D'une manière similaire à ce qui a été fait dans le cadre du marquage de glutamine (section 2.1.2), les paramètres réactionnels comme le nombre d'équivalents de substrat glutamine mis en réaction ont été changés dans le but d'identifier des conditions conduisant à l'obtention d'un conjugué ayant une stœchiométrie définie et homogène. Contrairement à ce qui a été observé précédemment pour le marquage des glutamines, la diminution du nombre d'équivalents de substrat engagé n'a pas d'impact sur la régio-spécificité de la réaction de conjugaison des résidus lysine ; seule une diminution du taux de conjugaison des deux positions a été observée.

### 2.2.3 L'immobilisation sur support solide améliore la régio-spécificité

Tandis que la modification régio-spécifique et stœchiométrique des résidus glutamine par une molécule amine *via* la BTG a été largement étudiée, l'approche inverse, à savoir la conjugaison des résidus lysine par un substrat glutamine, n'est que peu décrite. Spycher et ses collaborateurs ont montré que l'immobilisation de la BTG à la surface de billes de verre permet d'améliorer la régio-spécificité de la réaction<sup>329</sup>. En effet, en prenant l'exemple de la protéine avidine, qui possède deux résidus lysine réactifs (Lys58 et Lys127) modifiés de manière non-stœchiométrique en solution, seule la modification de la Lys127 a été constatée en présence de BTG immobilisée. Cette modification unique a été attribuée à la diminution de la flexibilité de rotation de la BTG engendrée par l'immobilisation sur support, qui rend l'accès à des résidus situés dans des structures moins exposées plus difficile.

En s'inspirant de ces observations mais en suivant une stratégie opposée, nous avons eu l'idée d'utiliser l'immobilisation sur support solide afin de créer de l'encombrement autour d'une position réactive pour la rendre inaccessible à la BTG. La position partiellement modifiée HC-Lys241 se localisant à quelques résidus de la séquence poly-histidine C-terminal, nous avons émis l'hypothèse que l'immobilisation du Fab3A2 sur des billes de chélate métallique *via* sa séquence poly-histidine masquerait le résidu réactif HC-Lys241, réduisant ainsi sa réactivité.

Nous avons ainsi montré que la conjugaison du Fab3A2 immobilisé sur support solide est régio-sélective pour la position HC-Lys105, permettant l'obtention d'un conjugué de DAR1 (Figure 16).

---

<sup>329</sup> Spycher, P. R. et al. Dual, Site-Specific Modification of Antibodies by Using Solid-Phase Immobilized Microbial Transglutaminase. *ChemBioChem* **18**, 1923–1927 (2017).

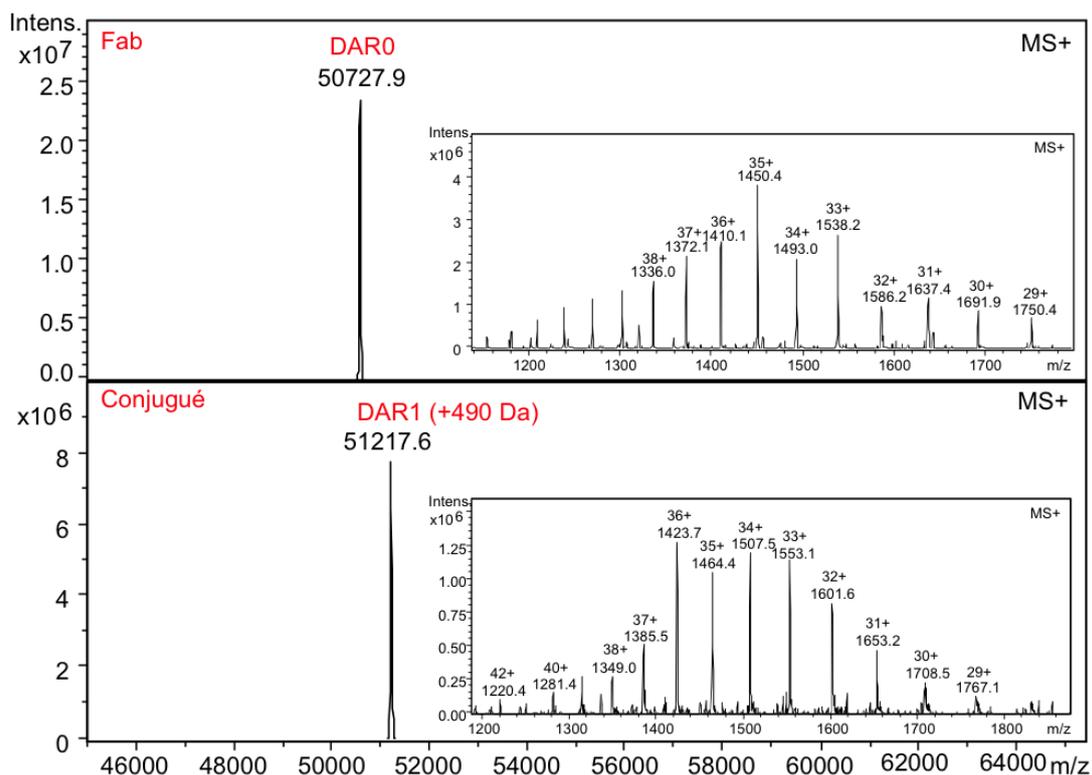


Figure 16 - Analyse par spectrométrie de masse de type ESI-trappe ionique du Fab et du conjugué de DAR1 obtenu par réaction enzymatique sur support solide.

Par ailleurs, nous avons vérifié que ce Fab3A2 conjugué avec un DAR1 sur la position HC-Lys105, située à six résidus du site d'interaction avec la MMP-14<sup>330</sup>, possède des propriétés équivalentes au Fab3A2 de départ en termes de capacité à inhiber l'activité catalytique de la MMP-14 (Figure 17).

<sup>330</sup> Lee, K. B., Dunn, Z. & Ge, X. Reducing proteolytic liability of a MMP-14 inhibitory antibody by site-saturation mutagenesis. *Protein Sci.* **28**, 643–653 (2019).

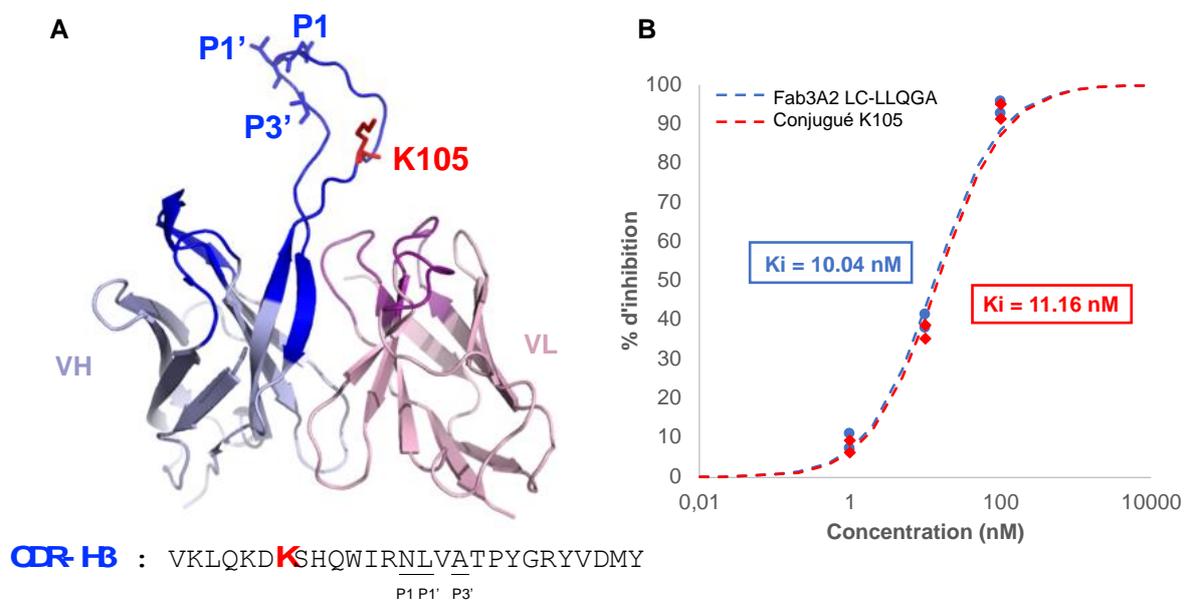


Figure 17 - La modification du résidu HC-Lys105 localisé au sein du domaine CDR-H3 ne modifie pas sa capacité à inhiber l'activité catalytique de la MMP-14. (A) Model 3D de la structure des domaines VH (en bleu) et VL (en rose) du Fab3A2 mettant en évidence la localisation des résidus Asn112 ; Leu113 et Ala115 (en bleu) impliqués dans l'interaction avec la gorge catalytique de la MMP-14 et le résidu Lys105 réactif (en rouge). (B) Détermination de la constante d'inhibition ( $K_i$ ) du Fab3A2 et du conjugué.

Afin d'optimiser cette étape de conjugaison, nous avons également évalué l'influence du support. Plusieurs types de billes de chélate métallique ayant des propriétés différentes sont commercialisées pour la capture de protéines contenant une séquence poly-histidine. Deux résines contenant des ions nickel ont été utilisées et comparées : les résines Ni-IDA (acide iminodiacétique) et Ni-NTA (acide nitrilotriacétique), deux des plus communément utilisées pour la purification de protéines. Bien que ces deux ligands chélatent tous les deux un ion  $Ni^{2+}$  capable d'interagir avec deux résidus histidine via leur fonction imidazole, ils diffèrent cependant par leur nombre de coordination qui est respectivement de trois et de quatre pour Ni-IDA et Ni-NTA. Ce nombre de coordination joue un rôle important pour la pureté et la quantité de protéines issues de la purification. Les différents avantages et inconvénients des deux supports sont regroupés dans le tableau 1.

Résine Ni-IDA	Résine Ni-NTA
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Haute capacité de liaison (+)</li> <li>▪ Présence de liaisons non-spécifiques (-)</li> <li>▪ Rendement de purification plus élevé (+)</li> <li>▪ Élué avec une faible concentration d'imidazole (+)</li> <li>▪ Moins coûteuse (+)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Plus faible capacité de liaison (-)</li> <li>▪ Meilleure spécificité de liaison (+)</li> <li>▪ Rendement de purification plus faible (-)</li> <li>▪ Élué avec une haute concentration d'imidazole (-)</li> <li>▪ Plus coûteuse (-)</li> </ul>

*Tableau 1 – Comparaison des avantages et des inconvénients des deux types de billes de chélate métallique Ni-IDA et Ni-NTA.*

Globalement, la résine Ni-IDA présente plus d'avantages que la résine Ni-NTA, à l'exception de la présence de liaisons non-spécifiques qui pourraient diminuer la pureté de la protéine isolée.

L'utilisation de la résine Ni-IDA comme support de réaction et de purification a conduit à la récupération d'environ 70% de Fab conjugué. Néanmoins, plusieurs fragments peptidiques attribuables à la séquence en acides aminés de la BTG ont été identifiés au sein du digestat tryptique de la fraction d'élué (Figure 18) ; ce qui montre que la BTG interagit de manière non-spécifique avec le support. En ajoutant une étape de lavage avec une faible concentration en imidazole (10 mM) au protocole de purification du fournisseur, nous avons obtenu une fraction d'élué pure, mais un rendement de purification d'environ 30% car une quantité non négligeable du Fab a été élué prématurément durant l'étape de lavage. La résine Ni-NTA permet quant à elle l'obtention d'une fraction d'élué dépourvue de BTG (Figure 18) avec un rendement de purification d'environ 50%. C'est donc cette résine qui a été choisie pour la suite du projet.

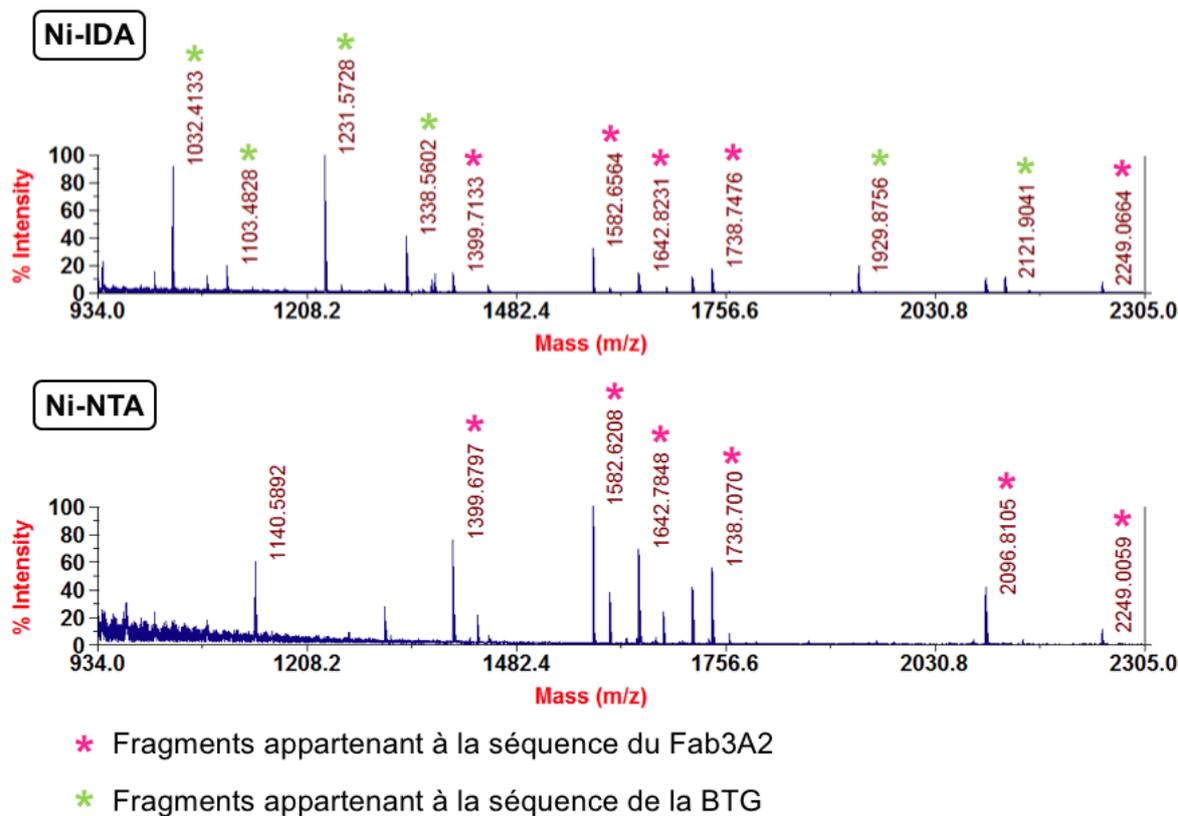


Figure 18 - L'analyse MALDI-TOF des peptides issus de la digestion trypsique met en évidence la présence de BTG dans la fraction d'élution issue d'une purification sur résine Ni-IDA.

### 3 LA MODIFICATION CHIMIQUE DES RÉSIDUS CYSTÉINE

Dans le but d'avoir à disposition plusieurs méthodes de conjugaison régio-spécifiques qui soient orthogonales les unes aux autres pour l'introduction simultanée de deux modifications, nous avons également exploré la modification chimique des résidus cystéine.

#### 3.1 LA PRODUCTION D'UN FAB3A2 PORTANT UN RÉSIDU CYSTÉINE LIBRE

La séquence en acides aminés du fragment fonctionnel Fab contient dix résidus cystéine répartis en quatre ponts disulfures intra-chaîne au sein des domaines VH, CH1, VL et CL et un pont disulfure inter-chaîne HC-LC localisé proche de l'extrémité C-terminal des domaines CH1 et CL. L'utilisation des résidus cystéine natifs pour la conjugaison conduit à un mélange

hétérogène de conjugués qui diffèrent en termes de DAR et de site de conjugaison. De plus la suppression des ponts disulfures au sein de la protéine peut avoir un impact direct sur sa structure et sa stabilité. Dans ce contexte, l'introduction d'un résidu cystéine additionnel et distinct par mutation ponctuelle de la séquence permettrait l'obtention d'un conjugué avec un DAR défini et homogène de 1, tout en préservant l'intégrité structurale de la protéine.

### **3.1.1 La production en système bactérien**

L'utilisation de la bactérie *E.coli* ayant été validée pour la production du Fab3A2 et de son mutant LC-LLQGA, nous avons initialement choisi de l'adopter à nouveau pour la production d'un Fab contenant une cystéine recombinante. Cependant, le périplasme reste un petit compartiment cellulaire, et les rendements de production associés sont très faible, de l'ordre du milligramme de protéine par litre de culture et l'introduction d'une cystéine libre au sein de la séquence du Fab a fait de surcroît chuter le rendement de production. Ce système d'expression s'étant avéré peu adapté à la production de grosses quantités, la production en système eucaryote a été explorée.

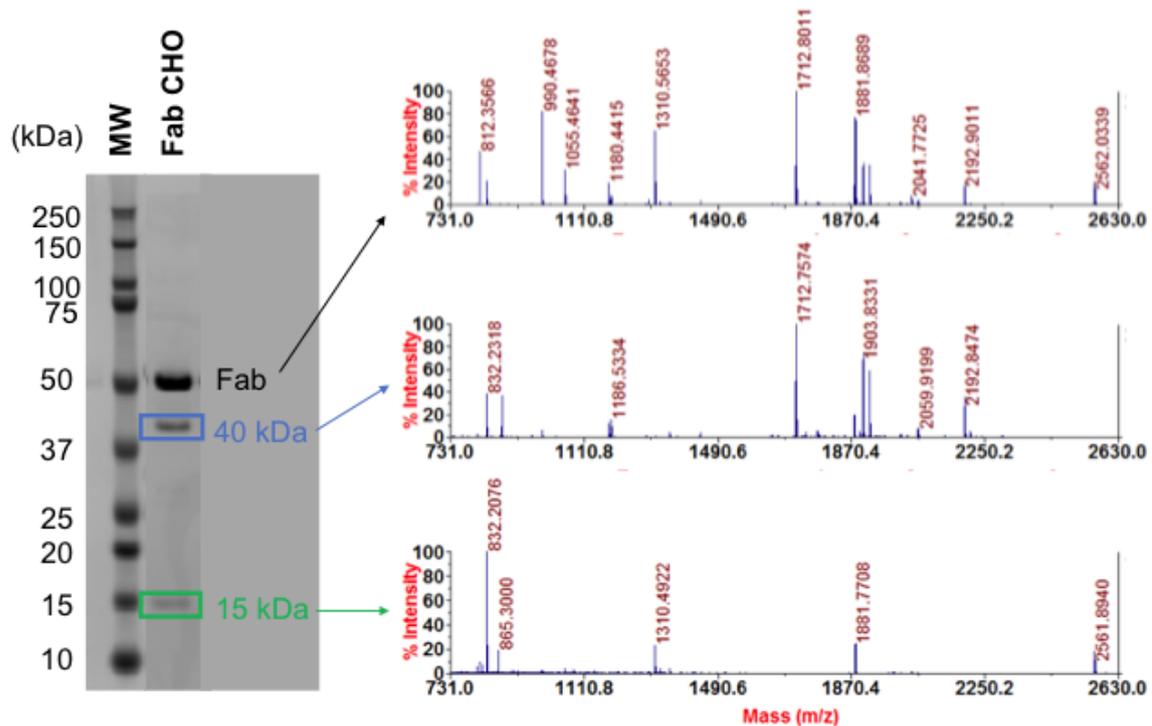
### **3.1.2 La production en système eucaryote**

Les organismes eucaryotes sont des systèmes plus élaborés et mieux adaptés à la production de protéines recombinantes complexes. Les cellules sont compartimentées et possèdent une voie d'adressage qui permet de sécréter la protéine recombinante correctement repliée dans le milieu extracellulaire.

#### *3.1.2.1 Les cellules CHO*

Les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) sont les plus utilisées industriellement pour la production à grande échelle d'anticorps monoclonaux. A l'échelle du laboratoire, il est possible d'atteindre des rendements de l'ordre de 100 mg d'anticorps par litre de culture.

Toutefois, nos premiers essais avec le Fab3A2 ont montré que ce système d'expression n'était pas adapté à la production en raison d'une activité protéolytique présente dans le milieu de culture. En effet, l'analyse par gel SDS-PAGE du Fab issu de la production CHO donne trois bandes visibles à environ 50 kDa ; 40 kDa et 15 kDa correspondant respectivement au Fab et à deux fragments de la protéine (Figure 19). L'analyse par spectrométrie de masse des peptides issus de la digestion trypsique dans le gel des deux bandes de plus faible poids moléculaire a permis d'identifier le site de protéolyse, qui est localisé entre les résidus Arg111 et Asn112 au sein du domaine CDR-H3 du Fab.



Chaîne lourde:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNLG SSSMHWVRQA PGKGLEWVAS IYPSYSYTY  
 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARVK LQDKSHNWI RNLVATPYGR  
 YVM DYWGQGT LVT VSSASTK GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG  
 ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKKVEPKSCD  
 KTHTHHHHHH

Chaîne légère:

DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCRASQSVS SAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASSLYSGVPS  
 RFGSRSRGT FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YGYPIITFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS  
 DSQ LKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL  
 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GECGGLLQGA

Figure 19 – L'analyse MALDI-TOF des peptides issus de la digestion trypsique dans le gel des différentes bandes a permis d'identifier un site de protéolyse (flèche rouge) localisé entre les résidus Arg111 et Asn112 au sein du domaine CDR-H3.

### 3.1.2.2 Les cellules HEK293

Les cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney) sont également utilisées pour la production d'anticorps à large échelle. Contrairement aux bactéries, les cellules humaines et plus globalement de mammifères sont capables de produire des protéines incorporant différentes modifications post traductionnelles. A travers nos premiers essais, nous avons ainsi identifié un site de N-glycosylation de type N-X-S/T (avec X différent de proline) au sein de la séquence du

Fab3A2 causant un incrément de masse d'environ 2000 Da attribuable à la chaîne lourde (Figure 20).

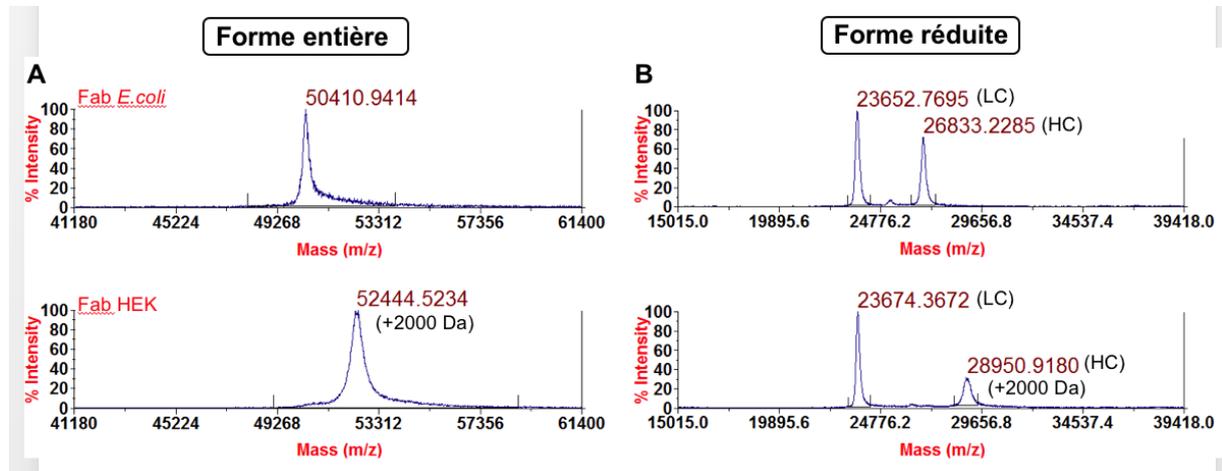


Figure 20 - Analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF du Fab3A2 et du conjugué obtenu après modification par la BTG. (A) L'analyse des protéines sous forme entière (environ 50 kDa). (B) L'analyse de la forme réduite des protéines permet de distinguer la chaîne légère (environ 23 kDa) de la chaîne lourde (environ 26 kDa).

La présence de ce site de glycosylation pose un problème pour différentes raisons. La première est que le Fab glycosylé est une population de plusieurs glycoformes différents et cette hétérogénéité au sein de l'échantillon complique son analyse par spectrométrie de masse de type électrospray. La seconde raison est que ce site de glycosylation est situé au sein du CDR-H1 et il a été observé que la présence de cette modification post-traductionnelle diminue la capacité du Fab à inhiber l'activité catalytique de la MMP-14 (Figure 21). En conséquence et pour la suite du projet, la mutation S30G a été systématiquement introduite afin de supprimer ce site de glycosylation ; permettant ainsi de restaurer l'affinité du Fab pour le domaine catalytique de la MMP-14 (Figure 21).

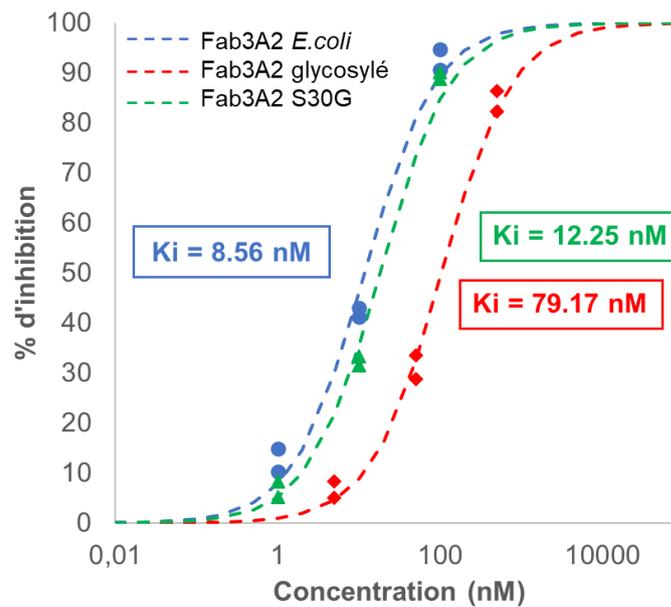
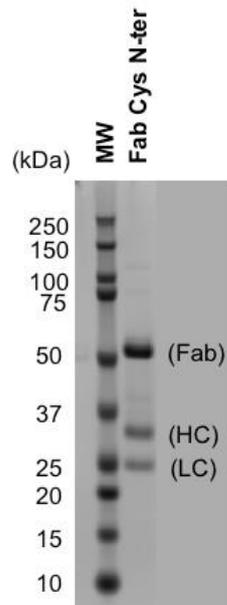


Figure 21 - Le motif de glycosylation au sein du domaine CDR-H1 du Fab3A2 diminue sa capacité à inhiber l'activité catalytique de la MMP-14.

Afin d'accéder à un Fab incorporant un résidu cystéine en position comparable à celle de la séquence LLQGA, nous avons initialement fait le choix d'introduire ce résidu en C-terminal de la chaîne légère. Cependant, L'analyse sur gel SDS-PAGE en condition non réductrice du Fab LC-Cys produit en cellules HEK293 présente trois bandes distinctes à environ 50 kDa, 30 kDa et 25 kDa (Figure 22). L'analyse par spectrométrie de masse des peptides issus de la digestion dans le gel des bandes de 30 et 25 kDa a montré qu'il s'agissait de la chaîne lourde et de la chaîne légère ; suggérant que l'étape d'oxydation des cystéines sous forme de ponts disulfures n'a été que partielle, notamment au niveau du pont inter-chaîne. Par ailleurs, l'ajout d'un oxydant n'a pas modifié la répartition des espèces protéiques entre les bandes correspondant à la forme oxydée et aux deux chaînes sous forme réduite. Sur la base de ces observations, il a été postulé que l'introduction de la cystéine recombinante à cinq résidus de la Cys213 impliquée dans la formation du pont disulfure inter-chaîne pourrait provoquer un mauvais appariement des résidus cystéine entre eux.



**C-term** : ...SPVTKSFNRGECGGGGC  
213

Figure 22 - L'insertion d'une cystéine recombinante en C-terminal de la chaîne légère à cinq résidus de la Cys213 entraîne un mauvais appariement des résidus sous forme de ponts disulfures qui est visualisé par la présence de la chaîne légère (LC) et de la chaîne lourde (HC) par gel SDS-PAGE en condition non réductrice.

Dans ce contexte, nous avons cherché à identifier une région au sein de l'anticorps qui soit plus favorable à l'introduction d'un résidu cystéine. Junutula et ses collaborateurs ont identifié et reporté plusieurs mutations ponctuelles au sein du domaine constant du fragment Fab conduisant à des résidus cystéines hautement réactifs vis-à-vis de la conjugaison d'un composé contenant une fonction maléimide<sup>331</sup>. Parmi les différentes mutations décrites au sein du domaine constant de la chaîne légère, c'est la mutation V109C qui conduit à la position la plus réactive. Cette mutation LC-V109C a donc été introduite au sein de la séquence du Fab3A2 et a conduit à l'obtention d'un Fab correctement replié qui possède les mêmes capacités d'inhibition de la MMP-14 que la forme native (Figure 23).

<sup>331</sup> Junutula, J. R. et al. Rapid identification of reactive cysteine residues for site-specific labeling of antibody-Fabs. *J. Immunol. Methods* **332**, 41–52 (2008).

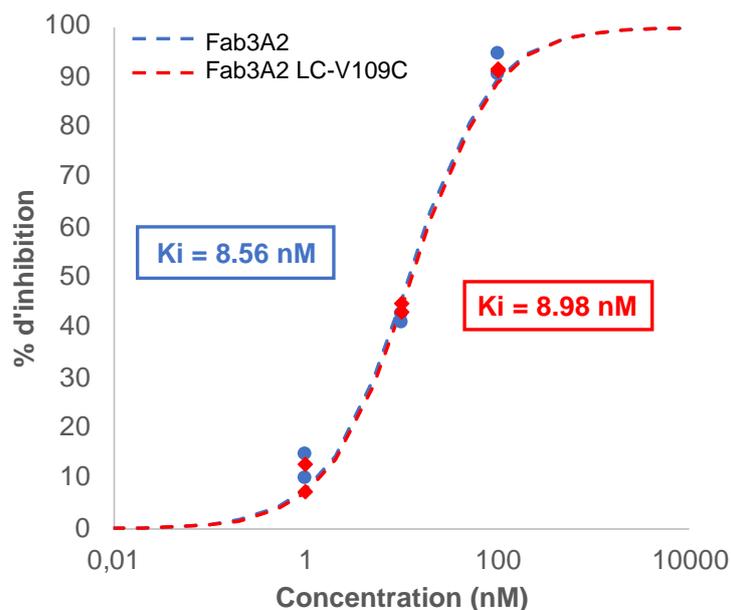


Figure 23 – La mutation V109C au sein de la chaîne légère ne modifie pas la capacité du Fab à inhiber l'activité catalytique de la MMP-14.

### 3.2 LA CONJUGAISON SUR SUPPORT SOLIDE

Le Fab3A2 LC-V109C issu de la production en cellules HEK293 n'est pas réactif vis-à-vis de la conjugaison d'un composé maléimide. Lors du processus de production, le résidu cystéine libre réagit avec les différents thiols présents dans le milieu de culture tels que l'acide aminée cystéine ou le glutathion pour former un pont disulfure par oxydation. En effet, l'analyse par spectrométrie de masse de type ESI-trappe ionique du Fab produit a montré une forme protéique majoritaire ayant un incrément de masse de +120 Da par rapport à la masse attendue, qui correspond à la cystéinylation de la Cys109 (Figure 24).

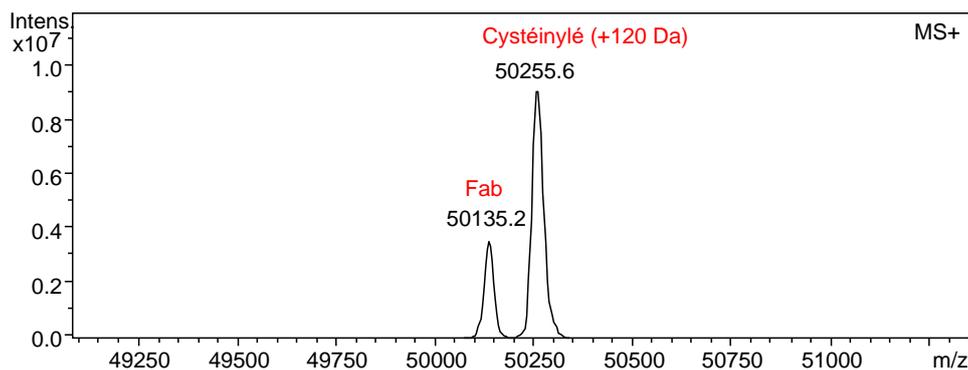


Figure 24 – L’analyse par spectrométrie de masse de type ESI-trappe ionique du Fab LC-V109C montre une forme majoritaire cystéinylée non réactive vis-à-vis de la conjugaison.

Une succession d’étapes de réduction et d’oxydation sont alors nécessaires pour rendre le résidu cystéine réactif. Dans un premier temps, un traitement du Fab par une solution de l’agent réducteur TCEP a été réalisé afin de réduire l’ensemble des onze cystéines au sein de la séquence. Dans un second temps, une étape de réoxydation ménagée en présence d’une solution d’acide déhydroascorbique (DHA) a permis de reformer les ponts disulfures structurels de la protéine tout en laissant la position d’intérêt réactive pour la conjugaison. Dans le but de simplifier ce processus et de limiter la perte de protéine lors des étapes de purification intermédiaire, nous avons utilisé une stratégie sur support solide (Figure 25).

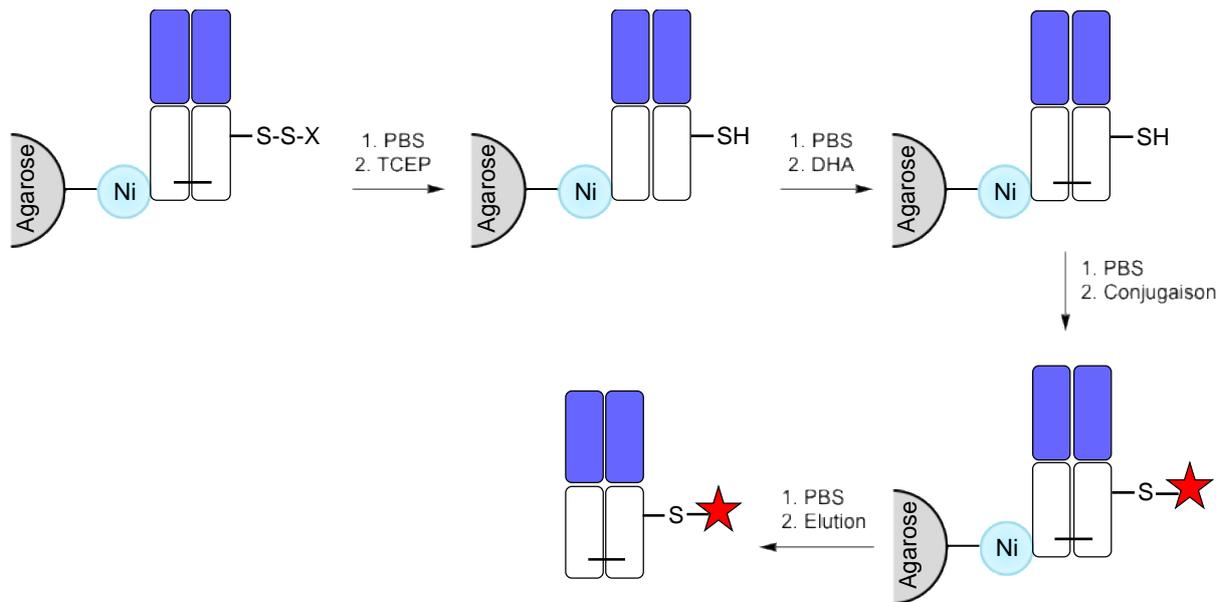
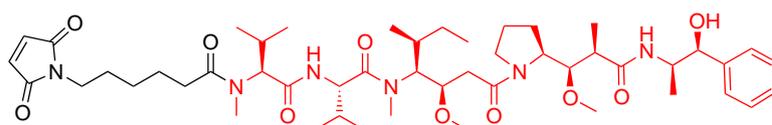
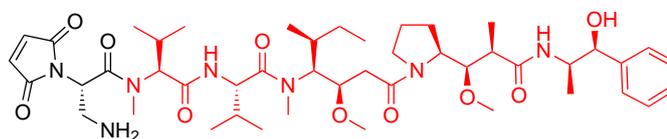
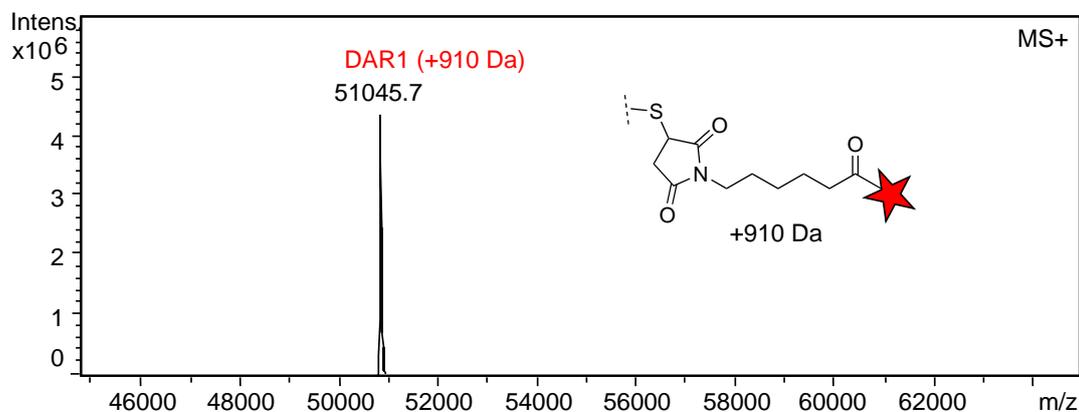


Figure 25 - Conjugaison régio-sélective sur support solide du Fab contenant une cystéine recombinante immobilisé sur billes de résine Ni-NTA.

L'immobilisation de la protéine sur résine Ni-NTA *via* sa séquence poly-histidine a permis l'obtention de conjugués avec un rendement d'environ 50% sur l'ensemble des étapes et avec un gain de temps considérable. Cette méthodologie a été appliquée avec succès à la conjugaison du cytotoxique MMAE *via* un linker non-clivable maléimide (Mc) ou maléimide auto-hydrolysable (MDap) (Figure 26).



**9a/9b Mc-MMAE**



**11a/11b MDap-MMAE**

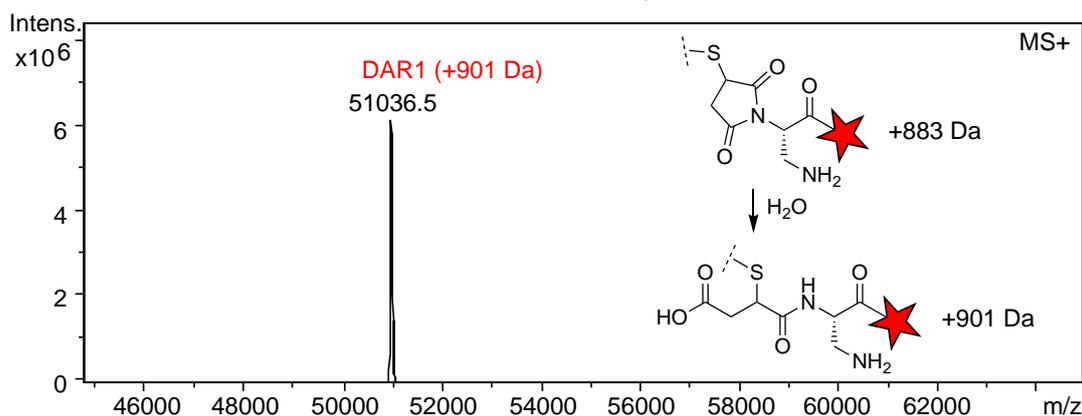


Figure 26 - Analyse par spectrométrie de masse de type ESI-trappe ionique des conjugués obtenus par la conjugaison des linker-cytotoxique non-clivable de type maléimide (Mc) et maléimide auto-hydrolysable (MDap). L'étoile rouge représente le cytotoxique MMAE.

L'identité du site de conjugaison a été vérifiée par fragmentation MS/MS des peptides conjugués identifiés au sein du digestat trypsique (Figure 27). La protéolyse des protéines ayant une structure complexe telles que les anticorps peut être facilitée par une étape préalable de réduction des différents ponts disulfures structuraux. Cependant, dans le cas des conjugués cystéine, cette étape de prétraitement peut modifier l'échantillon. En effet, tandis que la forme hydrolysée de maléimide (MDap) est stable et inerte, l'utilisation d'un agent réducteur a

entraîné une déconjugaison du linker maléimide (Mc). Ainsi, ce type de conjugué a été soumis à la digestion trypsique sans prétraitement préalable ; ce qui peut néanmoins conduire à une digestion partielle de la protéine et à l'obtention de plus gros fragments. Les peptides conjugués de masse 2818 Da et 2966 Da correspondant respectivement à la conjugaison des linkers maléimide et maléimide auto-hydrolysable ont permis de confirmer la modification régio-spécifique du résidu LC-Cys109 (Figure 27). L'hydrolyse du maléimide par ouverture de cycle conduit à une liaison amide dont la fragmentation donne un fragment intense (étoile rose) qui masque la fragmentation du squelette peptidique (Figure 27B).

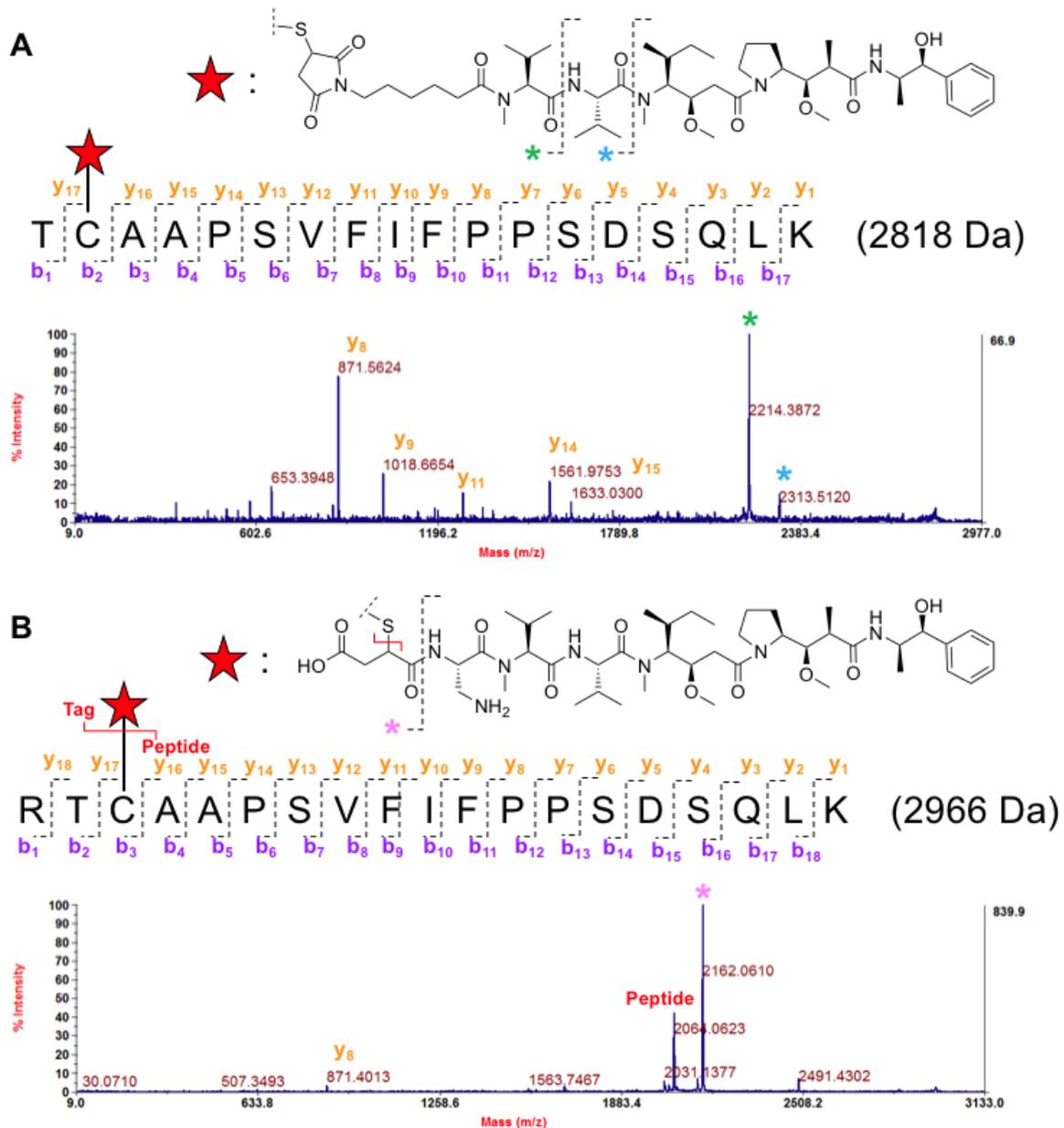


Figure 27 – La fragmentation MS/MS des peptides conjugués issus de la digestion trypsique a permis de confirmer la modification de la position LC-Cys109. (A) Le peptide de masse 2818 Da correspond à la conjugaison du linker-cytotoxique Mc-MMAE. (B) Le peptide de masse 2966 Da correspond à la conjugaison du linker-cytotoxique MDap-MMAE.

Nous avons montré que le Fab3A2 conjugué avec un DAR1 sur la position LC-Cys109, possède des propriétés équivalentes au Fab de départ en termes de capacité à inhiber l'activité catalytique de la MMP-14 pour les deux types de linker-cytotoxique étudiés (Figure 28).

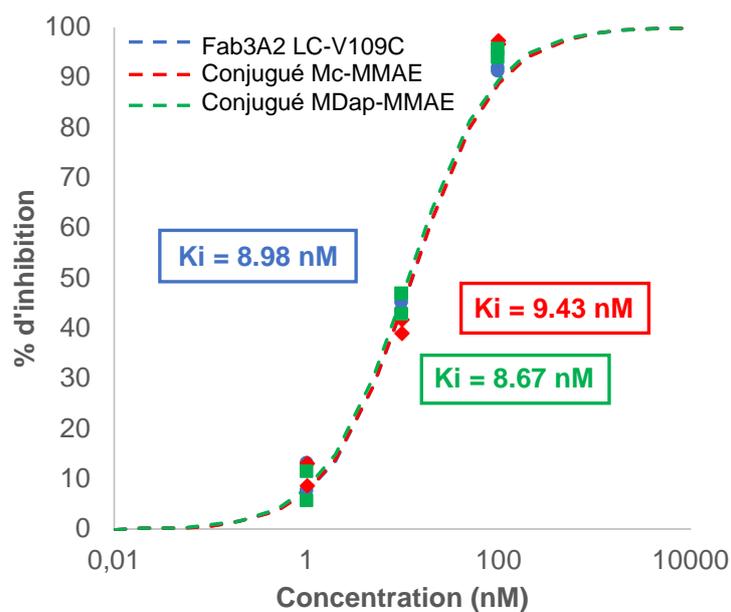


Figure 28 - La conjugaison des linker-cytotoxique Mc-MMAE et MDap-MMAE avec un DAR1 sur la position Cys109 au sein de la chaîne légère ne modifie pas la capacité du Fab à inhiber l'activité catalytique de la MMP-14.

Nous avons vu que différentes méthodes de conjugaison enzymatique et chimique peuvent être appliquées à la modification régio-spécifique du Fab3A2 natif ainsi que des ses différents mutants le Fab3A2 LC-LLQGA et le Fab3A2 LC-V109C. L'ensemble des conditions de conjugaison ainsi que les DAR obtenus et les positions modifiées dans chaque cas sont résumés dans le tableau 2.

FAB	MÉTHODE DE CONJUGAISON	RÉACTIF	CONDITIONS	DAR	RÉSIDUS MODIFIÉS
FAB3A2 LC-LLQGA	Enzymatique glutamine	Amine primaire	En solution	2	HC-Gln108 LC-LLQGA*
FAB3A2	Enzymatique glutamine	Amine primaire	En solution	1	HC-Gln108
FAB3A2	Enzymatique lysine	Substrat glutamine	En solution	Mélange de 1 et 2	HC-Lys105 HC-Lys241
FAB3A2	Enzymatique lysine	Substrat glutamine	Sur support solide Ni-NTA	1	HC-Lys105
FAB3A2 LC-V109C	Chimique cystéine	Maléimide	Sur support solide Ni-NTA	1	LC-Cys109*

\*Résidus introduits par mutation de la séquence native du Fab3A2

Tableau 2 – Bilan des conditions de conjugaison chimique et enzymatique applicables au Fab3A2 et aux différents mutants.

# CHAPITRE 3

## TRITIATION DE LA MONOMÉTHYLE AURISTATINE E (MMAE) ET SYNTHÈSE D'UNE MOLÉCULE MARQUÉE AU CARBONE 14

Dans le cadre de la découverte et du développement de médicaments, une compréhension complète du processus ADME des molécules est strictement requis pour leur mise sur le marché. Actuellement, l'incorporation d'isotopes radioactifs au sein de la structure des molécules reste la méthode la plus efficace et la plus précise pour pouvoir quantifier les médicaments et leurs métabolites *in vivo*. Dans ce contexte, les isotopes radioactifs de type  $\beta^-$  comme le  $^3\text{H}$  et le  $^{14}\text{C}$  sont abondamment utilisés pour différentes raisons. Premièrement, l'abondance naturelle des atomes de carbone et d'hydrogène au sein des molécules organiques et biologiques fait du  $^{14}\text{C}$  et du  $^3\text{H}$  les isotopes radioactifs les plus adaptés pour le marquage de molécules sans en modifier leur structure et leurs propriétés. Et deuxièmement, ces deux radioisotopes possèdent des temps de demi-vie suffisamment longs (Tableau 1) pour couvrir l'ensemble de la durée des études. Le  $^{14}\text{C}$  reste cependant l'isotope privilégié pour le développement de médicaments en raison de sa meilleure stabilité métabolique. Le  $^3\text{H}$  et le  $^{14}\text{C}$  sont également largement utilisés pour les études d'imagerie *ex vivo* par autoradiographie, et forment un couple d'isotopes adaptés pour la radio-imagerie duale compte tenu de la grande différence entre les énergies maximales de leur particule bêta émise (Tableau 1).

	ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE	DEMI-VIE	ÉNERGIE D'ÉMISSION
TRITIUM ( $^3\text{H}$ )	28,6 Ci/mmole	12,3 ans	18,6 keV
CARBONE 14 ( $^{14}\text{C}$ )	62,5 mCi/mmole	5730 ans	156 keV

Tableau 8 - Caractéristiques des deux radioisotopes émetteurs  $\beta^-$  tritium et carbone 14 abondamment utilisés pour les études ADME.

## 1 LES CONSIDÉRATIONS DANS LE CHOIX DES RADIOISOTOPES

Dans le cadre du double radiomarquage  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  d'ADC, deux configurations peuvent être envisagées : l'anticorps porte le  $^3\text{H}$  et le cytotoxique le  $^{14}\text{C}$ , ou l'anticorps est marqué au  $^{14}\text{C}$  tandis que le cytotoxique est tritié. Deux éléments principaux sont à prendre en compte dans le choix de la configuration de radiomarquage : la faisabilité de la synthèse radioactive et l'activité spécifique de chaque radioisotope. Cette dernière va notamment permettre de définir le ratio de chaque atome radioactif à introduire au sein de la structure moléculaire. A cet égard,

le  $^3\text{H}$  possédant une activité spécifique environ 450 fois supérieure à celle du  $^{14}\text{C}$  (Tableau 1), il peut s'avérer nécessaire d'introduire une plus grande quantité d'atomes de  $^{14}\text{C}$  que d'atomes de  $^3\text{H}$  afin d'atteindre un seuil de détection comparable.

La synthèse de molécules marquées avec des isotopes radioactifs peut être envisagée par deux voies différentes. La première consiste en l'utilisation de fragments/"building block" préalablement radiomarqués pour la synthèse multi-étape de la molécule d'intérêt. Cette approche est la plus fiable en termes de contrôle du site d'incorporation de l'isotope et du niveau d'enrichissement isotopique souhaité. Néanmoins, l'incorporation d'un fragment marqué peut nécessiter la modification d'une voie de synthèse, qui peut être difficile pour certains composés. De plus, de grandes quantités de déchets radioactifs sont générés tout au long de la synthèse. Dans ce contexte, une approche consistant en un échange isotopique représente une alternative intéressante. En effet, l'échange isotopique permet l'incorporation de la radioactivité au sein de la structure moléculaire du composé d'intérêt à l'issue de sa synthèse ; ce qui est plus facile, moins coûteux et conduit à moins de déchets radioactifs. Cependant, les méthodes d'échange isotopique sont encore en cours d'investigation et ne sont actuellement pas applicables à toutes les molécules car limitées à certaines fonctions chimiques, notamment dans le cadre du marquage au carbone  $^{14}\text{C}$ <sup>332</sup>. Dans ce contexte, l'échange isotopique hydrogène-tritium offre pour le moment une plus grande permmissivité de marquage.

Dans le cadre de ce projet, le radiomarquage de l'anticorps se fait via la conjugaison d'une petite molécule marquée, qui joue le rôle d'étiquette radioactive, et dont la structure peut être adaptée à façon. La petite molécule cytotoxique, quant à elle, possède une structure définie et plus complexe qui lui confère son activité thérapeutique, restreignant ainsi les possibilités de méthodologies d'échange isotopique applicable à son radiomarquage. Dans ce contexte, nous avons fait le choix de tritier le cytotoxique et de marquer l'anticorps au  $^{14}\text{C}$ . La configuration inverse est moins adaptée à une approche de marquage en dernière étape mais reste néanmoins possible par synthèse multi-étape du cytotoxique marqué au  $^{14}\text{C}$ . En effet, Alley et ses collaborateurs ont décrit un anticorps tritié de manière hétérogène par réaction du [ $^3\text{H}$ ]-

---

<sup>332</sup> Destro, G. et al. *Dynamic Carbon Isotope Exchange of Pharmaceuticals with Labeled CO<sub>2</sub>*. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 780–784 (2019).

NPS sur les résidus lysine exposés, conjugué à un cytotoxique, la MMAF, qui a été marquée en introduisant quatorze atomes de  $^{14}\text{C}$  au sein de sa structure<sup>333</sup>.

## 2 LA TRITIATION DE LA MONOMÉTHYLE AURISTATINE E (MMAE)

---

Bien que les réactions d'échange isotopique de l'hydrogène aient été traditionnellement réalisées en présence de complexes homogènes<sup>334</sup>, des études récentes ont prouvé que les nanoparticules métalliques stabilisées par des polymères ou des ligands peuvent être de puissants catalyseurs qui permettent d'obtenir des degrés élevés d'enrichissement isotopiques pour une grande variété de substrats. En effet, Palazzolo et ses collaborateurs (Service de Chimie Bioorganique et de Marquage, CEA Saclay) ont développé une méthode de marquage au deutérium ou au tritium en utilisant des nanoparticules de ruthénium comme catalyseur et du deutérium ou tritium gazeux comme source isotopique<sup>335</sup>. Cette nouvelle approche permet l'échange régio-sélectif hydrogène-isotope sur les positions en alpha d'un hétéroatome.

Cette méthode innovante présente de nombreux avantages. Tout d'abord, l'utilisation d'une catalyse hétérogène par des nanoparticules métalliques facilite le processus de purification des molécules. Ensuite, cette réaction est réalisée dans des conditions expérimentales modérées, notamment en termes de température, et est compatible avec un certain nombre de solvants organiques. Ceci permet son application à une large gamme de molécules, y compris des molécules organiques et des biomolécules<sup>4</sup> (Figure 1). Enfin, l'utilisation du tritium gaz en pression sous-atmosphérique comme source isotopique permet de diminuer la quantité de radioactivité engagée et de s'affranchir de l'utilisation de source plus dangereuse comme l'eau tritiée, tout en permettant l'obtention de produits à haute activité spécifique.

---

<sup>333</sup> Alley, S. C. et al. *The pharmacologic basis for antibody-auristatin conjugate activity*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **330**, 932–938 (2009).

<sup>334</sup> Voges, R., Heys, J. R. & Moenius, T. *Preparation of Compounds Labeled with Tritium and Carbon-14*. *Preparation of Compounds Labeled with Tritium and Carbon-14* (2009). doi:10.1002/9780470743447.

<sup>335</sup> Palazzolo, A. et al. *Efficient Access to Deuterated and Tritiated Nucleobase Pharmaceuticals and Oligonucleotides using Hydrogen-Isotope Exchange*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **58**, 4891–4895 (2019).

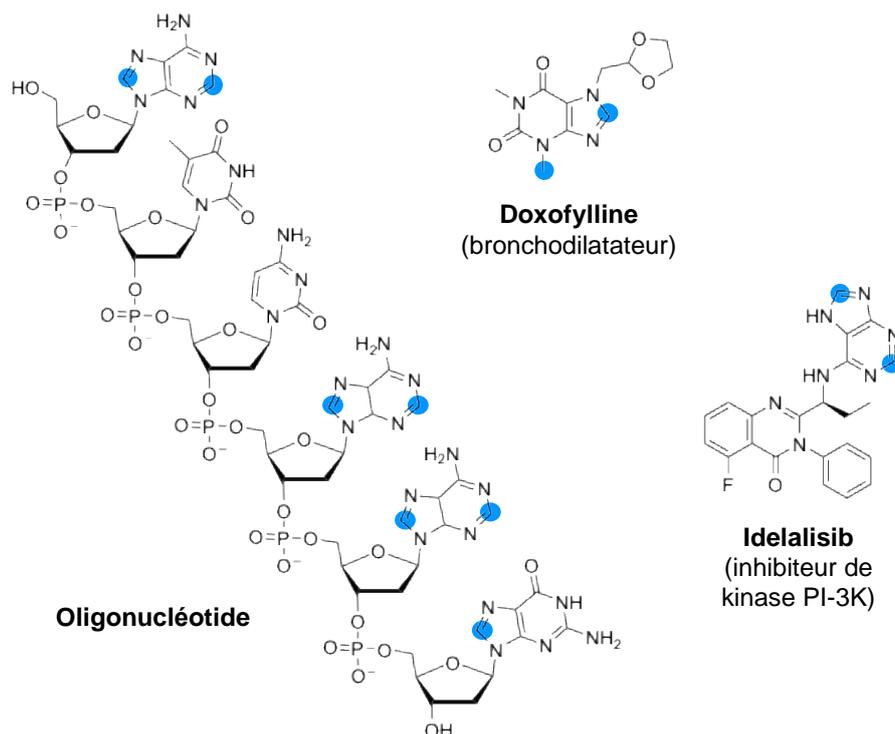


Figure 1 - Structure de molécules organiques et biologiques qui ont été marquées au deutérium ou au tritium en présence de nanoparticules de ruthénium. Les positions marquées en bleu correspondent aux atomes d'hydrogène qui ont été substitués.

Le radiomarquage de la monométhyle auristatine E (MMAE) par échange isotopique hydrogène-tritium a été réalisé en présence de nanoparticules RuNp@NHClCy dans le THF (Figure 2A). Il s'agit de nanoparticules de ruthénium stabilisées par des ligands carbènes N-hétérocyclique (NHC pour N-Heterocyclic Carbene) de type ICy (N,N-dicyclohexylimidazol-2-ylidene). Ce ligand carbène très organosoluble modifie la réactivité des nanoparticules de ruthénium et les rend très efficace vis-à-vis de l'activation des liaisons C-H ; ce qui permet l'obtention de molécules avec de hautes activités spécifique lors de la tritiation dans des solvants organiques<sup>336</sup>. Dans le cas de la MMAE, 2,5 atomes de <sup>3</sup>H ont été introduits en moyenne par molécule, soit une activité spécifique de 74 Ci/mole. La part des différents isotopologues ayant incorporé jusqu'à cinq atomes de <sup>3</sup>H est représentée dans la Figure 2B. Les différentes positions de marquage n'ont pas été identifiées, mais l'ensemble des hydrogènes

<sup>336</sup> Palazzolo, A. et al. Efficient Access to Deuterated and Tritiated Nucleobase Pharmaceuticals and Oligonucleotides using Hydrogen-Isotope Exchange. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **58**, 4891–4895 (2019).

portés par les carbones en alpha d'un hétéroatome, marqués en bleu (Figure 2A), ont pu être échangés par un tritium.

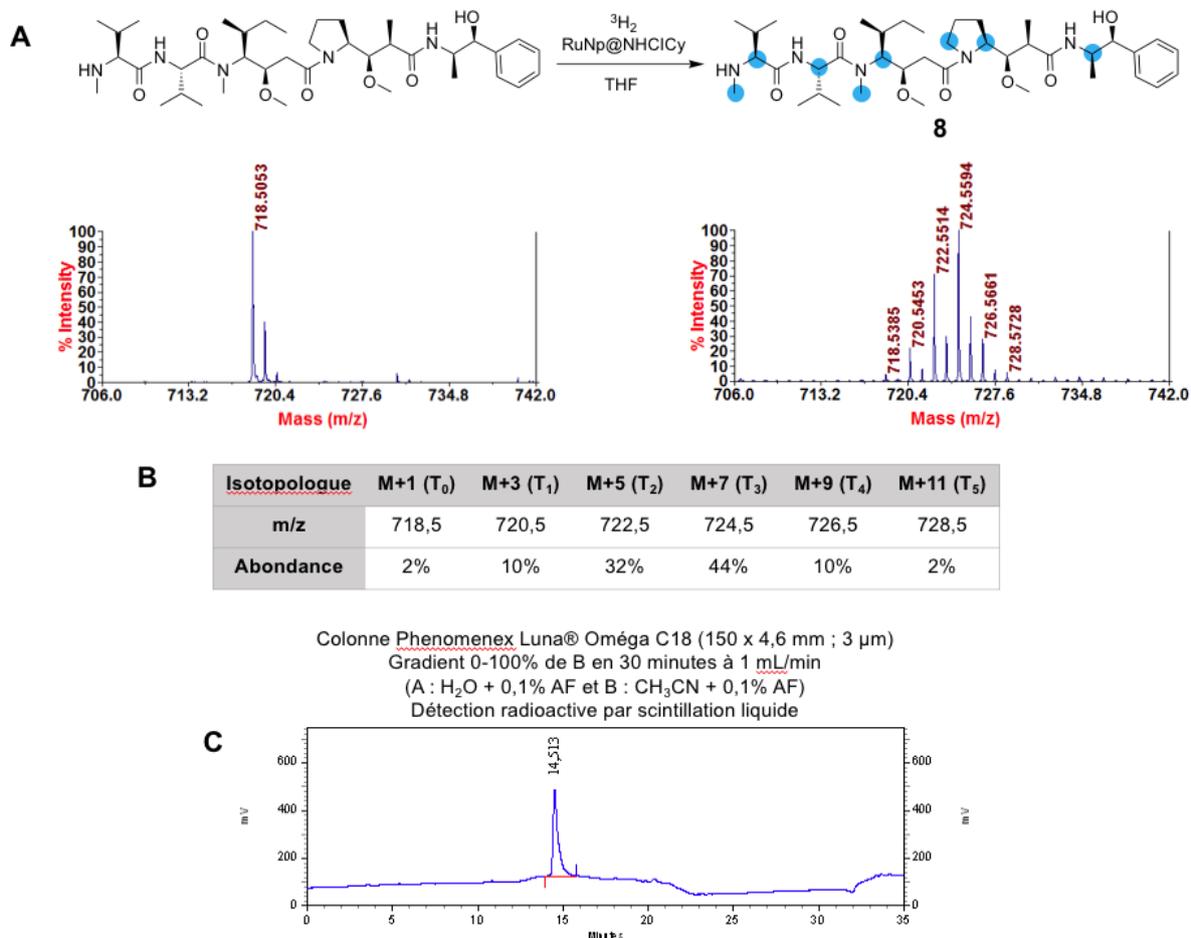


Figure 2 - Le radiomarquage de la MMAE par échange hydrogène-tritium en présence de nanoparticules de ruthénium donne un enrichissement isotopique moyen de 2,5 atomes par molécule. (A) Comparaison des profils isotopiques par spectrométrie de masse MALDI-TOF. (B) L'abondance des différents isotopologues. (C) Profil radio-HPLC de la MMAE tritiée. Les positions marquées en bleu correspondent aux hydrogènes potentiellement substituables.

### 3 LA SYNTHÈSE D'UNE MOLÉCULE RADIOMARQUÉE AU CARBONE 14

Le carbone 14 est un radioisotope naturel qui est généré sous la forme d'un sel, le Ba<sup>[14C]</sup>CO<sub>3</sub>, qui est ensuite converti en <sup>[14C]</sup>CO<sub>2</sub>, un gaz peu réactif et remarquablement stable. Ce gaz est

le précurseur universel de tous les composés radiomarqués au carbone 14 <sup>337</sup>. Traditionnellement, la fonctionnalisation de molécules à l'aide du [<sup>14</sup>C]CO<sub>2</sub> nécessite des approches multi-étapes et aboutit à la production de beaucoup de déchets radioactifs. C'est pourquoi, le développement de méthodologies capables d'incorporer le CO<sub>2</sub> directement au sein de la structure souhaitée à un stade avancé de la synthèse serait bénéfique pour le processus de radiomarquage.

### 3.1 LES URÉES CYCLIQUES

C'est dans ce contexte que Del Vecchio et ses collaborateurs (Service de Chimie Bioorganique et de Marquage, CEA Saclay) ont décrit une procédure de marquage pour la synthèse d'urées cycliques sur la base d'une réaction de Staudinger/Aza-Wittig impliquant le CO<sub>2</sub><sup>338</sup>. Lorsque l'o-azidoaniline est traité par du CO<sub>2</sub> en présence d'une phosphine, l'imino-phosphorane qui est généré subit une réaction d'aza-Wittig pour donner un isocyanate, et l'addition nucléophile intramoléculaire qui s'ensuit aboutit au produit urée cyclisé (Figure 3). Il a été montré que cette méthodologie large spectre était très tolérante vis-à-vis d'un grand nombre de groupes fonctionnels, convenant ainsi au marquage de petites molécules organiques mais aussi de peptides non protégés<sup>7</sup>. Sa cinétique très rapide la rend aussi adaptée pour le marquage au carbone 11, un émetteur β<sup>+</sup> très utilisé pour l'imagerie PET, mais qui possède une demi-vie de seulement 20,4 minutes.

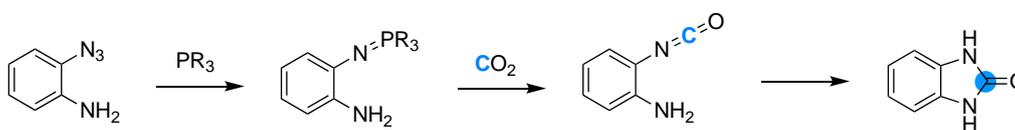


Figure 3 - Réaction de Staudinger/Aza-Wittig impliquant le CO<sub>2</sub> et conduisant à la formation intramoléculaire d'une urée cyclique.

<sup>337</sup> Voges, R., Heys, J. R. & Moenius, T. *Preparation of Compounds Labeled with Tritium and Carbon-14. Preparation of Compounds Labeled with Tritium and Carbon-14* (2009). doi:10.1002/9780470743447.

<sup>338</sup> Del Vecchio, A. et al. *Late-Stage Isotopic Carbon Labeling of Pharmaceutically Relevant Cyclic Ureas Directly from CO<sub>2</sub>*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **57**, 9744–9748 (2018).

Dans le but de synthétiser une molécule marquée qui présente une structure capable d'incorporer plusieurs atomes de  $^{14}\text{C}$  sous la forme de fonctions urée, l'idée a été de préparer un bloc acide aminé modifié (composé I) qui puisse être assemblé sous la forme d'un homopeptide dont la longueur dépendrait de la quantité d'atomes de  $^{14}\text{C}$  nécessaires pour atteindre l'activité spécifique souhaitée (Figure 4). Le composé I est obtenu après une réaction d'amination réductrice en présence de l'o-azidobenzaldéhyde sur la fonction amine primaire de la chaîne latérale d'une Fmoc-L-Lys-OH. L'amine secondaire générée a ensuite été protégée par un groupement Boc avant d'engager le composé dans la synthèse peptidique. La résine qui a été choisie comme support solide à la synthèse peptidique est l'universal PEG NovaTag™ qui, après clivage, libère un peptide fonctionnalisé à son extrémité N-terminal par un espaceur PEG<sub>3</sub> suivi d'une fonction amine primaire, qui sera utilisée par la suite pour la conjugaison aux résidus glutamine en présence de BTG (Figure 4).

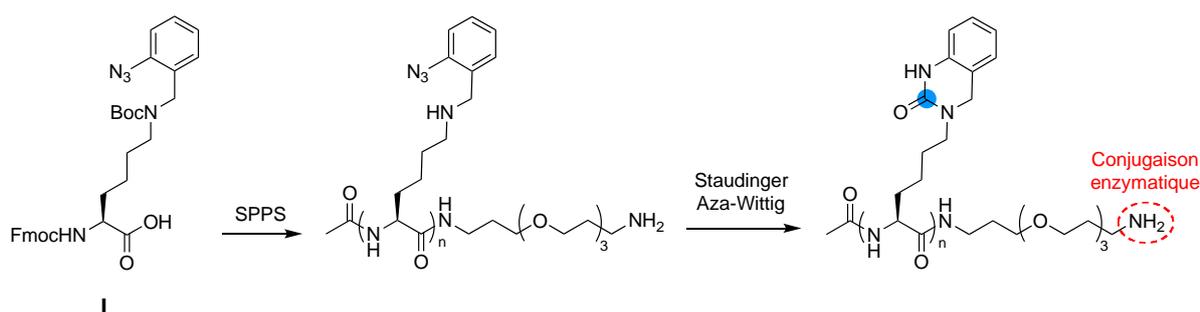


Figure 4 - La synthèse d'un bloc lysine modifiée permet l'obtention de peptides incorporant une fonction azido capable d'être radiomarquée par formation d'une urée cyclique selon une réaction de Staudinger/Aza-Wittig.

### 3.1.1 La preuve de concept : le mono-peptide

La preuve de concept de la réaction de formation de l'urée cyclique sur la chaîne latérale de la lysine modifiée a été réalisée sur le mono-peptide en présence de  $[^{13}\text{C}]\text{CO}_2$ . Le carbone 13 est un isotope stable du carbone et son incorporation au sein de la structure moléculaire peut être facilement suivie par RMN  $^{13}\text{C}$  en donnant un signal autour de 157 ppm caractéristique des urées cycliques. De plus, l'introduction d'un atome de  $^{13}\text{C}$  permet aussi d'ajouter une différence de masse de +1 Da entre le réactif azido et le produit urée cyclique (Figure 5) ; les deux étant isomassiques en structure  $^{12}\text{C}$ .

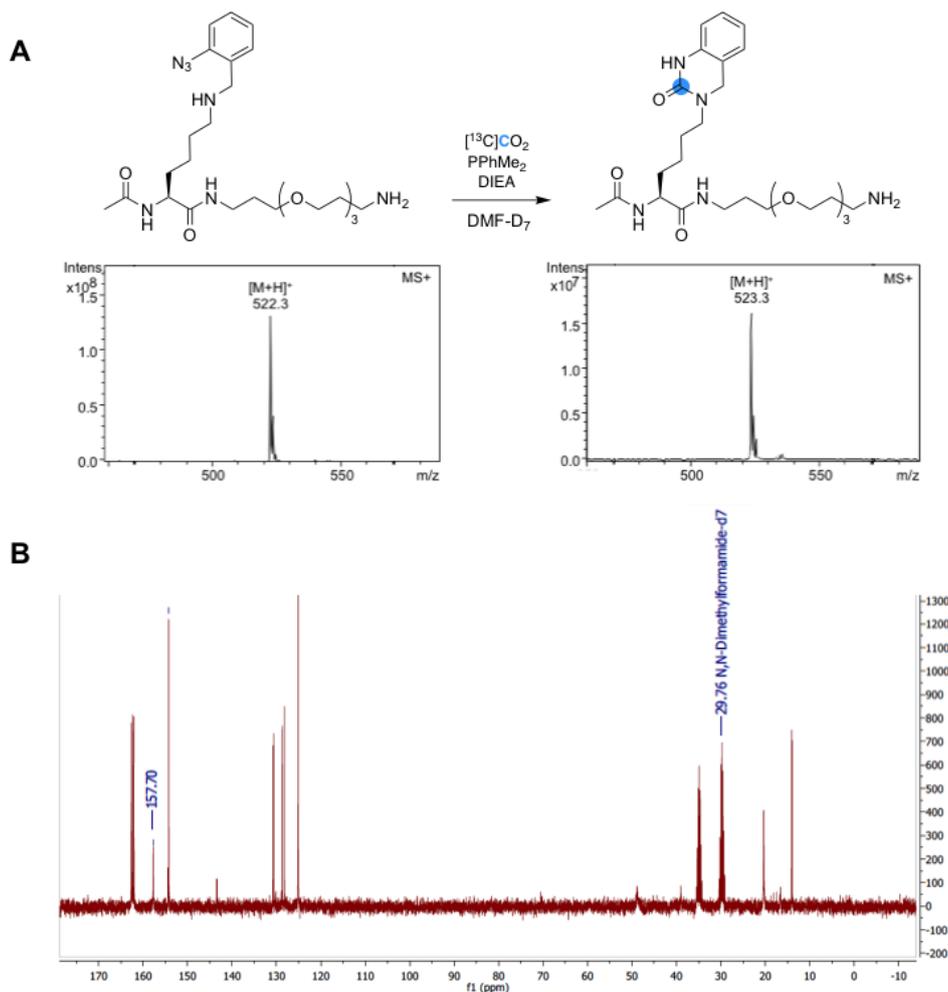


Figure 5 - La preuve de concept de la formation d'une urée cyclique marquée au carbone 13 au sein de la structure peptidique. (A) L'incorporation de carbone 13 au sein de la structure moléculaire induit un incrément de masse de +1 Da. (B) La formation de l'urée cyclique est suivie par RMN  $^{13}\text{C}$  par la présence d'un signal caractéristique à 157 pm.

### 3.1.2 L'élongation de la chaîne peptidique

Pour obtenir une molécule marquée avec une activité spécifique suffisante pour être facilement détectée et quantifiée, nous avons estimé qu'il est nécessaire d'introduire au moins quatre atomes de  $^{14}\text{C}$  ; ce qui correspondrait à une activité spécifique de 250 mCi/mole, soit une injection de 1  $\mu\text{Ci}$  par souris de 20 g traitée par une dose de 10 mg/kg d'ADC.

Dans un premier temps, la chaîne peptidique a été allongée jusqu'au dipeptide en employant les mêmes conditions de couplage peptidique que celles utilisées précédemment pour la synthèse du mono-peptide : deux équivalents d'acide aminé protégé en présence de l'agent de couplage HATU et de DIEA dans la DMF au micro-onde à 60°C pendant 30 minutes. L'analyse

du brut de synthèse montre une réaction incomplète avec un mélange du mono-peptide et du dipeptide dans lequel le mono-peptide est majoritaire (Figure 6A). Différentes conditions réactionnelles ont été testées afin de forcer la formation du dipeptide. Dans les mêmes conditions expérimentales, nous avons initialement tenté d'introduire le deuxième bloc lysine en deux couplages successifs (Figure 6B). Dans un deuxième temps, le COMU, un agent de couplage de plus petite taille que les dérivés de benzotriazole, a été utilisé pour diminuer l'encombrement stérique autour de la fonction activée et faciliter le couplage (Figure 6C). Enfin, la résine a été introduite en excès par rapport au premier acide aminé afin de réduire son taux de chargement de 0,3 mmole/g à 0,15 mmole/g et diminuer ainsi des interactions  $\pi$  potentielles entre les groupements benzyl ou Fmoc (Figure 6D). Bien que chacune des conditions testées ait permis de favoriser un peu plus la formation du dipeptide, le couplage du second bloc lysine s'est systématiquement avéré incomplet. De plus, nous n'avons jamais observé la formation du tripeptide dans le brut réactionnel, même dans les meilleures conditions de couplages.

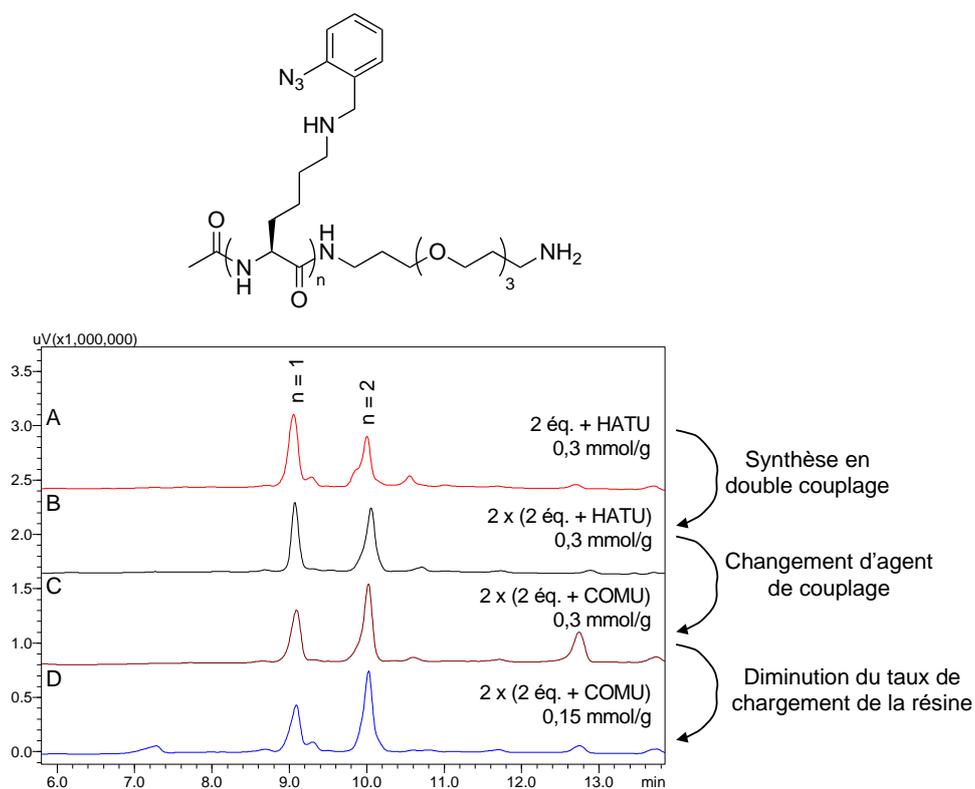


Figure 6 – Analyse HPLC du brut de synthèse du dipeptide obtenu dans différentes conditions et montrant un mélange du mono-peptide ( $t_R = 9,1$  min) et du dipeptide ( $t_R = 10,0$  min). (A) En présence de HATU. (B) En présence de HATU en double couplage. (C) En présence de COMU. (D) En diminuant le taux de chargement de la résine par deux.

Le couplage du bloc lysine modifié (Composé I) étant l'étape limitante à la synthèse peptidique, nous avons envisagé de modifier la voie de synthèse en produisant un homopeptide de lysine dont les chaînes latérales peuvent être ensuite modifiées par amination réductrice sur support solide en présence de l'o-azidobenzaldéhyde (Figure 7). Tandis que la déprotection du groupement Boc en N-terminal et le clivage du peptide de la résine nécessitent des conditions acides fortes, l'utilisation de l'acide aminé lysine protégé Mmt (monométhoxytrityl) permet de sélectivement déprotéger les chaînes latérales dans des conditions plus douces. Cette stratégie a en effet permis d'obtenir le produit d'intérêt avec un meilleur rendement que précédemment. Cependant, l'élongation de la chaîne peptidique jusqu'au tétrapeptide n'a jamais abouti. Dans ce cas, nous avons postulé que le groupement protecteur Mmt, volumineux et composé de plusieurs cycles aromatiques crée de l'encombrement stérique ainsi que des interactions  $\pi$  défavorables à la synthèse de l'homotétrapeptide.

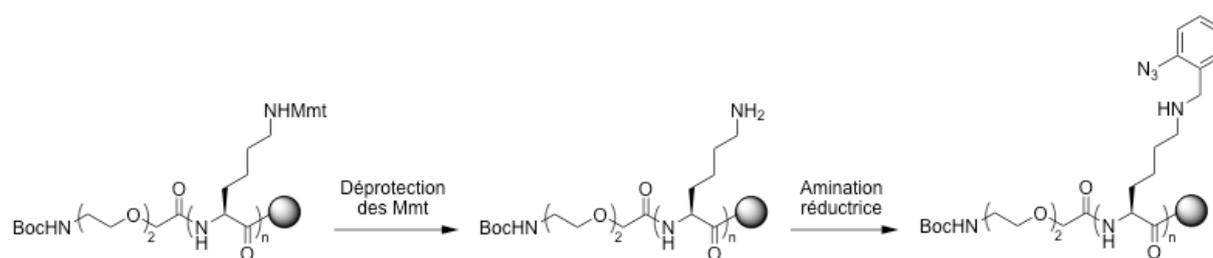


Figure 7 – La déprotection sélective sur support solide des chaînes latérales des lysines permet l'introduction de la modification par amination réductrice à l'issue de la synthèse peptidique.

### 3.2 LES URÉES LINÉAIRES

Compte tenu de la difficulté rencontrée en série urées cycliques, nous avons fait évoluer la stratégie vers la formation d'urées linéaires marquées. Dans ce cas et de manière similaire à la réaction intramoléculaire conduisant à la formation d'une urée cyclique, une amine peut réagir avec un isocyanate pour donner une urée linéaire (Figure 8). Cette approche a pour avantage de ne pas nécessiter l'introduction préalable d'une fonction azoture sur la chaîne latérale de la lysine.

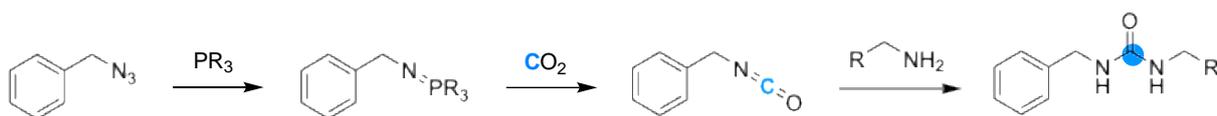


Figure 8 - Réaction de Staudinger/Aza-Wittig impliquant le  $\text{CO}_2$  et conduisant à la formation d'une urée linéaire en présence d'une amine.

### 3.2.1 La synthèse de la molécule marquée

En s'appuyant sur cette stratégie, un tétrapeptide de lysines fonctionnalisé en N-terminal par l'acide 6-aminocaproïque protégé Fmoc a été produit (composé II, Figure 9). Après la fonctionnalisation des chaînes latérales des lysines par des urées benzyliques (composé III), la déprotection du groupement Fmoc N-terminal libèrerait une amine primaire réactive pour la conjugaison sur les résidus glutamine en présence de BTG (composé IV). Expérimentalement, une déprotection prématurée du groupement Fmoc a été observée lors de la réaction de marquage, conduisant à la formation d'un produit de réaction unique fonctionnalisé par cinq urées linéaires (composé V), quatre sur les résidus lysine, et une cinquième sur l'amine N-terminal.

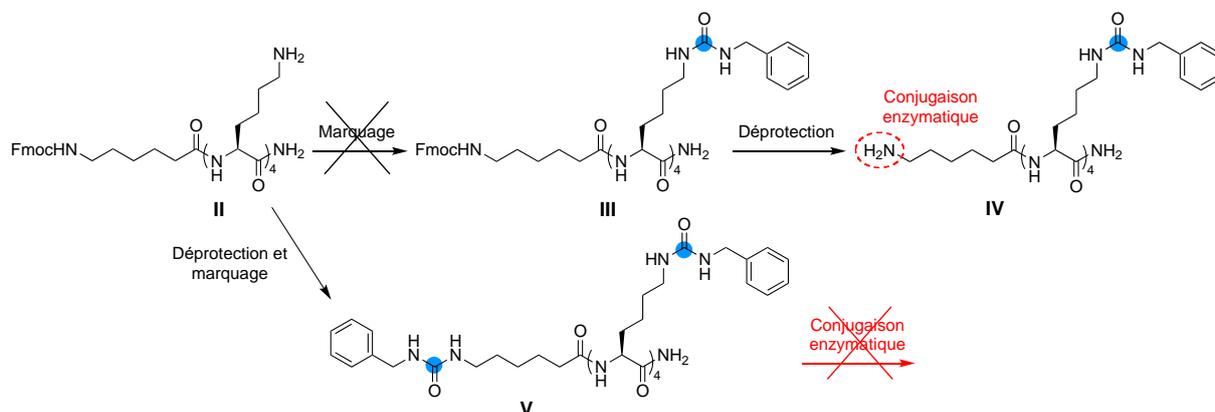


Figure 9 – Le groupement protecteur Fmoc est clivé lors de la réaction de Staudinger/Aza-Wittig en présence de  $\text{CO}_2$  et conduit à la formation d'un produit incorporant cinq atomes de  $^{13}\text{C}$ .

Étant donné les difficultés à identifier un groupement protecteur d'amine qui soit orthogonal au Boc tout en étant inerte vis-à-vis des différents réactifs utilisés dans la réaction de formation des urées, et dont les conditions de déprotection soient compatibles avec l'utilisation de la

radioactivité, la structure du peptide a été modifiée. Par synthèse peptidique sur résine Wang, l'homotérapeptide de lysines a été obtenu (composé **36**, Figure 10) et dans ce cas, l'incorporation de cinq atomes de  $^{14}\text{C}$ , quatre sur les chaînes latérales et une sur l'extrémité N-terminal, a pu être réalisée. A l'issue de la réaction de marquage par la formation d'urées linéaires (composé **37a/37b**), l'extrémité C-terminal a été fonctionnalisée par la diamine cadavérine (composé **38a/38b**), permettant ainsi d'introduire la fonction amine primaire nécessaire à la conjugaison enzymatique (Figure 10). Dans cette série, la réaction de formation des cinq urées linéaires sur le squelette peptidique a préalablement été validée avec l'azoture benzylique. Néanmoins, cette molécule étant insoluble dans le tampon PBS pH=7,4 + 5% DMSO utilisé pour la réaction enzymatique, un analogue plus soluble a alors été synthétisé à partir d'un azoture pegylé.

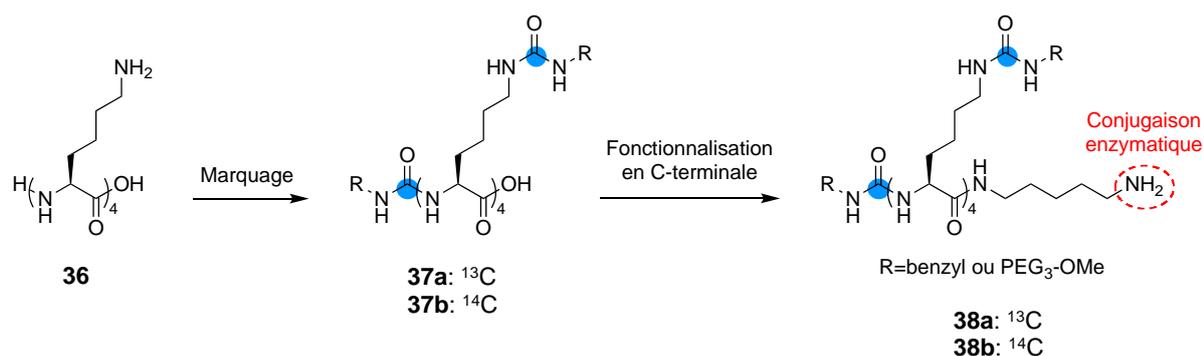


Figure 10 – La fonctionnalisation du peptide en C-terminal à l'issue de la réaction de marquage permet d'introduire une fonction réactive vis-à-vis de la bioconjugaison.

La molécule **38b** incorporant cinq atomes de  $^{14}\text{C}$  sur la forme d'urées linéaires pegylées et possédant une activité spécifique de 310 mCi/mmmole a ainsi été obtenue.

### 3.2.2 La conjugaison chémo-enzymatique

Des premiers essais de couplage enzymatique du composé **38** en version  $^{13}\text{C}$  (composé **38a**, Figure 11A) ont été réalisés sur le Fab3A2 LC-LLQGA. Dans ce cas et malgré le recours à des conditions de couplage optimisées (voir chapitre 2), seule une fonctionnalisation partielle du Fab a été observée (Figure 11B). Ce résultat suggère que l'efficacité de la BTG est directement

corrélée à la nature du substrat employé. A ce titre, plus celui-ci est volumineux, plus les conditions réactionnelles (concentration, nombre d'équivalents, température...) doivent être forcées pour permettre une modification quantitative de la protéine. La molécule radiomarquée étant précieuse, nous avons réexaminé les conditions de couplage afin d'accéder à une incorporation stoechiométrique.

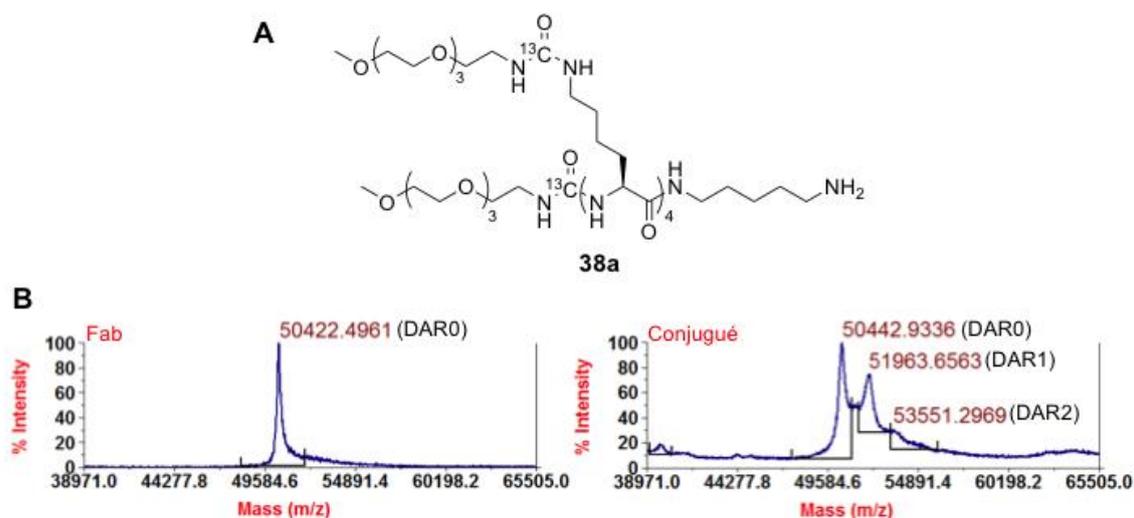


Figure 11 - La conjugaison de la molécule **38a** marquée au carbone 13 sur le Fab3A2 LC-LLQGA en présence de BTG donne un mélange hétérogène. (A) La structure de la molécule marquée. (B) L'analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF du Fab3A2 LC-LLQGA et du conjugué obtenu.

Différentes conditions opératoires de conjugaison enzymatique de la molécule **38b** ont donc été explorées en parallèle. Par ailleurs, ces conditions ont également été comparées à une méthode chémo-enzymatique (Figure 12). Cette approche consiste en l'utilisation de la BTG afin d'introduire de manière régio-spécifique une fonction azoture au sein du Fab. Cette étape est suivie d'une conjugaison par chimie "click" permettant l'introduction de la molécule marquée fonctionnalisée par un DBCO (composé **39a/39b**, Figure 12). L'atout principal de la radioactivité et qu'elle offre une méthode rapide et sensible de quantification des différentes espèces radiomarquées. A cet égard, la quantité de radioactivité mesurée au sein de la bande à 50 kDa est directement proportionnelle au taux de conjugaison des molécules **38b** et **39b** sur le Fab dans les différentes conditions opératoires (Figure 12B). Aucune des conditions réactionnelles qui ont été testées pour l'approche enzymatique (augmentation de la

température (2) et (3), augmentation du temps de réaction (4), ajout de solvant organique (5)) n'a permis d'augmenter le taux de conjugaison de la molécule **38b** en comparaison avec les conditions de référence (1). Seule l'approche chémo-enzymatique a permis une augmentation significative de la radioactivité incorporée (6).

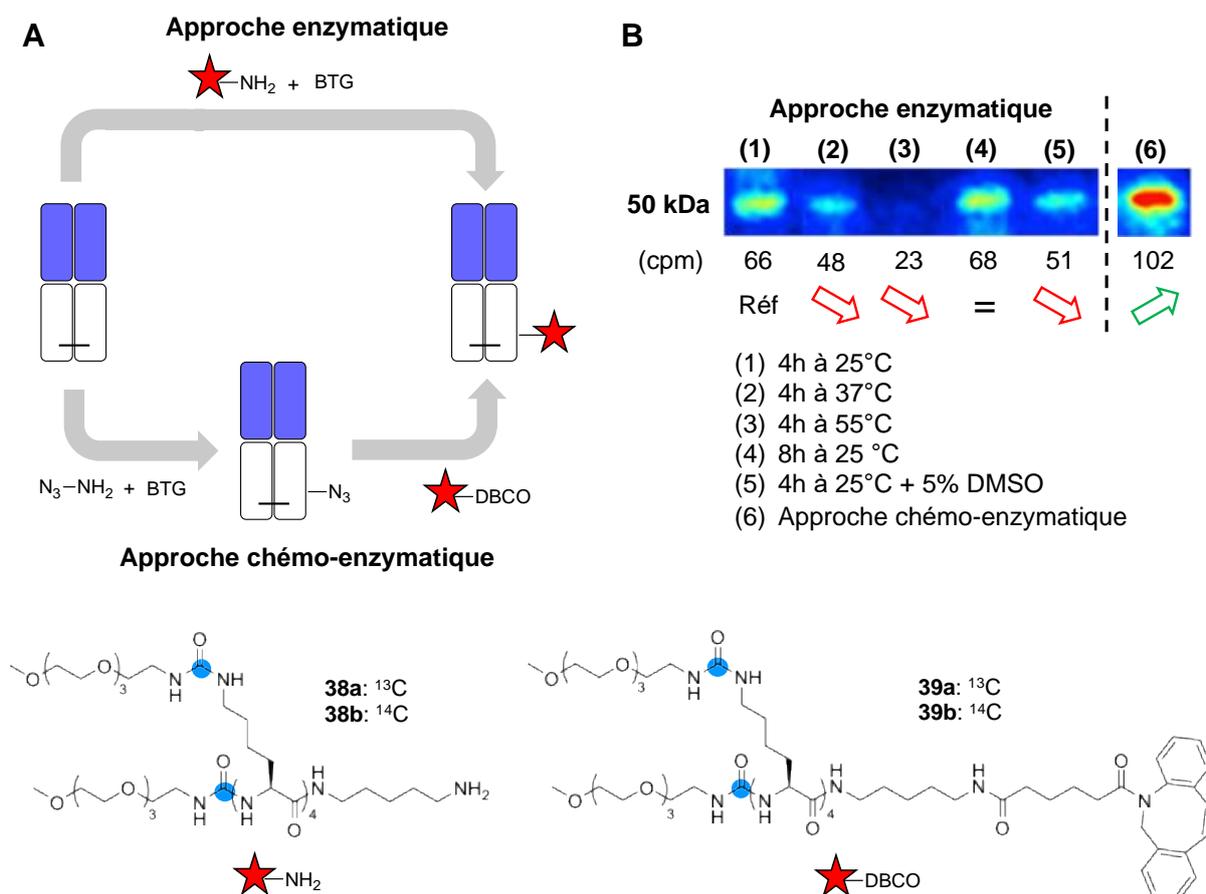


Figure 12 - L'approche chémo-enzymatique en deux étapes permet d'augmenter le taux de conjugaison de la molécule marquée. (A) Représentation des voies de conjugaison enzymatique et chémo-enzymatique. (B) Radio-imagerie d'un gel SDS-PAGE comparant les différentes conditions réactionnelles de conjugaison.

Dans le cadre du marquage  $^{14}\text{C}$  du Fab, l'approche chémo-enzymatique présente plusieurs avantages par rapport à la méthode enzymatique. D'une part, elle permet une incorporation optimale en présence d'un nombre réduit d'équivalent de réactif (1,5 éq contre 10 éq pour la méthode enzymatique.), diminuant ainsi la quantité de déchets radioactifs produits. D'autre part, la présence de la fonction DBCO offre plus de possibilités de conjugaison. En effet, la molécule amine primaire est exclusivement utilisable pour la conjugaison enzymatique des

résidus glutamine, tandis que la molécule DBCO peut être conjuguée sur n'importe quel résidu, préalablement modifiée par la molécule azido adaptée. C'est cette approche qui a été retenue pour la conjugaison du tag  $^{14}\text{C}$  dans la suite du projet.

Enfin, nous avons montré que le Fab3A2 LC-LLQGA conjugué selon l'approche chémo-enzymatique avec un DAR2 (positions LC-LLQGA et HC-Gln108) possède des propriétés équivalentes au Fab de départ en termes de capacité à inhiber l'activité catalytique de la MMP-14 (Figure 13). Un facteur deux entre les valeurs de  $K_i$  mesurées pour le Fab et le conjugué obtenu n'étant pas jugé significatif.

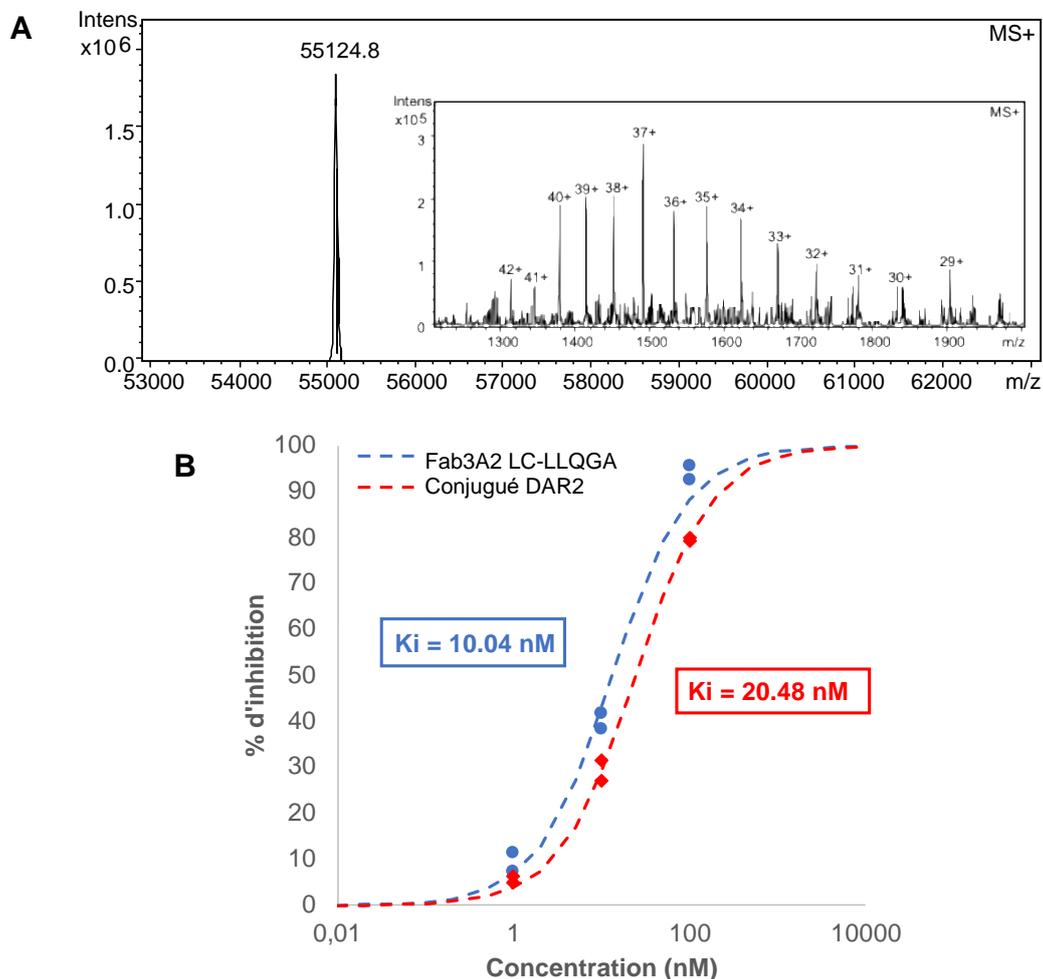


Figure 13 – La conjugaison par voie chémo-enzymatique de deux tags  $^{14}\text{C}$  sur le Fab3A2 ne modifie pas la capacité du Fab à inhiber l'activité catalytique de la MMP-14. (A) Analyse par spectrométrie de masse de type ESI-trappe ionique du conjugué de DAR2 obtenu. (B) Détermination de la constante d'inhibition ( $K_i$ ) du conjugué.

# CHAPITRE 4

## LA PRODUCTION D'ADC DOUBLEMENT MARQUÉS DE MANIÈRE RÉGIO-SPÉCIFIQUE

Dans le chapitre 2, nous avons montré que trois méthodes de bioconjugaison chimique et enzymatique ont pu être optimisées pour la conjugaison régio-spécifique de molécules modèles sur deux mutants du Fab3A2 : le Fab3A2 LC-LLQGA et le Fab3A2 LC-V109C. Dans chacun des cas, les positions réactives ont été identifiées (Figure 1). La BTG est capable de modifier de manière régio-spécifique et quantitative le résidu natif HC-Gln108 et la séquence spécifique LLQGA ou la HC-Lys105 en fonction de l'approche choisie, tandis que la mutation LC-V109C introduit un résidu cystéine modifiable chimiquement.

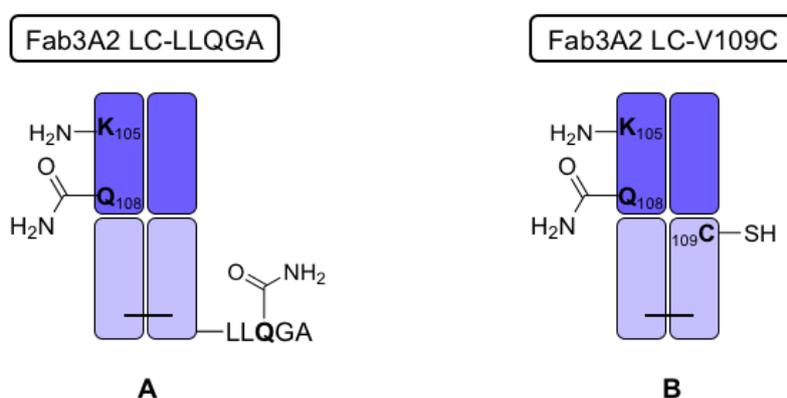


Figure 1 - L'existence de plusieurs positions réactives au sein de la structure des mutants du Fab3A2 permet l'utilisation de plusieurs méthodologies de conjugaison régio-spécifique. (A) La séquence du Fab3A2 LC-LLQGA contient deux glutamines et une lysine réactive modifiables par voie enzymatique. (B) La séquence du Fab3A2 LC-V109C présente une glutamine et une lysine modifiables par voie enzymatique ainsi qu'une cystéine réactive pour la conjugaison chimique.

## 1 LE CHOIX DES COMBINAISONS DE DOUBLE CONJUGAISON

La présence de ces différents résidus au sein de la séquence des deux Fabs offre plusieurs combinaisons possibles de double conjugaison. Dans le cas du Fab LC-LLQGA, il s'agit d'une double modification enzymatique conduisant à l'introduction d'une modification avec un DAR2 sur les glutamines, et à la conjugaison d'une autre molécule avec un DAR1 sur la lysine (Figure 1A). Dans le but de faire la preuve de concept de la double détection des isotopes, le choix a été fait d'introduire le tag  $^{14}\text{C}$  de plus faible activité spécifique (310 mCi/mmol) avec un DAR2 sur les positions glutamine pour faciliter sa détection et sa quantification, tandis que le cytotoxique tritié ne sera conjugué qu'avec un DAR1 sur la lysine réactive (Figure 2A). Par

ailleurs et compte tenu du fait que l'effet thérapeutique des conjugués ne sera pas évalué dans le cadre de ce projet, nous avons considéré qu'il n'était pas nécessaire de conjuguer le cytotoxique de haute activité spécifique (74 Ci/mmol) sur plusieurs positions.

La séquence du Fab LC-V109C offre encore plus de possibilités de combinaisons de méthodes de conjugaison, contenant des résidus réactifs vis-à-vis des trois approches (Figure 1B). Toutefois, dans le but de faire un parallélisme avec la structure du conjugué décrite ci-dessus, le tag  $^{14}\text{C}$  sera également introduit par voie enzymatique sur la glutamine 108 (HC-Gln108). La MMAE sera quant à elle, conjuguée par voie chimique sur la cystéine réactive (Figure 2B). Cette deuxième construction n'incorporant qu'un seul tag  $^{14}\text{C}$  permettra de déterminer le nombre d'atomes de  $^{14}\text{C}$  à introduire au sein de la structure pour pouvoir être facilement quantifiable.

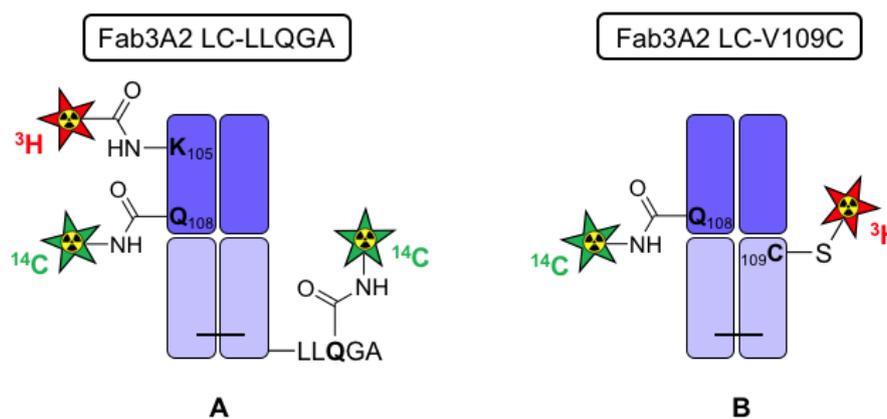


Figure 2 - La combinaison des différentes méthodes de conjugaison conduit à l'obtention d'objets doublement fonctionnalisés. (A) La double conjugaison enzymatique sur le Fab3A2 LC-LLQGA permet l'introduction du tag  $^{14}\text{C}$  avec un DAR2. (B) La modification chimique et enzymatique du Fab3A2 LC-V109C conjugue chacune des molécules marquées avec un DAR1. Les étoiles rouge et verte représentent le cytotoxique MMAE et le tag  $^{14}\text{C}$  respectivement.

## 2 LA DOUBLE CONJUGAISON ENZYMATIQUE

Chaque méthode de conjugaison ayant été validée séparément, il s'agissait ensuite de vérifier la faisabilité de cette double modification enzymatique du Fab par la BTG, notamment au niveau des résidus HC-Lys105 et HC-Gln108 localisés à proximité l'un de l'autre au sein du domaine CDR-H3.

Les modifications des résidus glutamine et lysine sont toutes les deux catalysées par la BTG selon la même réaction (Figure 3A). D'abord, le substrat glutamine donneur d'acyle réagit avec le résidu cystéine au sein du site catalytique de l'enzyme pour former un complexe acyle-enzyme<sup>339</sup>. Ensuite, en présence d'une amine primaire qui joue le rôle d'accepteur d'acyle, le complexe acyle-enzyme transfère le groupement acyle donnant lieu à une réaction de transamidation. Pour la conjugaison des résidus glutamine ou lysine, la différence réside dans le choix des donneurs et accepteurs d'acyle. En effet, dans le cas de la modification des glutamines, la protéine joue le rôle de donneur d'acyle, tandis que lors de la conjugaison des lysines, la protéine devient un accepteur d'acyle (Figure 3B).

---

<sup>339</sup> Strop, P. Versatility of microbial transglutaminase. *Bioconjug. Chem.* **25**, 855–862 (2014).

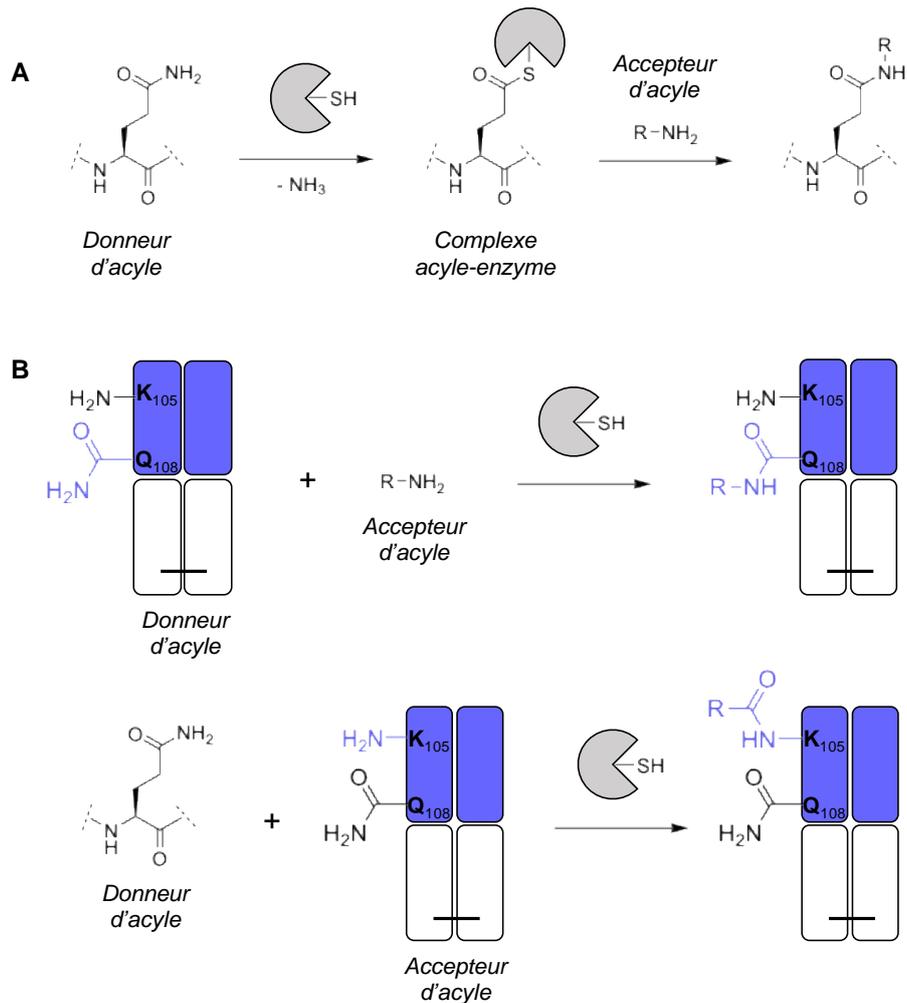


Figure 3 - La BTG catalyse la réaction de transamidation entre un donneur d'acyle, la glutamine et un accepteur d'acyle, l'amine primaire. (A) Le mécanisme de réaction de transamidation catalysée par la BTG. (B) La protéine d'intérêt peut jouer à la fois le rôle de donneur d'acyle ou d'accepteur d'acyle et ainsi donner lieu à de la conjugaison des positions glutamine ou lysine respectivement.

Bien que catalysée par la même enzyme, chaque approche de conjugaison nécessite un couple de substrat glutamine et d'amine primaire nucléophile distinct ; ce qui empêche la double conjugaison simultanée. En effet, le mélange de la protéine en présence des deux petites molécules glutamine et amine primaire risquerait d'entraîner une interversion au sein des combinaisons prédéfinies, telle que la réticulation du Fab, mais surtout le couplage des deux petites molécules entre elles compte tenu de leur plus petite taille qui les rend plus réactives. Ainsi, les deux méthodes de conjugaison doivent être réalisées de manière successive en intercalant une étape de purification pour éliminer les réactifs précédemment introduits en

excès. Dans ce contexte, deux stratégies peuvent être envisagées en fonction de l'ordre choisi pour la modification successive des glutamines et de la lysine.

## 2.1 LA MODIFICATION DE LA LYSINE SUIVIE DE CELLES DES GLUTAMINES

La première stratégie envisageable consiste en la conjugaison du cytotoxique tritié sur la HC-Lys105 suivi de l'incorporation de deux tags  $^{14}\text{C}$  sur les positions HC-Gln105 et LC-LLQGA. Pour cela, ce sont les molécules modèles **3a** et **5** utilisées dans le cadre de l'identification des positions réactives (Chapitre 2) qui seront, dans un premier temps, à nouveau conjuguées afin de vérifier la faisabilité de la stratégie.

La modification des résidus HC-Lys105 et HC-Gln108 a été évaluée par analyse en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF des peptides issus de la digestion trypsique (Figure 4). C'est le fragment peptidique initial de séquence H-SHQWIR-OH et de masse 826 Da qui a été suivi tout au long du processus de double modification. Expérimentalement, une partie du Fab conjugué a été digéré par la trypsine après chaque étape pour suivre l'introduction des deux modifications. À l'issue de la première étape, le fragment de masse 1559 Da correspondant à la conjugaison du résidu HC-Lys105 a effectivement été observé. La disparition de ce même fragment a ensuite été observée durant l'étape de conjugaison des glutamines. En revanche, le fragment de masse 2133 Da correspondant au peptide portant les deux modifications sur les résidus HC-Lys105 et HC-Gln108 est absent du digestat à l'issue de la double conjugaison. Néanmoins, un fragment inattendu de masse 1399 Da a été identifié au sein du digestat trypsique et a pu être attribué par fragmentation MS/MS à la séquence du peptide H-SHQWIR-OH modifié au niveau du résidu glutamine HC-Gln108.

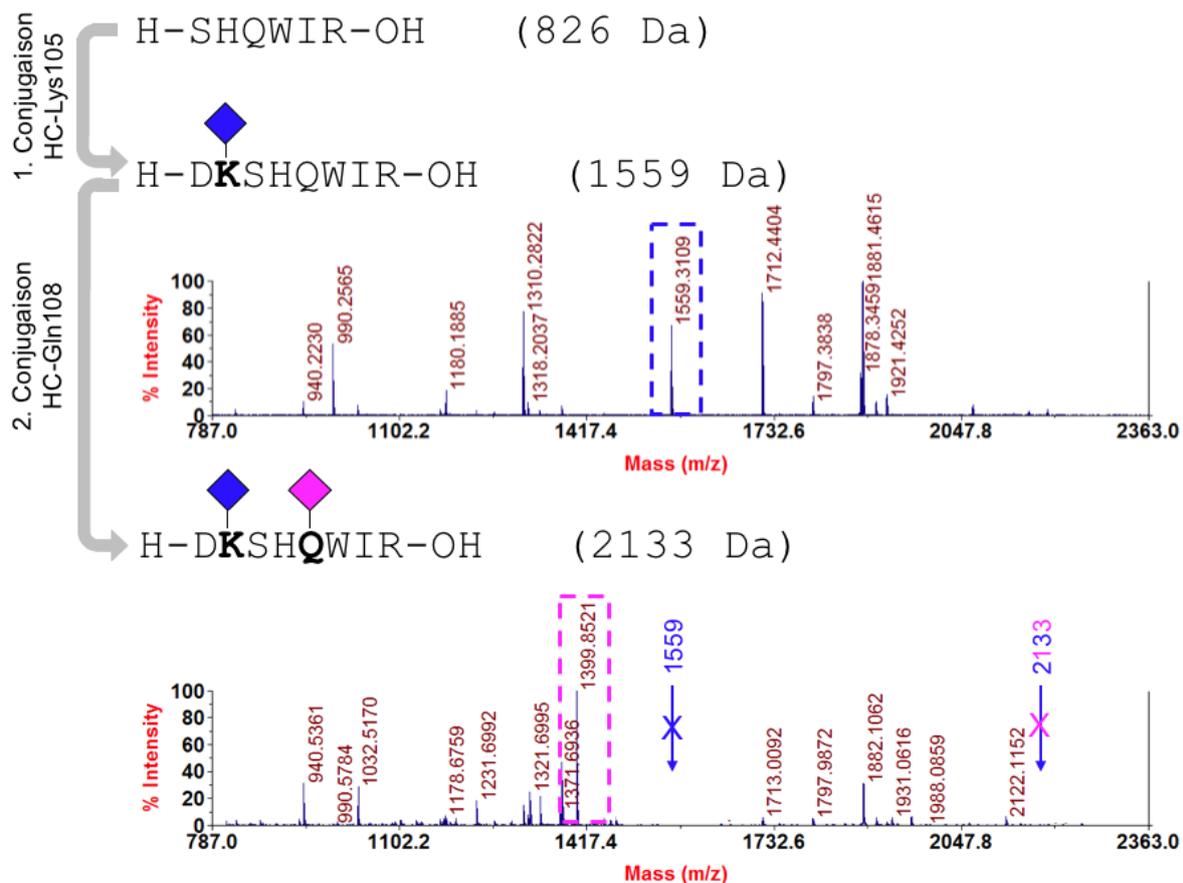


Figure 4 - Le suivi du fragment initial de séquence H-SHQWIR-OH et de masse 826 Da au sein du digestat trypsique permet de suivre la double modification des positions HC-Lys105 et HC-Gln108. Les carrés rose et bleu représentent les molécules modèles **3a** et **5** utilisées et qui induisent un incrément de masse de +573 Da et +490 Da respectivement.

La conversion du fragment de masse 1559 Da en celui de masse 1399 Da a pu être expliquée par deux modifications successives catalysées par la BTG. La première réaction, comme attendue, a été la transamidation de la fonction carboxamide de la chaîne latérale de la HC-Gln108 en présence de la molécule amine primaire **3a**. Mais, comme la modification qui a été introduite sur la chaîne latérale de la HC-Lys105 (molécule **5**) lors de la première étape se présente également sous la forme d'un résidu glutamine exposé à la surface de la boucle CDR-H3, la BTG la reconnaît comme un résidu réactif. Ainsi, l'enzyme a été également capable de catalyser la réaction inverse de désamidation de ce résidu en présence d'une molécule d'eau<sup>340</sup> (Figure 5). Cette désamidation a conduit d'une part à la déconjugaison du substrat sous la forme

<sup>340</sup> Strop, P. Versatility of microbial transglutaminase. *Bioconjug. Chem.* **25**, 855–862 (2014).

d'un acide glutamique, et d'autre part à la régénération de la fonction amine primaire de la chaîne latérale de la HC-Lys105 qui devient à nouveau un site de clivage de la trypsine. Cette stratégie ne permet alors pas l'obtention de conjugués doublement marqués de manière enzymatique.

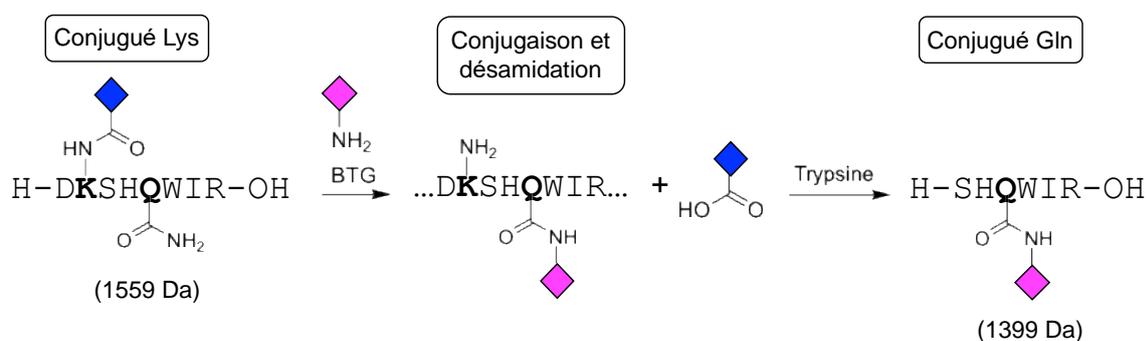


Figure 5 – La BTG catalyse la réaction de conjugaison du résidu glutamine réactif mais également la désamidation de la glutamine qui a été précédemment conjuguée, ce qui régénère la chaîne latérale de la lysine et restaure le site de clivage de la trypsine.

## 2.2 LA MODIFICATION DES GLUTAMINES SUIVIES DE CELLE DE LA LYSINE

Dans la deuxième stratégie envisagée, le processus de double marquage est inversé : l'incorporation des deux tags <sup>14</sup>C sur les positions HC-Gln105 et LC-LLQGA sera ensuite suivie de la conjugaison du cytotoxique tritié sur la HC-Lys105.

### 2.2.1 La preuve de concept avec des molécules modèles

D'une manière similaire à ce qui a été fait précédemment, le peptide de séquence H-SHQWIR-OH et de masse 826 Da a été suivi au sein du digestat trypsique pour évaluer la double conjugaison (Figure 6). À l'issue de la première étape, le fragment de masse 1399 Da correspondant à la conjugaison de la molécule **3a** sur le résidu HC-Gln108 a effectivement été observé. La disparition de ce même fragment a ensuite été observée durant l'étape de conjugaison de la molécule **5** sur la lysine et a été accompagnée de l'apparition d'un fragment de masse 2133 Da (Figure 6).

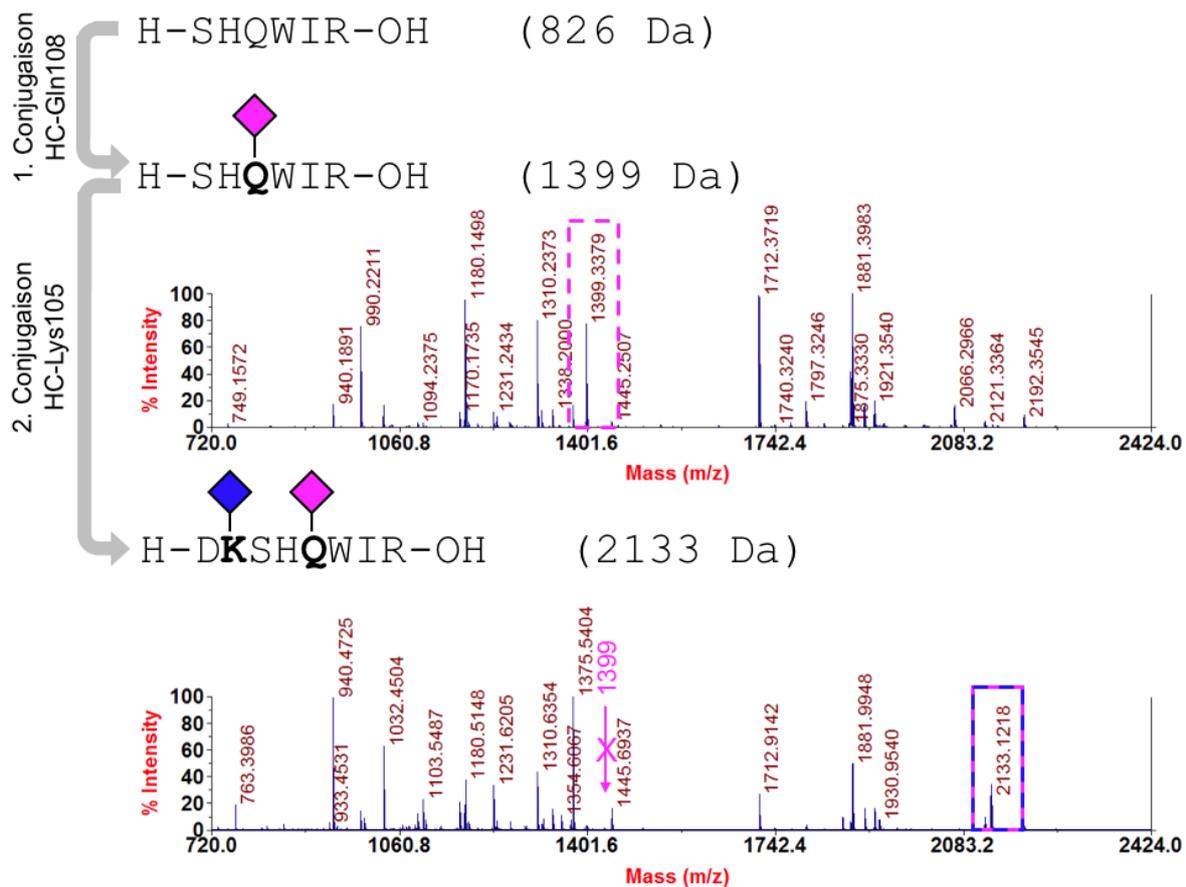


Figure 6 - Le suivi du fragment initial de séquence H-SHQWIR-OH et de masse 826 Da au sein du digestat trypsique permet de suivre la double modification des positions HC-Lys105 et HC-Gln108. Les carrés rose et bleu représentent les molécules modèles **3a** et **5** utilisées et qui induisent un incrément de masse de +573 Da et +490 Da respectivement.

Jusque-là, le peptide initial de masse 826 Da ainsi que ses différentes formes mono-conjuguées sur les positions HC-Gln108 et HC-Lys105 donnant respectivement des fragments de masse 1399 Da et 1559 Da, ont toujours donné des signaux de haute intensité par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Ici, au contraire, le fragment de masse 2133 Da a été identifié parmi les fragments de plus faible intensité. Cette diminution en intensité peut être expliquée de deux façons. D'une part, l'incorporation des deux modifications au sein de la séquence peptidique augmente significativement la masse moléculaire et d'autre part, cela complexifie la structure primaire du peptide initialement linéaire en un peptide doublement ramifié. Ces deux facteurs peuvent considérablement diminuer la capacité de désorption et d'ionisation du peptide, mais aussi impacter négativement sa capacité à être fragmenté par MS/MS. Ainsi, aucun spectre de fragmentation nous permettant de remonter à la séquence en acide aminé n'a pu être obtenu.

Bien que l'identité du fragment peptidique doublement fonctionnalisé de masse 2133 Da n'ait pas pu être vérifiée expérimentalement, aucun autre fragment au sein du digestat trypsique n'a pu être attribué à la modification du fragment de masse 1399 Da obtenu à l'issue de la première étape de conjugaison. En nous appuyant sur ces observations, nous avons considéré que cette approche permettait la double modification simultanée des positions HC-Lys105 et HC-Gln108.

L'absence d'activité de désamidation des résidus glutamine de la BTG dans cette deuxième approche peut être expliquée par l'encombrement autour de la glutamine (Figure 7). Dans la première approche, c'est la lysine qui est contenue au sein de la séquence du Fab, et le substrat glutamine qui a été conjugué est exposé à la surface de cette boucle, le rendant alors accessible à la transglutaminase (Figure 7A). En revanche, dans la deuxième approche, le substrat glutamine appartient à la séquence protéique tandis que la molécule amine primaire est présentée à la surface (Figure 7B). Cette configuration pourrait générer de l'encombrement autour de la glutamine, empêchant ainsi son interaction avec le site catalytique de la BTG et la protégeant ainsi d'une réaction désamidation.

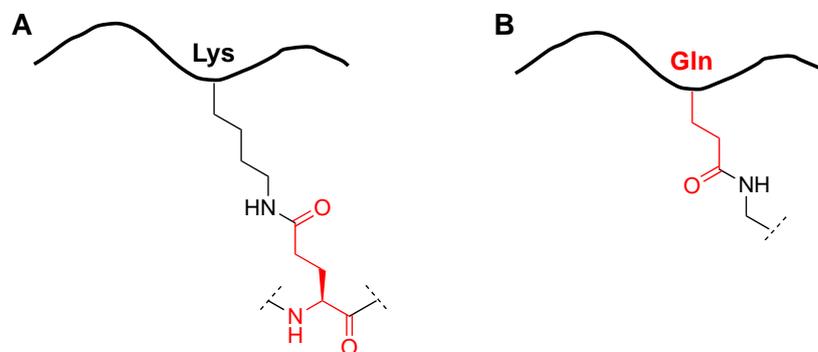


Figure 7 – Les conjugués obtenus après conjugaison d'une lysine ou d'une glutamine par la BTG. (A) La conjugaison d'un résidu lysine expose une glutamine réactive à la surface de la protéine. (B) La conjugaison d'un résidu glutamine crée un encombrement autour de cette dernière la rendant inaccessible à la BTG.

### 2.2.2 La double conjugaison des molécules d'intérêt

Le processus de double conjugaison enzymatique ayant été validé avec les molécules modèles, il a ensuite été appliqué à la conjugaison des linker-cytotoxique non marqués et du tag  $^{13}\text{C}$ . Pour

cela, deux versions de « linkers » à conjuguer sur le résidu lysine ont été préparé (Figure 8). Dans le cas du « linker » non-clivable, Il s'agit du substrat réactif glutaminylglycine protégé carbobenzyloxy (CBz) couplé à son extrémité C-terminal à la MMAE *via* son amine terminale méthylée (Composé **14**, Figure 8A). La version clivable, quant à elle, incorpore le dipeptide clivable Val-Ala<sup>341</sup>, et un bras espaceur auto-immolable de type p-aminobenzyl-carbamate (PABC) (Composé **30**, Figure 8B).

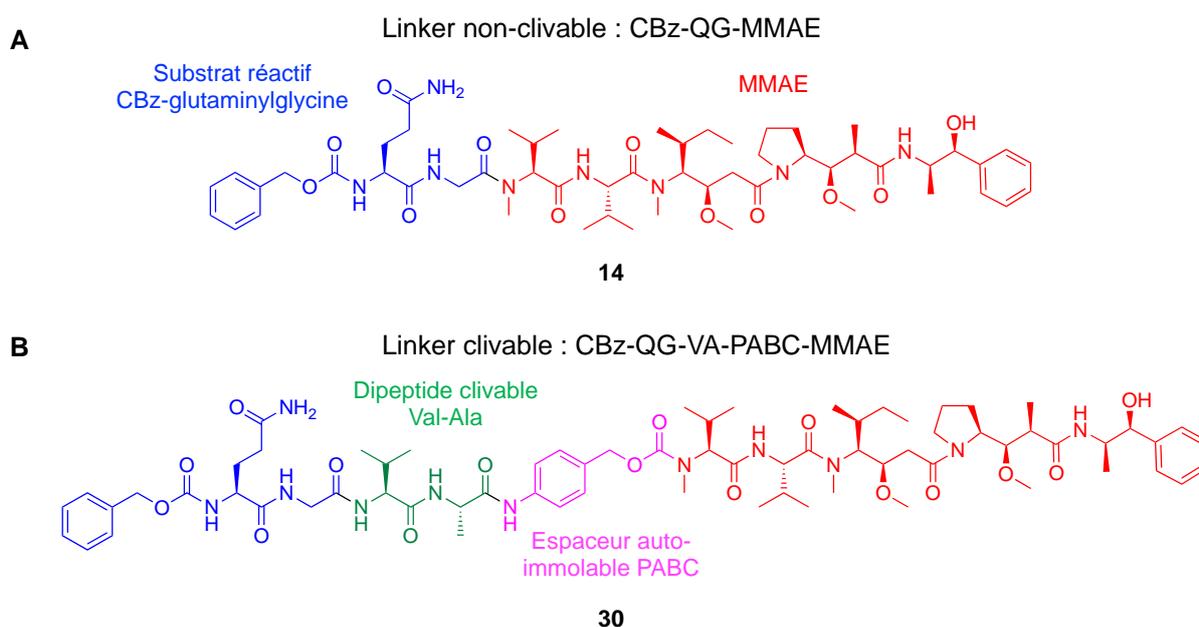


Figure 8 - La fonctionnalisation en C-terminal du substrat réactif CBz-Gln-Gly permet l'obtention de linker-cytotoxique conjugable sur un résidu lysine réactif. (A) Structure du linker-cytotoxique non-clivable. (B) Structure du linker-cytotoxique clivable incorporant le dipeptide Val-Ala et l'espaceur auto-immolable PABC.

La double conjugaison des molécules modèles a permis de mettre en évidence l'importance de l'ordre de conjugaison des positions glutamine et lysine. Cependant, les expériences préliminaires de mono-conjugaison ont également montré la nécessité d'une approche chémo-enzymatique en deux étapes pour l'introduction quantitative du tag <sup>13</sup>C, ainsi que la nécessité d'immobilisation du Fab sur support solide afin d'obtenir une conjugaison régio-spécifique sur la position HC-Lys105 (Chapitre 2, section 2.2.3).

<sup>341</sup> Dal Corso, A., Cazzamalli, S., Gébleux, R., Mattarella, M. & Neri, D. Protease-Cleavable Linkers Modulate the Anticancer Activity of Noninternalizing Antibody-Drug Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **28**, 1826–1833 (2017).

En nous appuyant sur ces observations, nous avons envisagé deux voies de synthèse (voie A et B, Figure 9) pour la double conjugaison du linker-cytotoxique et du tag  $^{13}\text{C}$ . Dans une étape initiale commune, la 4-azidobutan-1-amine est conjuguée sur les résidus glutamine réactif. Dans la première stratégie (voie A, Figure 9), le tag  $^{13}\text{C}$  est ensuite introduit par chimie "click" sur la fonction azido. Cette étape est suivie d'une immobilisation du Fab sur support solide afin de conjuguer le linker-cytotoxique sur la HC-Lys105. Dans la deuxième approche (voie B, Figure 9), le Fab est préalablement immobilisé sur support solide, permettant ainsi la conjugaison du cytotoxique sur la HC-Lys105. Cette étape est suivie d'une étape de chimie "click" permettant l'introduction du tag  $^{13}\text{C}$ .

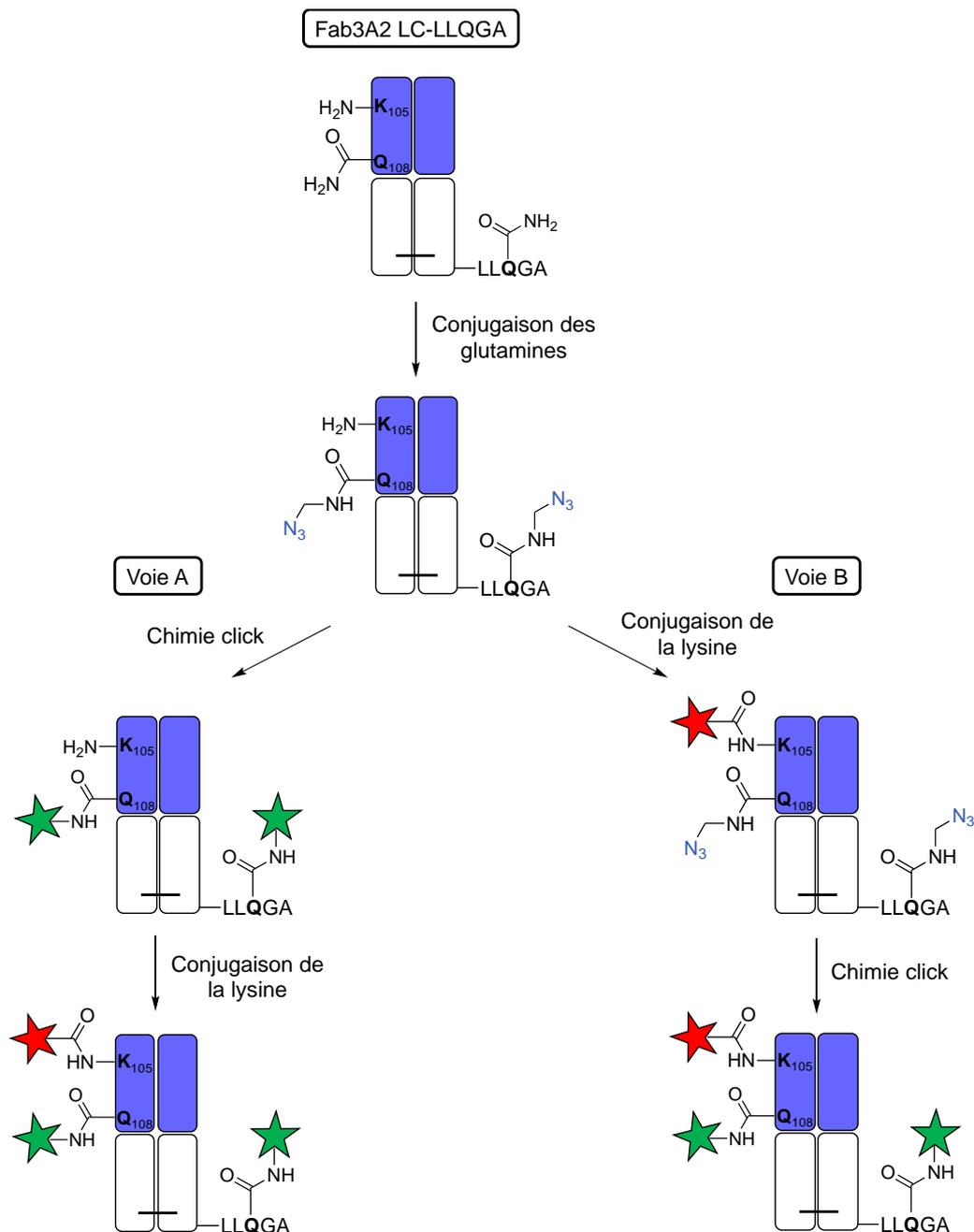


Figure 9 - Schéma des deux stratégies envisageables pour accéder à la double fonctionnalisation enzymatique de Fab3A2 LC-LLQGA. Les étoiles rouge et verte représentent le cytotoxique tritié et le tag marqué au carbone 14 respectivement.

Le suivi par spectrométrie de masse de type ESI-trappe ionique a permis de montrer que la première stratégie n'aboutit pas à l'obtention du double conjugué (Figure 10). En effet, la conjugaison enzymatique du linker-cytotoxique **14** sur la HC-Lys105 n'a pas fonctionné en présence du tag  $^{13}\text{C}$  **39a** conjugué au résidu HC-Gln108. Les résidus HC-Gln108 et HC-Lys105

étant à proximité, nous avons émis l'hypothèse que le tag  $^{13}\text{C}$  volumineux, conjugué sur la glutamine pouvait masquer la lysine, empêchant ainsi sa modification par la BTG.

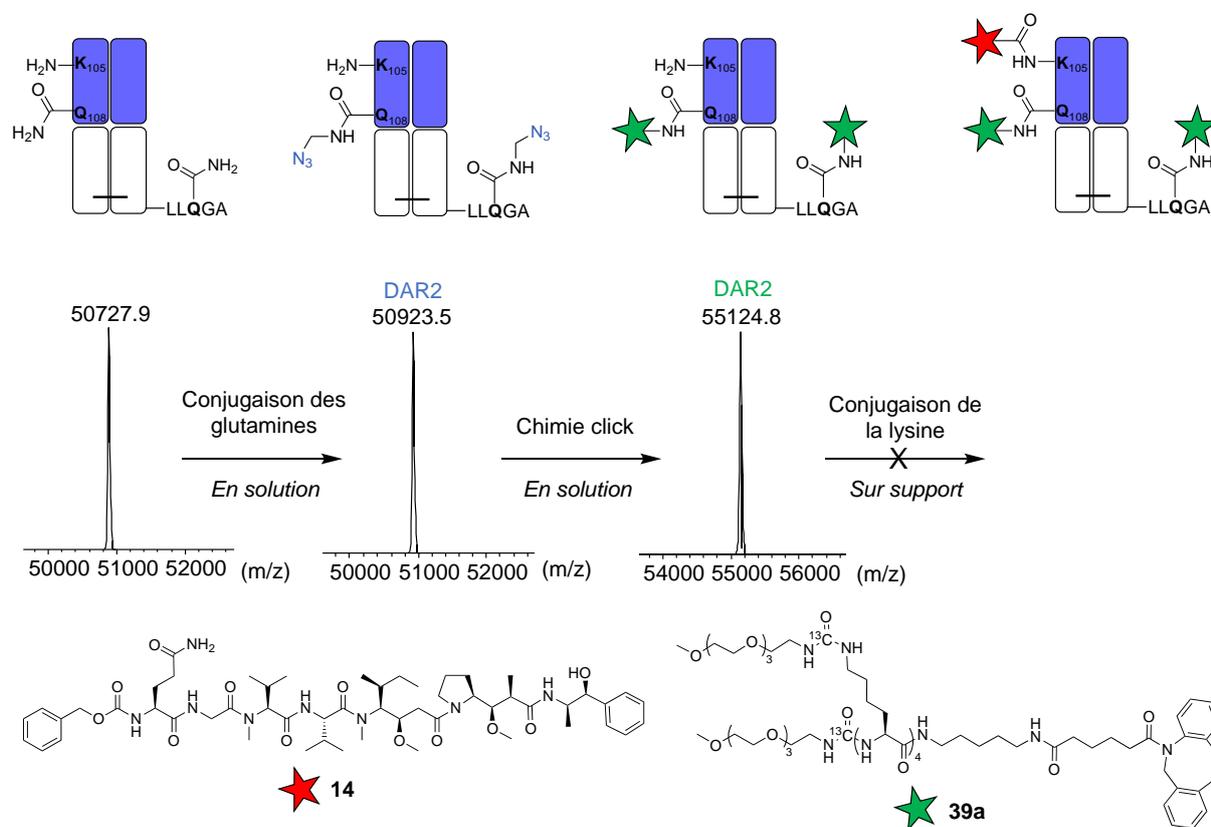


Figure 10 - Suivi par spectrométrie de type ESI-trappe ionique des différentes étapes de la double conjugaison.

Dans la deuxième approche, la conjugaison du linker-cytotoxique **14** sur la HC-Lys105 a été observée mais s'est révélée partielle (Figure 11). Ce faible taux d'incorporation du linker-cytotoxique pourrait être dû à la présence de la MMAE en C-terminal du substrat réactif CBZ-Gln-Gly, le rendant alors plus volumineux et moins réactif. Par ailleurs, une gêne stérique autour du résidu lysine induite par la présence de l'azido-butane semble peu probable. Cette supposition a été vérifiée lors de la conjugaison sur support du linker-cytotoxique **14** sur le Fab3A2 LC-LLQGA non modifié : un large excès de substrat (25 équivalents) est nécessaire pour observer une modification quantitative de la position HC-Lys105. Néanmoins, Le mélange de protéines issu de la conjugaison partielle du cytotoxique MMAE a été engagé dans l'étape suivante de chimie "click" afin de valider la conjugaison du tag  $^{13}\text{C}$  **39a**. De façon intéressante,

une différence de réactivité a été observée entre les deux espèces. Ainsi, le tag  $^{13}\text{C}$  a été conjugué quantitativement sur les deux fonctions azido du Fab n'incorporant pas la MMAE, tandis que le Fab modifié sur la position HC-Lys105 a montré une incorporation partielle de la deuxième molécule DBCO **39a**, conduisant à un mélange de DAR1 et DAR2. La présence du linker-cytotoxique **14** sur la position HC-Lys105 semble donc créer une gêne stérique autour de la fonction azido portée par la position HC-Gln108 ; ce qui diminue sa réactivité.

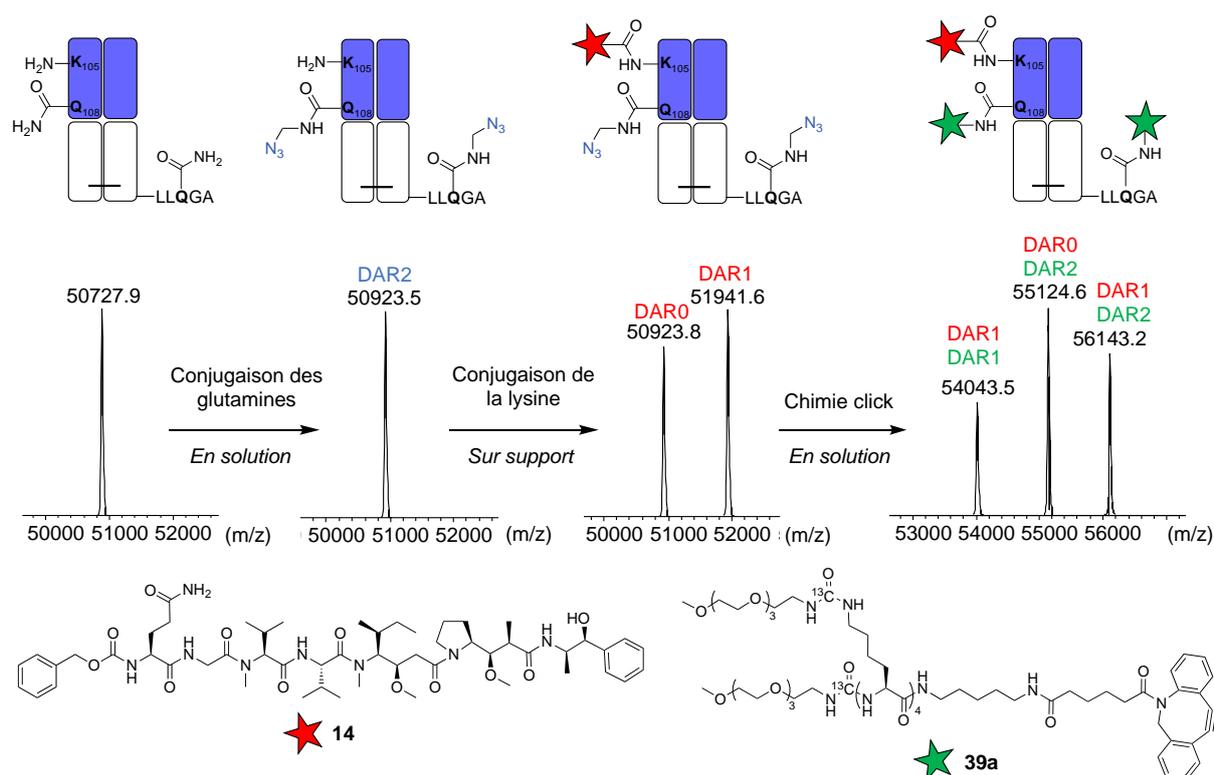


Figure 11 - Suivi par spectrométrie de type ESI-trappe ionique des différentes étapes de la double conjugaison.

### 2.3 LA MUTATION D'UN RÉSIDU GLUTAMINE RÉACTIF

L'ensemble de ces données suggèrent que la proximité des deux positions HC-Lys105 et HC-Gln108 au sein du domaine CDR-H3 impacte significativement leur réactivité respective lorsque l'une de ces deux positions est modifiée. Nous avons donc choisi de muter le résidu glutamine en asparagine, cette mutation invalidant totalement la conjugaison par la transglutaminase sur

cette position. Par ailleurs, nous avons vérifié que les propriétés d'inhibition du Fab vis-à-vis de MMP-14 restaient inchangées (Figure 12B).

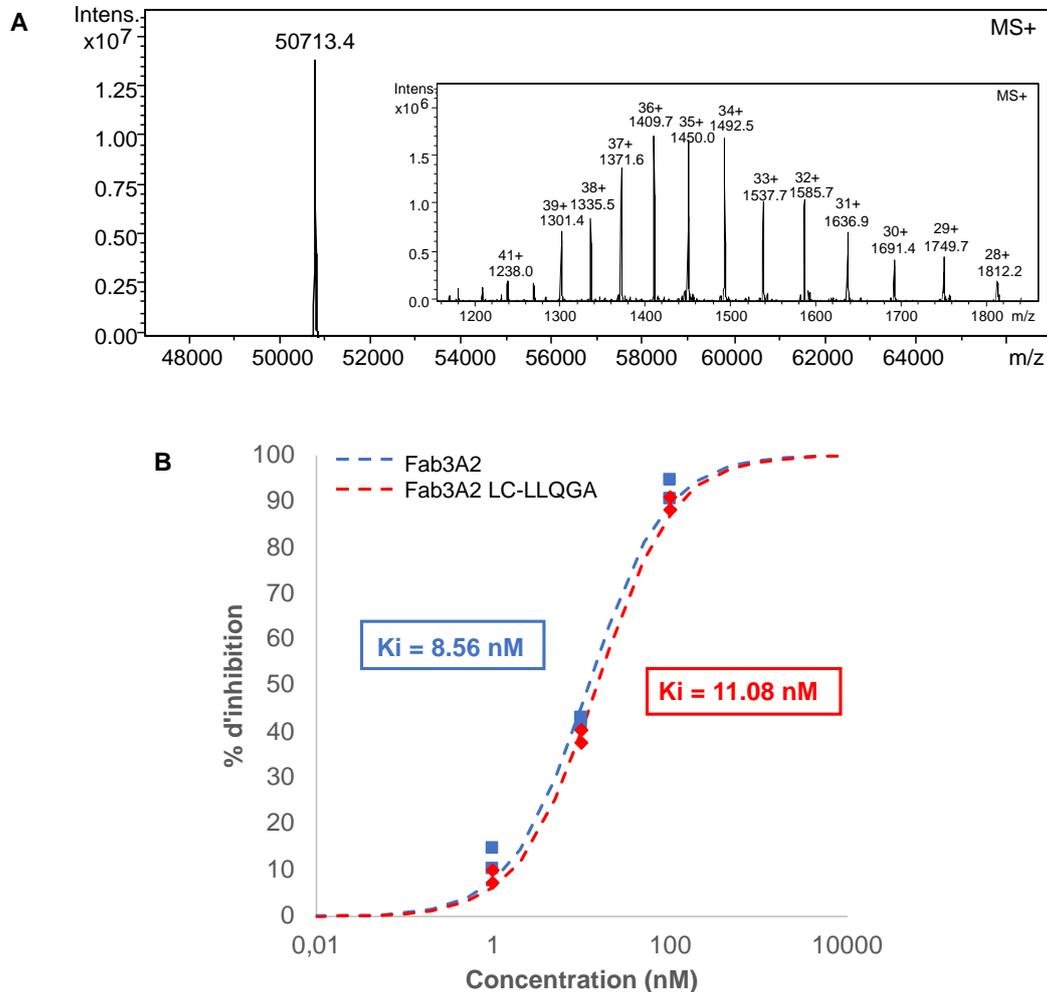


Figure 12 - La production du mutant Fab3A2 HC-Q108N. (A) Spectre de masse de type ESI-trappe ionique du Fab3A2 HC-Q108N qui a été produit en système eucaryote HEK293. (B) Détermination de la constante d'inhibition ( $K_i$ ) du Fab incorporant la mutation HC-Q108N.

Ce mutant du Fab3A2 ne présente plus qu'un seul résidu glutamine réactif localisé au sein de la séquence LLQGA (Figure 13A). Dans le but de pouvoir à la fois introduire le radiomarquage <sup>14</sup>C sur la même position au sein de toutes les constructions et de pouvoir faire varier la méthode de conjugaison du cytotoxique, la stratégie initiale a été redéfinie. Notre nouvelle approche a ainsi consisté à conjuguer le linker cytotoxique sur la position glutamine au sein de la séquence LLQGA et à introduire le radiomarquage <sup>14</sup>C sur le résidu HC-Lys105 (Figure 13B).

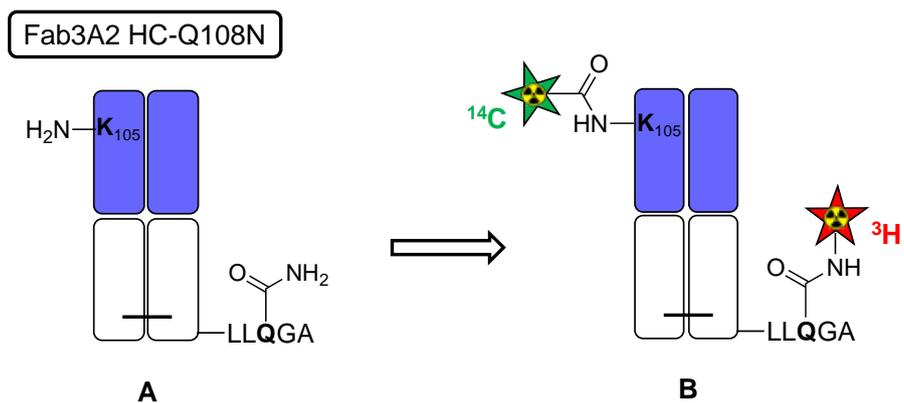


Figure 13 – (A) La séquence du Fab3A2 HC-Q108N contient deux résidus réactifs. (B) La stratégie de marquage du Fab3A2 HC-Q108N.

Ceci a nécessité la synthèse de nouveaux linker-cytotoxique incorporant un lien clivable ou non-clivable et présentant une fonction amine primaire (composés **16a/16b** et **34a/34b**, Figure 14A et 14B respectivement) ainsi qu'un substrat glutaminylglycine protégé CBz fonctionnalisé en C-terminal avec la 4-azidobutan-1-amine (composé **40**, Figure 14C).

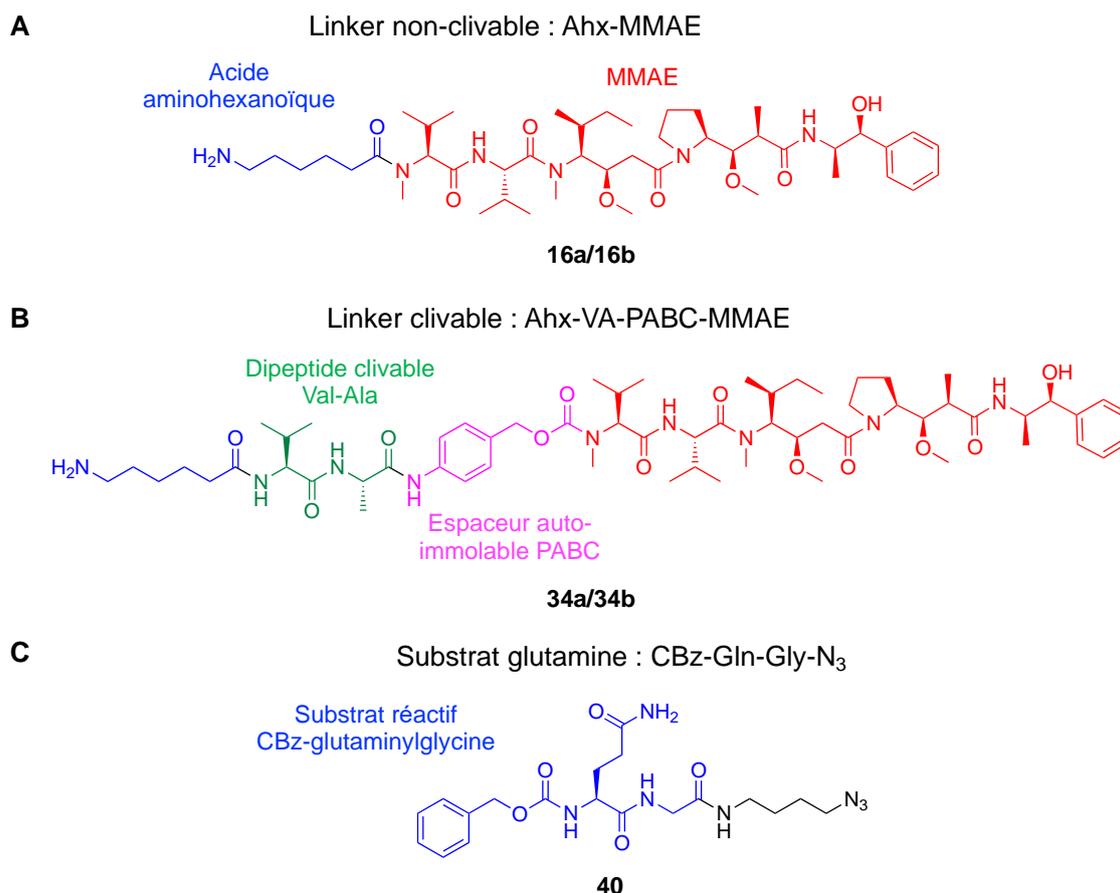


Figure 14 – Structure des différentes molécules utilisées pour la double conjugaison du Fab3A2 HC-Q108N. (A) Structure du linker-cytotoxique non-clivable conjugué sur la glutamine. (B) Structure du linker-cytotoxique clivable incorporant le dipeptide Val-Ala et l'espaceur auto-immolable PABC conjugué sur la glutamine. (C) Structure du substrat glutamine utilisé pour l'incorporation d'une fonction azido sur la lysine.

Dans le but de simplifier le processus de double conjugaison enzymatique, la conjugaison des substrats amines, jusque-là réalisée en solution, a été tentée sur support solide. Contrairement à la conjugaison des lysines, nous avons observé que l'immobilisation du Fab sur support solide impacte négativement l'efficacité de la réaction. La stratégie qui a donc été suivie ici pour la double fonctionnalisation du mutant Fab3A2 HC-Q108N par la BTG est décrit dans la figure 15. Dans un premier temps, le linker-cytotoxique **16a** a été conjugué en solution sur la position LLQGA. Le conjugué résultant a ensuite été immobilisé sur support solide et l'introduction régio-spécifique de la fonction azido sur la position HC-Lys105 a été réalisée. Après élution de la protéine, la molécule DBCO **39a** marquée au carbone 13 a été conjuguée en solution par une réaction de chimie "click". L'analyse par spectrométrie de masse de type ESI-trappe ionique des

conjugués aux différentes étapes du processus a permis de valider la faisabilité de cette stratégie de double conjugaison enzymatique (Figure 15).

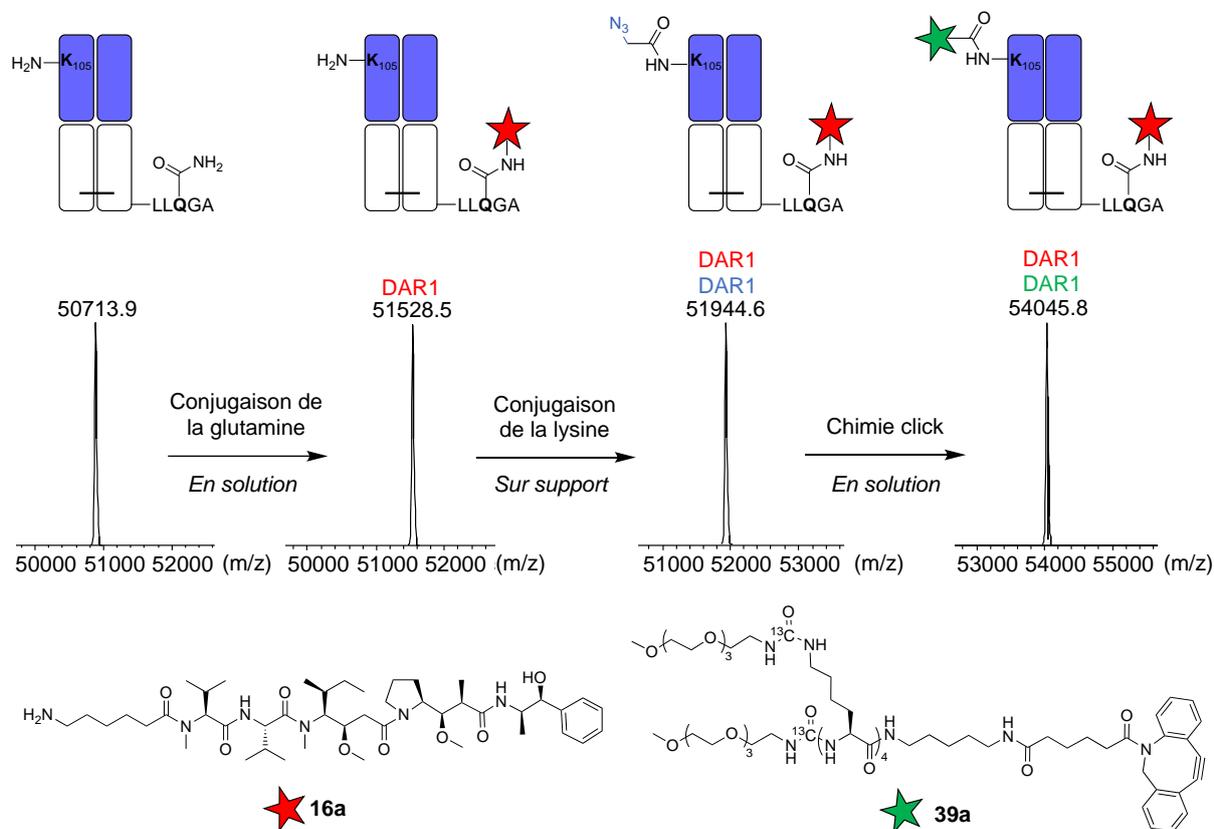


Figure 15 - Suivi par spectrométrie de type ESI-trappe ionique des différentes étapes de la double conjugaison.

### 3 LA DOUBLE CONJUGAISON CHIMIQUE ET ENZYMATIQUE

La double modification du Fab3A2 LC-V109C implique la conjugaison du cytotoxique tritié sur le résidu cystéine. Pour cela, en plus des linkers non-clivables de type maléimide et maléimide auto-hydrolysable (**9a/9b** et **11a/11b**, Figure 16A) utilisés pour l'optimisation du protocole de mono-conjugaison de la cystéine sur support solide (Chapitre 2), des versions clivables incorporant le dipeptide Val-Ala ont été synthétisés (**23a/23b** et **27a/27b**, Figure 16B).

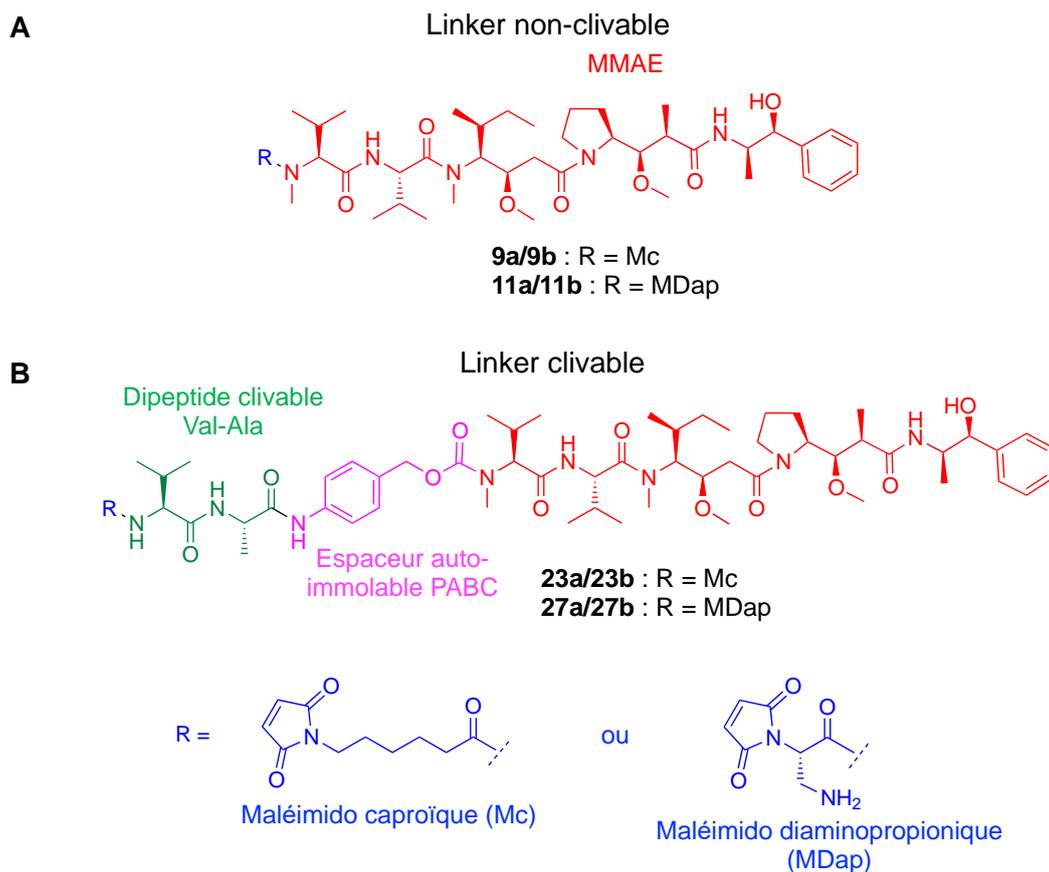


Figure 16 – L'utilisation du motif maléimide permet l'obtention de linker-cytotoxique conjugable sur un résidu cystéine réactif. (A) Structure du linker-cytotoxique non-clivable. (B) Structure du linker-cytotoxique clivable incorporant le dipeptide Val-Ala et l'espaceur auto-immolable PABC.

La synthèse des linkers incorporant le maléimide auto-hydrolysable implique une étape de déprotection du groupement Boc protégeant l'amine primaire du motif diaminopropionique à l'issue de la synthèse. L'utilisation de radioactivité s'accompagne d'une réglementation stricte notamment en termes de composition des déchets. Les molécules halogénées et en particulier fluorées, sont soumises à cette réglementation et ne sont autorisées qu'à des concentrations très faibles dans les effluents liquides radioactifs. Le fluor ne doit pas dépasser une concentration de 50 ppm, soit environ 1,5 mL d'acide trifluoroacétique (TFA) dilué dans 30 L de liquide. Dans ce contexte, les conditions usuelles de déprotection des groupements Boc en présence de TFA ne peuvent être appliquées dans le cas des molécules radioactives. Ainsi, la synthèse des linkers maléimide auto-hydrolysable a donc nécessité le développement de conditions de déprotection du groupement Boc compatibles avec la réglementation radioactive. En présence d'une solution d'acide sulfurique à 10% dans le dioxane, la

déprotection du linker non-clivable a été observée, cependant les mêmes conditions opératoires ont conduit à l'hydrolyse du linker clivable. En effet, la structure de ce dernier contient une fonction carbamate sensible qui peut être hydrolysée en conditions acides et qui entraîne le relargage de la MMAE (Figure 17A). L'utilisation d'une solution d'acide chlorhydrique à 4N dans le dioxane a abouti au même résultat : une déprotection totale du linker non-clivable a été observée en quelques heures, mais le linker clivable a été complètement hydrolysé. Aucune conditions permettant la déprotection du Boc sans hydrolyser la fonction carbamate entre l'espaceur auto-immolable et le cytotoxique n'ont pu être identifiées. Le meilleur compromis qui a été trouvé est l'utilisation d'une solution d'acide chlorhydrique à 3N dans un mélange dioxane/DMF (3/1) à température ambiante pendant cinq heures, qui permet de déprotéger une certaine quantité du produit d'intérêt, tout en observant qu'une petite proportion d'hydrolyse de la molécule (Figure 17B). Dans ces conditions le dérivé **26a** a été obtenu avec un rendement de 46%.

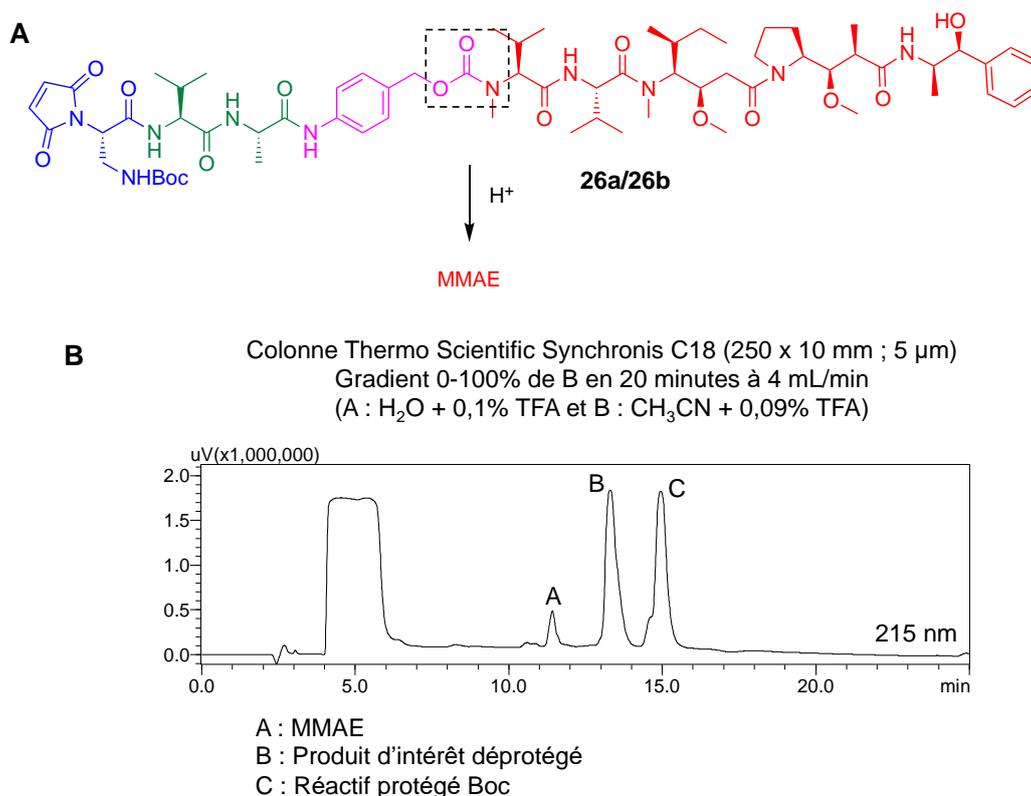


Figure 17 – Mise au point de conditions opératoires de déprotection du groupement Boc compatibles avec l'utilisation de radioactivité. (A) L'hydrolyse de la fonction carbamate entre l'espaceur auto-immolable et le cytotoxique observée en conditions acides conduit au relargage de la MMAE. (B) Profil HPLC du mélange de produit obtenu lors de la déprotection du Boc.

### 3.1 LA DOUBLE CONJUGAISON CYSTÉINE-GLUTAMINE

Pour rappel, la première stratégie de double modification envisagée sur le Fab3A2 LC-V109C impliquait la conjugaison du cytotoxique tritié sur le résidu cystéine ainsi que l'introduction du tag radiomarqué sur la position HC-Gln108 (Figure 2B – Section 1). En nous appuyant sur cette stratégie, nous avons réalisé la double fonctionnalisation cystéine/glutamine du mutant Fab3A2 LC-V109C (figure 18). Dans un premier temps, la 4-azidobutan-1-amine a été conjuguée en solution sur la position HC-Gln108. Le conjugué a ensuite été capturé sur support solide et trois étapes successives de réduction des cystéines, réoxydation des ponts disulfures et conjugaison du linker-cytotoxique **9a** sur la LC-Cys109 ont été réalisées. Après élution de la protéine, la molécule DBCO **39a** marquée au carbone 13 a été conjuguée en solution. L'analyse par spectrométrie de masse de type ESI-trappe ionique des conjugués aux différentes étapes du processus a permis de valider la faisabilité de cette stratégie de double conjugaison chimique/enzymatique (Figure 18).

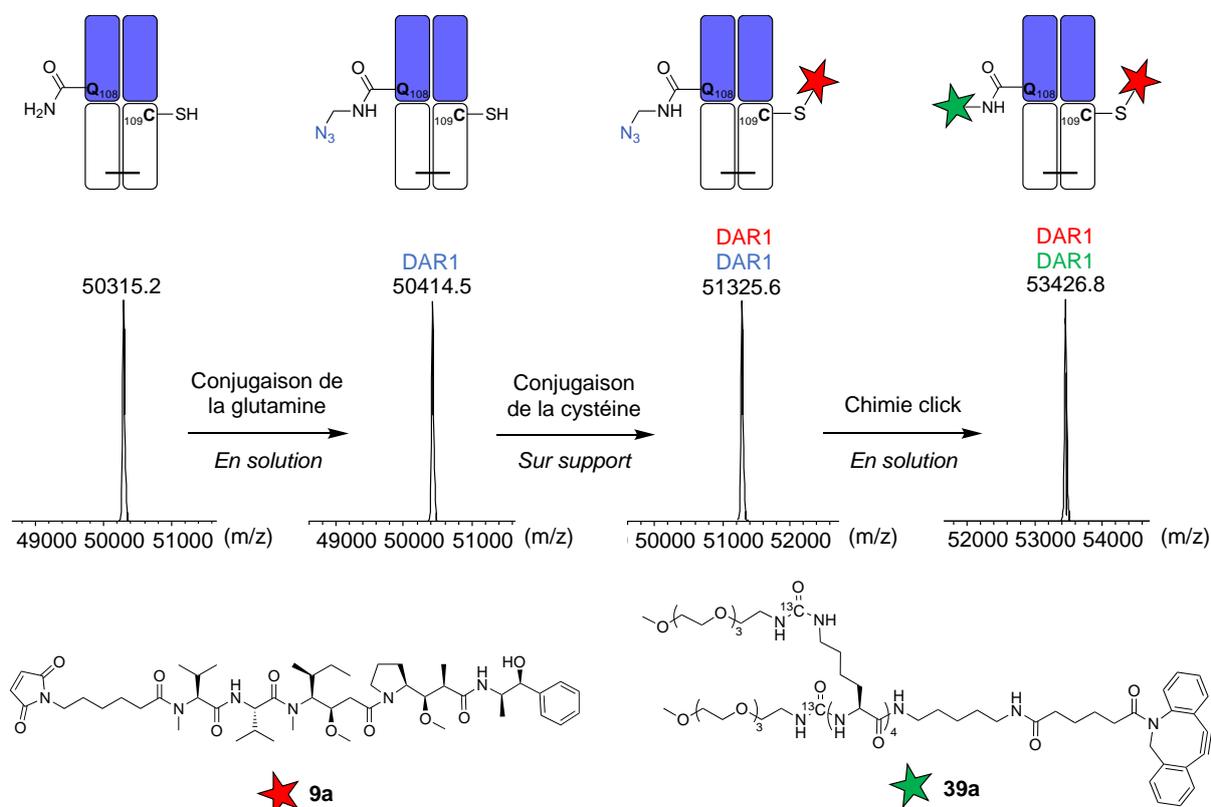


Figure 18 - Suivi par spectrométrie de type ESI-trappe ionique des différentes étapes de la double conjugaison.

### 3.2 LA DOUBLE CONJUGAISON CYSTÉINE-LYSINE

Cette première méthode de double fonctionnalisation a abouti à l'obtention d'un double conjugué. Cependant, étant donné que la position réactive HC-Gln108 a été muté au sein du Fab3A2 LC-LLQGA, la stratégie a été repensée pour introduire le radiomarquage  $^{14}\text{C}$  sur le même résidu HC-Lys105 commun aux deux séquences. Le processus qui a été suivi pour la double fonctionnalisation cystéine/lysine du mutant Fab3A2 LC-V109C sur support solide est décrit dans la figure 19. Le Fab immobilisé sur support a été, dans un premier temps, soumis aux étapes de réduction des cystéines, de réoxydation des ponts disulfures et de conjugaison du linker-cytotoxique **9a** sur la LC-Cys109. Après le lavage des billes pour éliminer les réactifs en excès, le substrat glutamine qui porte une fonction azido **40** a ensuite été conjugué en présence de BTG sur la lysine HC-Lys105. En dernière étape, la molécule DBCO **39a** marquée au carbone 13 a été conjuguée en solution. L'analyse par spectrométrie de masse de type ESI-trappe ionique des conjugués aux différentes étapes du processus a permis de valider cette stratégie de double conjugaison chimique/enzymatique (Figure 19).

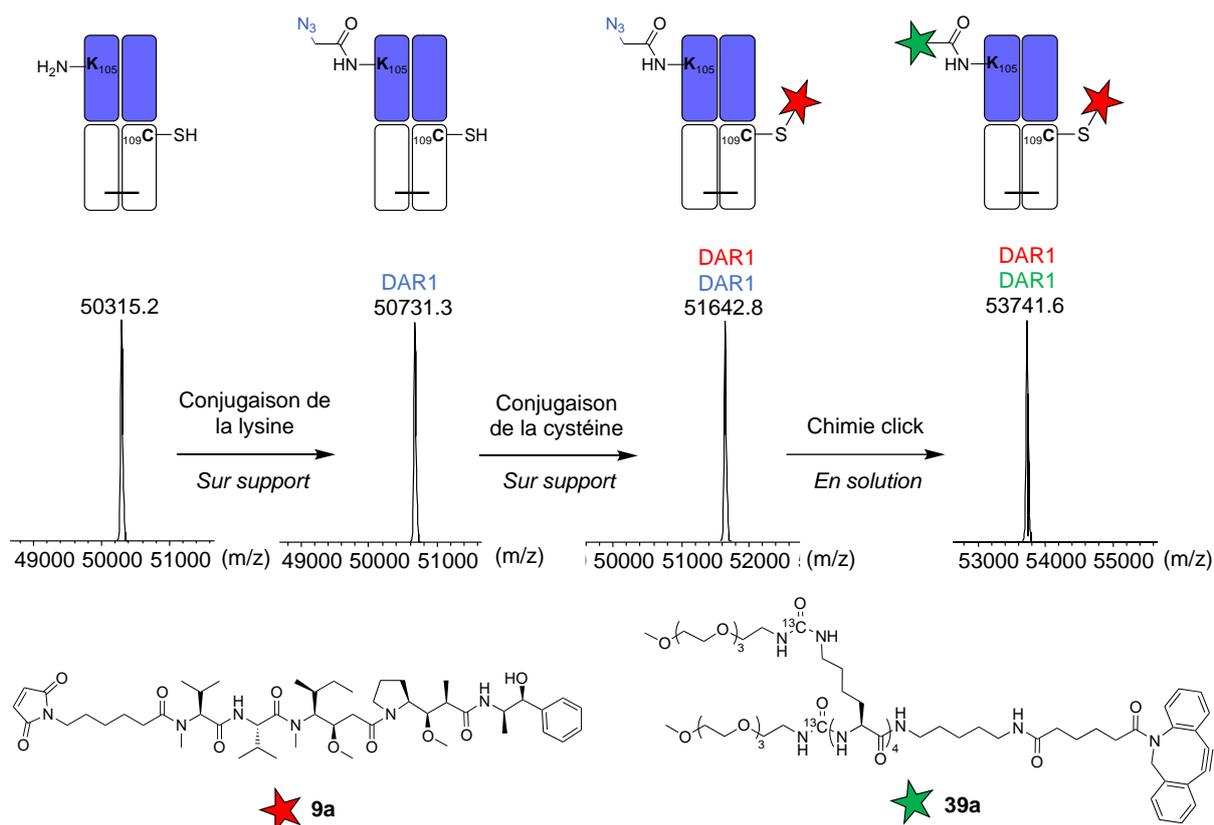


Figure 19 - Suivi par spectrométrie de type ESI-trappe ionique des différentes étapes de la double conjugaison.

Nous avons vu que l'utilisation d'une combinaison de différentes méthodes de conjugaison enzymatique et chimique permet l'obtention de conjugués doublement modifiés de manière régio-spécifique à partir des mutants Fab3A2 HC-Q108N et Fab3A2 LC-V109C. L'ensemble des conditions de conjugaison ainsi que les DAR obtenus et les positions modifiées dans chaque cas sont résumés dans le tableau 1.

FAB	MÉTHODE DE CONJUGAISON	RÉACTIF	CONDITIONS	DAR	RÉSIDUS MODIFIÉS
FAB3A2 HC-Q108N	Enzymatique glutamine/lysine	Amine primaire/substrat glutamine	1. Glutamine en solution 2. Lysine sur support	1/1	LC-LLQGA* HC-Lys105
FAB3A2 LC-V109C	Enzymatique/chimique glutamine/cystéine	Amine primaire/maléimide	1. Glutamine en solution 2. Cystéine sur support	1/1	HC-Gln108 LC-V109C*
FAB3A2 LC-V109C	Enzymatique/chimique lysine/cystéine	Substrat glutamine/maléimide	1. Lysine sur support 2. Cystéine sur support	1/1	HC-Lys105 LC-V109C*

\*Résidus introduits par mutation de la séquence native du Fab3A2

Tableau 1 - Bilan des conditions de conjugaison chimique et enzymatique applicables aux mutants du Fab3A2 et conduisant à l'obtention de conjugués doublement fonctionnalisés.

# CHAPITRE 5

## L'ÉVALUATION *IN VIVO* DES ADC DOUBLEMENT MARQUÉS $^3\text{H}/^{14}\text{C}$

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que l'utilisation d'une combinaison de méthodes chimique et enzymatique de conjugaison régio-spécifique a permis l'obtention d'ADC froids doublement conjugués. De plus la synthèse d'une molécule radiomarquée au carbone 14 et la tritiation de la MMAE ayant également été validées, nous pouvons envisager la production d'objets doublement radiomarqués qui seront évalués *in vivo* en termes de pharmacocinétique et de biodistribution. Certains paramètres propres à la radioactivité, tels que la radioactivité spécifique à introduire sur les ADC et le ratio des différents isotopes restent néanmoins à déterminer préalablement.

## 1 LA DÉTERMINATION DU RATIO $^3\text{H}/^{14}\text{C}$

---

Une différence considérable existe entre les radioactivités spécifiques des deux radioisotopes  $^3\text{H}$  et  $^{14}\text{C}$ , et cet écart se retrouve également entre les activités spécifiques de la MMAE tritiée et de la molécule marquée au  $^{14}\text{C}$  synthétisée. En effet, le cytotoxique possède une activité spécifique de 74 Ci/mmol en tritium tandis que celle du tag  $^{14}\text{C}$  s'élève à 0,31 Ci/mmol, soit environ 238 fois plus faible. Dans ce contexte, il a été décidé i) d'utiliser la molécule  $^{14}\text{C}$  à sa radioactivité spécifique de 0,31 Ci/mmol, et ii) de réaliser une dilution isotopique de la MMAE tritiée avec une version non marquée (froide) de cette dernière. Plusieurs contraintes sont à prendre en compte dans la détermination du facteur de dilution à appliquer au tritium. D'une part, la sensibilité de détection des méthodes de quantification utilisées détermine la dilution maximale applicable pour être toujours facilement quantifiable. Dans ce cas, c'est la limite de détection par scintillation liquide qui sera prise en compte, étant donné que la sensibilité de détection de l'autoradiographie digitale dépend uniquement du temps d'acquisition. D'autre part, le taux de dilution minimal sera fixé par la capacité des différentes méthodes analytiques à discriminer et à quantifier avec précision les deux isotopes en présence d'un excès de tritium par rapport au carbone 14.

## 1.1 LA DOUBLE DÉTECTION PAR SCINTILLATION LIQUIDE

La scintillation liquide est une technique de quantification largement utilisée pour la mesure de la radioactivité des radioisotopes  $\beta$ . Cette méthode est employée pour quantifier la radioactivité au sein d'échantillons biologiques tels que le sang ou les broyats d'organes dans le but d'obtenir des données quantitatives *in vivo*.

### 1.1.1 Principe de la double détection par scintillation liquide

La scintillation liquide est une technique qui consiste à mélanger l'échantillon radioactif à mesurer à un liquide scintillant qui absorbe l'énergie des rayonnements ionisants émis lors des désintégrations radioactives et les réémet en un signal lumineux détectable et quantifiable. Pour accomplir ces deux actions d'absorption et de réémission, le liquide scintillant contient deux composants de base : le solvant et le scintillateur. Le solvant agit comme un collecteur d'énergie, qui conduit cette énergie vers les molécules scintillantes qui la convertissent ensuite en lumière.

Chaque molécule scintillante émet un seul photon lors de l'activation, et la longueur d'onde de ce photon est caractéristique de la molécule et non de la particule  $\beta$  émise. Toutefois, le nombre de photons générés est directement proportionnel à la longueur du trajet de la particule  $\beta$ , qui est elle-même déterminée par son énergie d'émission. En effet, la particule  $\beta$  rebondit de molécule de solvant en molécule de solvant jusqu'à ce que son énergie incidente soit épuisée. Ainsi, l'intensité de chaque impulsion lumineuse correspond à l'énergie d'émission et le nombre d'impulsions par seconde correspond au nombre d'émissions radioactives. Le compteur à scintillation classe chaque impulsion lumineuse en fonction du nombre de photons qu'elle contient et qui correspond à l'énergie d'émission de la particule  $\beta$ . Les impulsions lumineuses sont ensuite rassemblées dans des canaux qui correspondent à une gamme spécifique d'énergie  $\beta$ , et le nombre d'impulsions par seconde est enregistré dans chaque canal. Ainsi, en théorie, un compteur à scintillation liquide rassemblerait la majorité des émissions du tritium et du carbone 14 dans deux canaux d'énergie différents, ce qui permettrait de les quantifier indépendamment l'un de l'autre.

### 1.1.2 La mise au point expérimentale de la double détection par scintillation liquide

Expérimentalement, nous avons voulu vérifier, dans un premier temps, que les émissions du tritium et du carbone 14 soient bien enregistrées dans deux canaux distincts par le compteur à scintillation. Pour cela, différentes quantités des deux isotopes individuellement ou en mélange ont été diluées dans du liquide scintillant puis ont été analysées avec deux protocoles différents (Tableau 1). Le premier protocole appelé "<sup>3</sup>H" a été paramétré pour compter uniquement les émissions de faibles énergies telles que celles du tritium. De la même manière le second protocole appelé "<sup>14</sup>C" est programmé pour quantifier uniquement les émissions rassemblées sur le canal de moyenne énergie correspondant à celle du carbone 14.

A		Théorique (nCi)		Expérimental (nCi)	
<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C
5	0	4,90	2,65		
0,5	0	0,44	0,25		
0,25	0	0,25	0,14		

B		Théorique (nCi)		Expérimental (nCi)	
<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C
0	5	3,47	4,80		
0	0,5	0,33	0,45		
0	0,25	0,19	0,27		

C		Théorique (nCi)		Expérimental (nCi)	
<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C
5	5	8,59	7,68		
0,5	0,5	0,87	0,75		
0,25	0,25	0,45	0,39		

Tableau 9 - Comptage par scintillation liquide de la radioactivité du tritium et du carbone 14. (A) Solutions de tritium. (B) Solutions de carbone 14. (C) Mélanges stœchiométriques des deux isotopes.

La quantification de chacun des deux isotopes avec le protocole adapté donne des valeurs expérimentales en accord avec la quantité théorique lorsque ces derniers sont seuls en solution (Tableau 1A et 1B). Cependant, il a été observé qu'une part non négligeable de l'émission de chacun des deux isotopes est également comptabilisée sur le second canal d'énergie. En effet, de 54% à 57% du signal du tritium est détecté sur le canal de moyenne énergie paramétrée pour la détection du carbone 14. Plus important encore, de 70% à 72% du signal du carbone 14 est comptabilisé sur le canal programmé pour la quantification du tritium. Le même

phénomène est observé lors de l'analyse d'un mélange stœchiométrique des deux isotopes : la quantité mesurée pour chaque isotope est surestimée et correspond à l'émission de l'isotope d'intérêt, à laquelle s'ajoute la part du signal du second isotope qui est également collectée sur ce canal (Tableau 1C).

Ce phénomène peut être expliqué en observant les spectres d'émission des deux isotopes (Figure 1). Bien que les deux radioéléments possèdent des énergies maximales suffisamment différentes (18 keV pour le tritium et 156 keV pour le carbone 14), le spectre d'émission du carbone 14 est très étendu ; ce qui génère une zone de recouvrement des deux signaux. Ce chevauchement des spectres d'émission est donc responsable du phénomène d'addition des signaux observé précédemment, en particulier dans le canal de mesure du tritium, où la zone de recouvrement des deux isotopes est la plus importante.

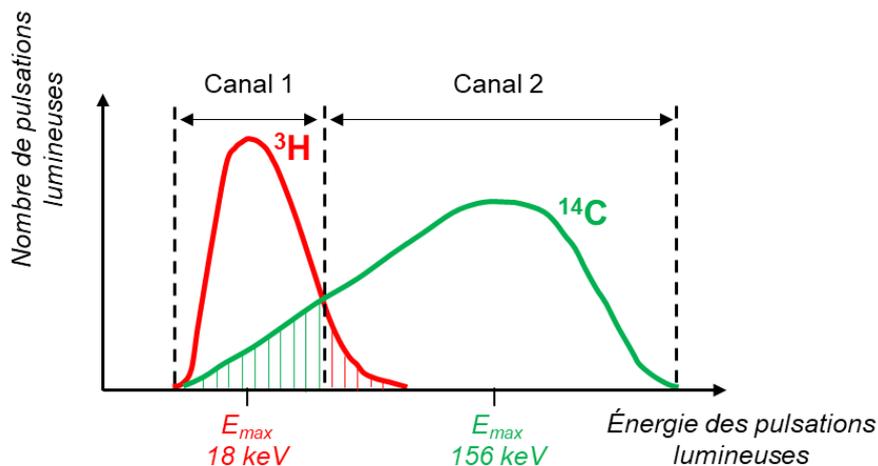


Figure 1 – L'existence d'une zone de recouvrement entre les spectres d'émission des radioisotopes tritium et carbone 14 empêche leur quantification précise dans les deux canaux d'énergie.

Dans le but de s'affranchir de ce problème d'addition des signaux causé par le recouvrement des spectres d'émission des deux isotopes, un nouveau protocole d'analyse a été utilisé. Contrairement à la première stratégie qui consistait à utiliser successivement deux protocoles distincts qui ciblaient chacun une gamme d'énergie d'émission différente, la nouvelle approche utilise un protocole unique mesurant simultanément sur deux canaux (Figure 2).

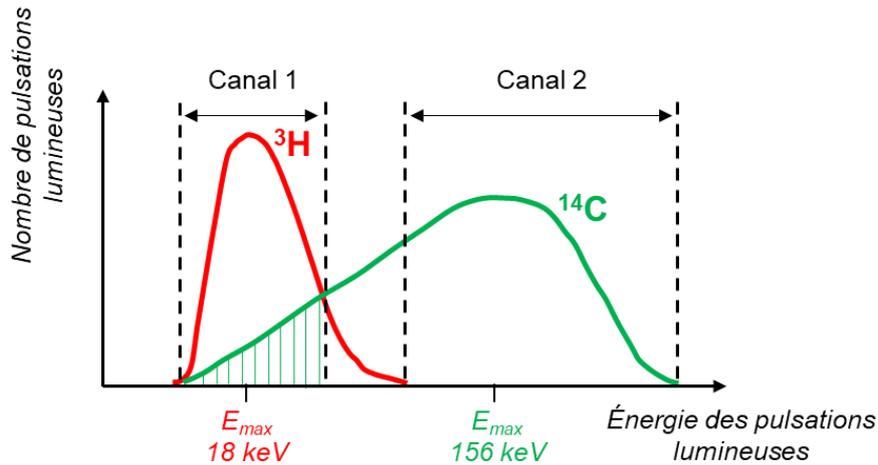


Figure 2 - L'utilisation d'un protocole de comptage sur deux canaux permet de s'affranchir du phénomène de recouvrement des spectres d'émission des radioisotopes tritium et carbone 14.

La discrimination des deux isotopes est obtenue en paramétrant le second canal, celui de plus haute énergie, pour qu'il ne mesure que les impulsions lumineuses provenant de l'isotope de plus haute énergie. Dans un second temps, le premier canal, celui de plus faible énergie comptabilise les impulsions lumineuses émises après la désintégration des deux radioéléments. Un algorithme de calcul permet ensuite de calculer et de soustraire l'interférence de l'isotope de plus haute énergie à la mesure du canal 1 à partir de la quantification obtenue dans le canal 2.

Les mêmes solutions contenant différentes quantités des deux isotopes individuellement ou en mélange ont été analysées avec ce protocole de mesure dual (Tableau 2). En présence d'un seul radioélément, les valeurs expérimentales qui ont été mesurées pour cet élément correspondent aux valeurs théoriques. De plus, cette mesure est associée à la détection d'une quantité négligeable à nulle du second isotope lorsque celui-ci est absent du mélange (Tableau 2A et 2B). De la même manière, l'analyse d'un mélange conduit à l'obtention d'une quantification juste des deux isotopes (Tableau 2C).

A		Théorique (nCi)		Expérimental (nCi)	
$^3\text{H}$	$^{14}\text{C}$	$^3\text{H}$	$^{14}\text{C}$	$^3\text{H}$	$^{14}\text{C}$
5	0	4,85	0,02		
0,5	0	0,47	0		
0,25	0	0,24	0		

B		Théorique (nCi)		Expérimental (nCi)	
$^3\text{H}$	$^{14}\text{C}$	$^3\text{H}$	$^{14}\text{C}$	$^3\text{H}$	$^{14}\text{C}$
0	5	0,04	4,71		
0	0,5	0	0,43		
0	0,25	0	0,23		

C		Théorique (nCi)		Expérimental (nCi)	
$^3\text{H}$	$^{14}\text{C}$	$^3\text{H}$	$^{14}\text{C}$	$^3\text{H}$	$^{14}\text{C}$
5	5	4,89	4,72		
0,5	0,5	0,46	0,45		
0,25	0,25	0,23	0,22		

Tableau 10 - Comptage par scintillation liquide de la radioactivité du tritium et du carbone 14 à l'aide d'un protocole dual. (A) Solutions de tritium. (B) Solutions de carbone 14. (C) Mélanges stœchiométriques des deux isotopes.

La robustesse de la méthode analytique a été évaluée en faisant varier le ratio du tritium par rapport au carbone 14 au-delà de la stœchiométrie (Tableau 3). Il a été montré que les valeurs obtenues pour la quantification du signal du carbone 14 en présence d'un excès de deux fois plus (Tableau 3A) ou cinq fois plus de tritium (Tableau 3B) restent identiques aux valeurs précédemment mesurées au sein d'un mélange stœchiométrique (Tableau 2C) ou pour l'isotope seul (Tableau 2B).

A		Théorique (nCi)		Expérimental (nCi)	
$^3\text{H}$	$^{14}\text{C}$	$^3\text{H}$	$^{14}\text{C}$	$^3\text{H}$	$^{14}\text{C}$
10	5	9,68	4,76		
1	0,5	0,96	0,46		
0,5	0,25	0,48	0,24		

B		Théorique (nCi)		Expérimental (nCi)	
$^3\text{H}$	$^{14}\text{C}$	$^3\text{H}$	$^{14}\text{C}$	$^3\text{H}$	$^{14}\text{C}$
25	5	23,02	4,82		
2,5	0,5	2,30	0,48		
1,25	0,25	1,23	0,25		

Tableau 3 - Comptage par scintillation liquide de la radioactivité du tritium et du carbone 14 à l'aide d'un protocole dual. (A) En présence de deux fois plus de tritium que de carbone 14. (B) En présence de cinq fois plus de tritium que de carbone 14.

L'ensemble de ces résultats a ainsi permis de montrer que ce protocole permet de discriminer et de quantifier avec précision les deux isotopes en s'affranchissant des interférences de

mesure causées par le recouvrement des spectres d'émissions, et ce quel que soit le ratio entre les deux éléments. C'est pourquoi, ce protocole de comptage sera utilisé pour la suite du projet.

### **1.1.3 L'évaluation du quenching induit par les milieux biologiques**

Le quenching est la diminution du signal de comptage causée par les caractéristiques et les composants de l'échantillon. En scintillation liquide, les quencheurs sont généralement divisés en deux catégories : les quencheurs chimiques et les quencheurs colorés. Les quencheurs chimiques peuvent être n'importe quelle molécule présente dans le milieu qui absorbe l'énergie radioactive avant qu'elle ne soit convertie en lumière. Par conséquent, ces quencheurs réduisent le nombre de photons générés par chaque particule  $\beta$ . Différemment, les quencheurs colorés absorbent la lumière dans la gamme de longueur d'onde émise par la molécule scintillante. Dans ce cas, le nombre de photons émis n'est pas modifié, mais la quantité atteignant le tube photomultiplicateur est réduite. À cet égard, le sang est à la fois un quenseur chimique par sa composition riche en protéines, en globules et en plaquettes mais aussi un quenseur coloré par sa couleur rouge.

Dans le but d'évaluer la part d'extinction du signal causée par le sang, différentes quantités des deux isotopes ont été mélangées à du sang de souris puis quantifiées à l'aide du protocole décrit ci-dessus. De la même façon, les mêmes quantités de radioactivité ont été quantifiées en étant diluées dans une solution d'éthanol à 30% dans l'eau ne causant aucun quenching sur la mesure par scintillation liquide (Tableau 4). L'ensemble des mesures ont été réalisées à partir de 5  $\mu$ L d'échantillon dilués dans 5 mL de liquide scintillant. L'utilisation d'un petit volume d'échantillon permet d'une part de limiter les effets de quenching pouvant être causés par le sang, et d'autre part de se placer dans des conditions compatibles avec l'analyse d'échantillons sanguins prélevés chez la souris. En effet, afin de ne pas mettre en danger la santé de l'animal, seuls des petits volumes de sang peuvent être prélevés à chaque temps d'une étude pharmacocinétique.

A		Théorique (nCi)		Ethanol 30% (nCi)		Sang (nCi)		Quenching
<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>3</sup> H
5	0	4,85	0,02	3,71	0	24%		
0,5	0	0,46	0	0,33	0	28%		
0,25	0	0,24	0	0,18	0	25%		

B		Théorique (nCi)		Ethanol 30% (nCi)		Sang (nCi)		Quenching
<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>14</sup> C
0	5	0,04	4,71	0	4,29	9%		
0	0,5	0	0,43	0	0,38	14%		
0	0,25	0	0,23	0	0,21	8%		

Tableau 4 – Détermination du taux de quenching du comptage par scintillation liquide de la radioactivité du tritium et du carbone 14 dans le sang à l'aide d'un protocole dual. (A) Solutions de tritium. (B) Solutions de carbone 14.

Expérimentalement, il a été montré que la présence de sang dans l'échantillon à quantifier entraîne une extinction du signal des deux isotopes. Cependant, le phénomène de quenching n'est pas équivalent pour les deux radioéléments : tandis que la quantification du carbone 14 est réduite de 8% à 14%, on observe une perte de signal allant de 24% à 28% pour le tritium (Tableau 4). La dilution du sang d'un facteur mille dans le liquide scintillant entraîne tout de même une extinction d'environ un quart de l'émission du tritium, ce qui en fait un puissant quencheur des rayonnements de faible énergie. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que l'émission de la molécule scintillante a lieu dans la région bleue du spectre, l'ordre de sévérité du quenching des couleurs est donc : rouge > orange > jaune > vert > bleu, faisant ainsi du sang un puissant quencheur coloré.

Un facteur correctif peut être calculé pour chaque radioisotope afin de s'affranchir de l'extinction de signal causé par le milieu biologique. Dans le cas du carbone 14 introduit sans dilution isotopique, les quantités de 5 nCi ; 0,5 nCi et 0,25 nCi correspondent respectivement à la quantification de 5 µL de sang aux concentrations où l'on retrouve 100% ; 10% et 5% de la dose injectée en circulation. Pour cette gamme de concentration, on calcule un quenching moyen de 10,3% (Tableau 4), soit un facteur correctif de 1,12 à appliquer aux valeurs du carbone 14 mesurées par scintillation liquide. Dans le cas du tritium, pour lequel la dilution isotopique à appliquer n'a pas encore été définie, le pourcentage d'extinction du signal

lumineux par l'échantillon biologique a été évalué sur une plus grande gamme de quantité de radioactivité (Tableau 5). Un quenching moyen de 23,9% a été calculé pour une gamme de radioactivité allant de 0,25 nCi à 25 nCi ; soit un facteur correctif de 1,31 à appliquer aux valeurs du tritium mesurées par scintillation liquide.

<b>Théorique (nCi)</b>	<b>25</b>	<b>20</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>
<b>Ethanol 30% (nCi)</b>	24,62	20,50	14,89	9,49	4,85	0,46	0,24
<b>Sang (nCi)</b>	18,34	16,12	11,51	7,36	3,71	0,33	0,18
<b>Quenching</b>	26%	21%	23%	22%	24%	28%	25%

*Tableau 5 - Détermination du taux de quenching du comptage par scintillation liquide de la radioactivité du tritium dans le sang à l'aide d'un protocole dual.*

Nous avons donc montré que la méthode de quantification duale par scintillation liquide permet de discriminer et de quantifier avec précision les deux radioéléments en mélange jusqu'à un ratio 5/1 en faveur du tritium. De plus, le taux d'extinction du signal du tritium est constant sur une gamme de quantité de radioactivité allant jusqu'à 25 nCi, soit jusqu'à la quantification de 5 µL de sang à la concentration où l'on retrouve 100% de la dose injectée en circulation pour un ratio 5/1 en faveur du tritium. Par conséquent, il est possible d'envisager travailler avec des conjugués incorporant jusqu'à cinq fois plus de tritium que de carbone 14 si cela est nécessaire.

#### **1.1.4 La détermination de la limite de quantification dans le sang**

L'ensemble des résultats précédents ayant permis de définir la quantité maximale de tritium qu'il est possible d'incorporer au sein de la structure moléculaire des ADC, c'est ensuite la détermination de la limite de quantification du tritium dans le sang qui a permis de fixer la quantité minimale à utiliser. Le compteur à scintillation mesure une quantité de radioactivité en nombre de désintégrations par minute (dpm). La mesure d'un volume de 5 µL de sang dilué dans 5 mL de liquide scintillant donne une valeur de bruit de fond moyen de 20 dpm et 80 dpm pour le carbone 14 et le tritium respectivement. Nous avons choisi de fixer le seuil de

limite de quantification à dix fois le bruit de fond, soit 200 dpm pour le carbone 14 et 800 dpm pour le tritium correspondant respectivement à des quantités de radioactivité de 90 pCi et 360 pCi. En souhaitant pouvoir suivre jusqu'à 5% de la dose injectée en circulation, la quantité de radioactivité minimale à injecter est de 432 nCi en carbone 14 et 1,7 µCi en tritium pour une souris d'à peu près 20 grammes.

Ainsi, l'introduction du tag  $^{14}\text{C}$  telle qu'elle a été définie précédemment sans dilution isotopique correspond à l'injection d'une dose de 1,2 µCi de carbone 14 par souris ; ce qui se situe bien au-dessus de la dose minimale. En revanche, la limite de quantification du tritium étant plus élevée, la quantité minimale a été fixée à 1,7 µCi par souris ; soit un ratio minimal de 1,4/1 en faveur du tritium.

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus a permis de mettre en place les conditions de quantification duale du tritium et du carbone 14 dans le sang par scintillation liquide :

1. Afin de s'affranchir de la surestimation de la quantité des deux isotopes causée par le phénomène de recouvrement des spectres d'émission, il est indispensable d'utiliser un protocole qui mesure simultanément sur deux canaux.
2. La quantification dans le sang induit une extinction du signal qui nécessite la correction des valeurs mesurées par un facteur 1,31 et 1,12 pour le tritium et le carbone 14 respectivement pour un échantillon de 5 µL de sang dilué dans 5 mL de liquide scintillant.
3. Un ratio minimal  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  de 1,4/1 est à utiliser pour pouvoir quantifier jusqu'à environ 5% de la dose circulante. Ce même ratio peut être augmenté jusqu'à 5/1 sans que l'excès de tritium ne perturbe la mesure du carbone 14.

## 1.2 LA DOUBLE DÉTECTION PAR AUTORADIOGRAPHIE DIGITALE

L'autoradiographie digitale est une technique largement utilisée pour la quantification de la radioactivité des radioisotopes  $\beta$  sur des coupes de tissus dans le but d'obtenir des données quantitatives *in vivo*. La radio-imagerie digitale a la capacité de différencier plusieurs isotopes

au sein d'un échantillon biologique lorsque ces derniers possèdent des propriétés différentes en termes d'énergie d'émission de la particule, ou de période de décroissance radioactive.

Dans ce contexte, différentes quantités connues de tritium et de carbone 14 seules ou en mélange ont été déposées sur une membrane pour être analysées par autoradiographie à l'aide du BetaIMAGER™ (Figure 3). Dans un premier temps, l'acquisition par radio-imagerie enregistre les signaux cumulés des deux radioéléments (Figure 3A). Dans un second temps, à l'aide d'un logiciel de traitement des images, chaque élément de désintégration a été attribué à l'isotope émetteur. Pour cela, des références contenant les isotopes purs ont été utilisées pour définir les critères lumineux de chacun (surface, intensité lumineuse, ellipticité), et un algorithme de reconnaissance de ces caractéristiques a ensuite été utilisé pour déconvoluer le signal (Figure 3B). Pour les isotopes de faible énergie comme le tritium, les spots lumineux ont un contour bien défini, tandis que les isotopes de plus haute énergie comme le carbone 14 se présentent sous la forme de tâches plus diffuses. La superposition des deux signaux isolés a permis de visualiser la localisation de chaque isotope et d'estimer leur proportion relative (Figure 3C). Nous avons ainsi montré que la présence d'un excès jusqu'à cinq fois supérieur d'un isotope par rapport à l'autre ne crée pas d'interférence sur la déconvolution des deux signaux.

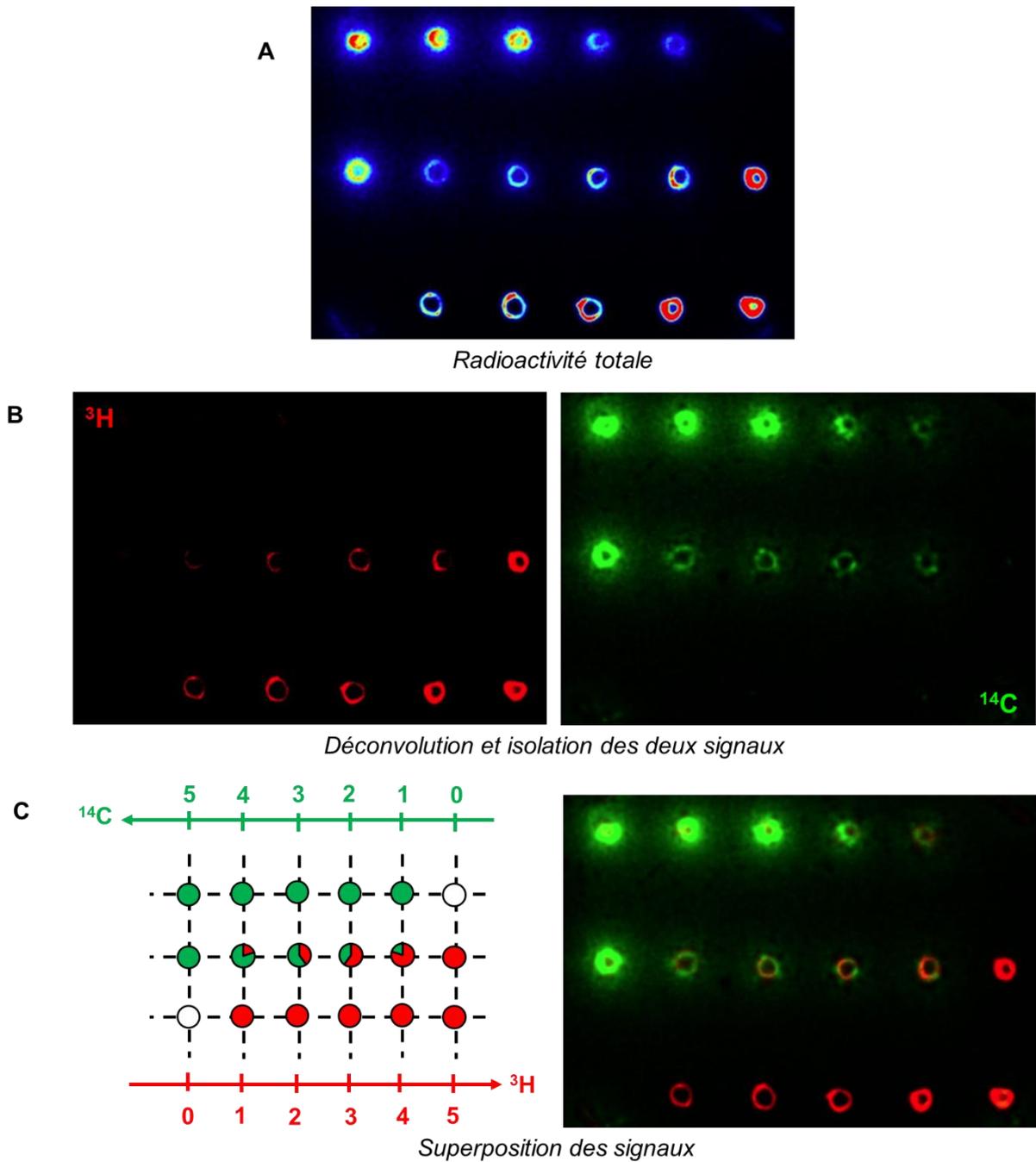


Figure 3 – L'autoradiographie digitale permet d'imager les émissions propres à chacun des radioisotopes. (A) Imagerie de la radioactivité totale. (B) L'algorithme de déconvolution permet l'isolation du signal propre à chaque isotope. (C) La superposition des signaux isolés permet la localisation de chacun des isotopes.

L'ensemble des résultats obtenus lors de la mise au point de la double détection par scintillation liquide et par autoradiographie digitale a montré qu'un ratio  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  compris entre 1,4/1 et 5/1 peut être incorporé au sein de la structure moléculaire des ADC pour leur évaluation *in vivo*.

## 2 LA PREUVE DE CONCEPT DE LA DOUBLE DÉTECTION EX VIVO

---

La mise au point des méthodes de double détection par scintillation liquide et par autoradiographie digitale ayant été faite *in vitro* en mélangeant différentes quantités des deux isotopes, il s'agit ensuite de faire la preuve de concept du suivi et de la quantification des ADC doublement marqués *ex vivo* par l'analyse de prélèvements sanguins et de tissus biologiques.

### 2.1 LES OBJETS SÉLECTIONNÉS POUR L'ÉTUDE

Avant d'analyser la pharmacocinétique et la biodistribution d'un ADC doublement marqué, des objets mono-marqués ont été évalués *in vivo* (Figure 4). Dans un premier temps, c'est le tag **7b** marqué au tritium qui a été conjugué au Fab3A2 sur la position HC-Lys105 (Figure 4A). Il a été considéré que l'introduction de ce tag peptidique de petite taille ne changerait pas le comportement du Fab3A2 en circulation d'une manière significative. Cette première expérience permet la détermination du profil pharmacocinétique du Fab3A2 non-conjugué qui servira de référence pour la suite du projet. Dans un deuxième temps, c'est le Fab3A2 marqué au carbone 14 selon l'approche chémo-enzymatique sur le résidu HC-Lys105 avec le substrat azido **40** et la molécule DBCO marquée **39b** qui sera évalué (Figure 4B). Cette deuxième construction, où seule la nature de la molécule conjuguée diffère de la première, permettra d'évaluer l'impact de la conjugaison de la molécule marquée au  $^{14}\text{C}$  sur le comportement du Fab. Enfin, dans un dernier temps, le suivi de l'ADC doublement marqué incorporant le tag  $^{14}\text{C}$  et le linker-cytotoxique MMAE tritié **16b** sera réalisé (Figure 4C). C'est le conjugué stable obtenu par l'approche de double conjugaison enzymatique qui a été choisi pour faire la preuve de concept de la double détection (voir chapitre 4, section 2.3). En effet, il a été présumé que cette construction incorporant deux liaisons peptidiques et un linker non-clivable soit stable en circulation pour nous permettre de suivre un objet intact au cours du temps.

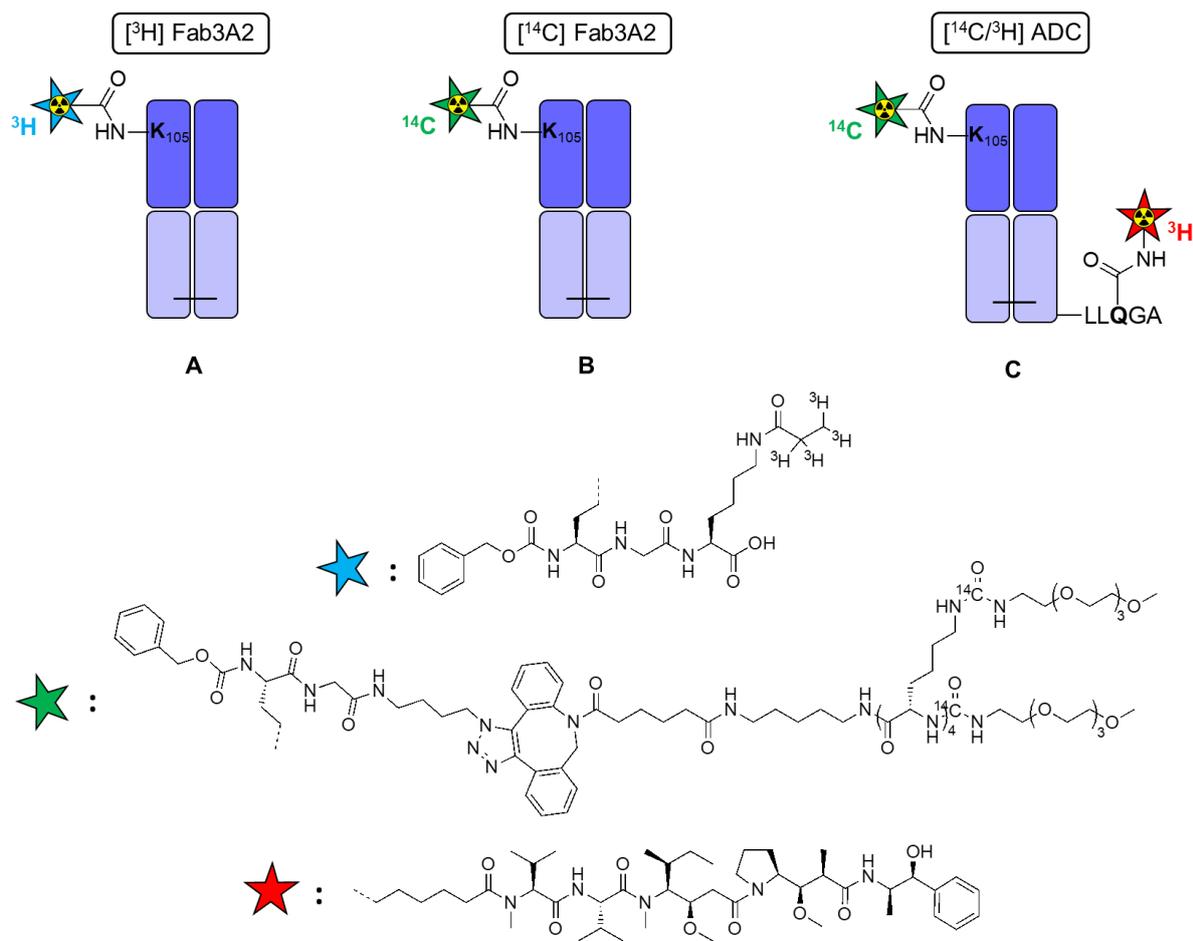


Figure 4 - Structure des objets radiomarqués qui ont été évalués *in vivo*. (A) Le Fab3A2 marqué au tritium. (B) Le Fab3A2 marqué au carbone 14. (C) L'ADC doublement marqué  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ .

## 2.2 L'ÉTUDE PHARMACOCINÉTIQUE

Chacun des objets marqués a été injecté à une dose de 10 mg/kg à trois souris de type BALB/c par voie intraveineuse. La pharmacocinétique a été suivie pendant 24 heures en prélevant un échantillon sanguin à 5 min ; 15 min ; 30 min ; 45 min ; 1 h ; 2 h ; 6 h et 24 h. Pour chaque temps, 5  $\mu\text{L}$  de chaque prélèvement sanguin ont été dilués dans 5 mL de liquide scintillant avant d'être analysés par scintillation liquide en suivant le protocole de comptage établi précédemment. Les valeurs expérimentales obtenues ont ensuite été réajustées à l'aide des facteurs correctifs préalablement déterminés pour tenir compte de l'extinction de signal causé par le sang.

## 2.2.1 La pharmacocinétique du Fab3A2

Le profil pharmacocinétique expérimental du Fab3A2 tritié (Figure 5) est conforme à ce qui a été décrit pour d'autres fragments Fab. En effet, plusieurs groupes de recherche ont décrit que ces fragments d'anticorps sont éliminés de la circulation avec des demi-vies inférieures à une heure<sup>342,343</sup>. De plus, il a été constaté que la conjugaison de la molécule marquée au carbone 14 ne semble pas influencer d'une manière significative le comportement du Fab en circulation. Effectivement, il a été observé que le profil pharmacocinétique du Fab3A2 marqué au <sup>14</sup>C suit une décroissance parallèle à celle du Fab3A2 tritié (Figure 5). Bien que la conjugaison covalente de PEG à la surface de fragments Fab ait été décrite comme une technique permettant d'allonger leur demi-vie in vivo<sup>344</sup>, les PEG utilisés ici sont vraisemblablement trop courts pour modifier significativement les temps de circulation du Fab.

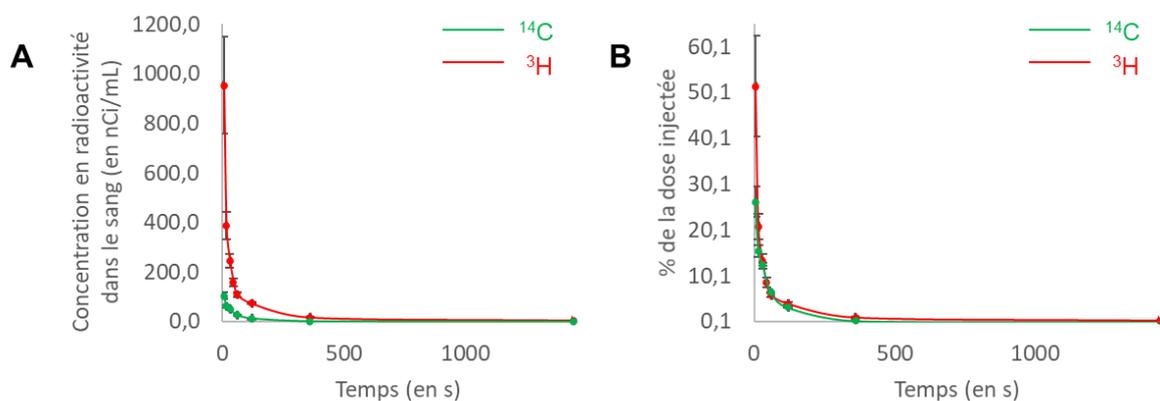


Figure 5 - Profils pharmacocinétique du Fab3A2 marqué au tritium et au carbone 14. (A) Représentation de la concentration en radioactivité en fonction du temps. (B) Représentation du pourcentage de dose injectée en fonction du temps.

<sup>342</sup> Chapman, A. P. et al. Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half-lives. *Nat. Biotechnol.* **17**, 780–783 (1999).

<sup>343</sup> Baer, M. et al. An engineered human antibody fab fragment specific for pseudomonas aeruginosa PcrV antigen has potent antibacterial activity. *Infect. Immun.* **77**, 1083–1090 (2009).

<sup>344</sup> Chapman, A. P. PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: A review. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 531–545 (2002).

On notera cependant que, bien que la quantité minimale de carbone 14 injectable ait été préalablement définie à 432 nCi/souris, la quantité qui a été injectée dans cette étude (750 nCi/souris) est un peu faible pour obtenir une quantification fiable. Ainsi, pour la suite du projet, une quantité de carbone 14 supérieure à 1 µCi/souris sera systématiquement injectée.

### **2.2.2 La pharmacocinétique d'un ADC doublement marqué**

L'étude pharmacocinétique de l'ADC doublement marqué incorporant un ratio  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  d'environ 2/1 a permis de faire la preuve de concept du suivi des deux composants du conjugué indépendamment l'un de l'autre (Figure 6). En effet, le Fab et le cytotoxique en circulation ont pu être quantifiés au cours du temps *via* la mesure de la concentration sanguine de la radioactivité du carbone 14 et du tritium respectivement (Figure 6A). Le ratio 2/1 en faveur du tritium introduit sur le conjugué est effectivement retrouvé sur le profil de décroissance de la radioactivité dans le sang, où l'on observe un facteur 2,3 entre les courbes du tritium et du carbone 14 (Figure 6A). De plus, en rapportant la concentration en radioactivité à un pourcentage de la dose injectée, on constate une superposition des deux isotopes ; ce qui montre un comportement similaire pour le composant Fab et le cytotoxique (Figure 6B). Ce résultat permet de confirmer la stabilité qui avait été présumée pour l'ADC conjugué via deux liaisons peptidiques et un linker non-clivable entre le Fab et le cytotoxique ; une déconjugaison prématurée du cytotoxique aurait entraîné une élimination plus rapide du tritium par rapport au carbone 14.

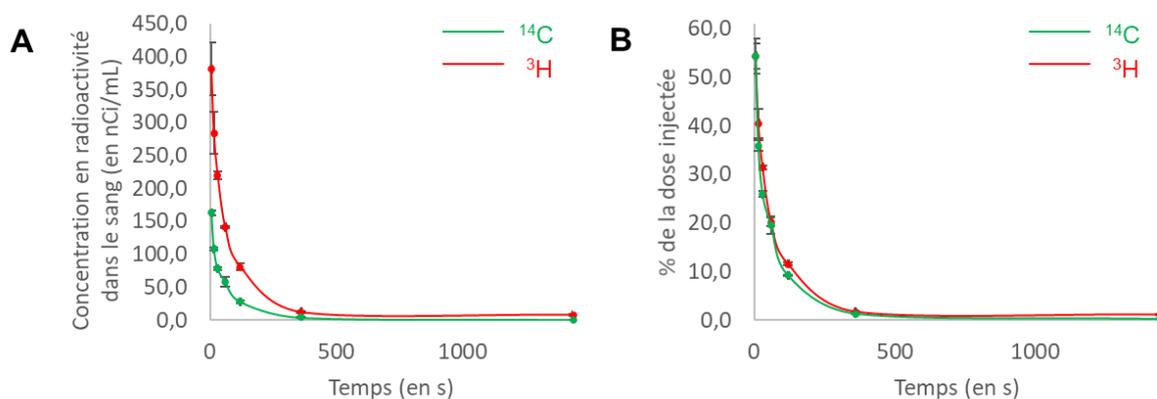


Figure 6 - Profil pharmacocinétique de l'ADC doublement marqué. (A) Représentation de la concentration en radioactivité en fonction du temps. (B) Représentation du pourcentage de dose injectée en fonction du temps. Le carbone 14 et le tritium représentent le Fab et le cytotoxique respectivement.

## 2.3 L'ÉTUDE DE LA BIODISTRIBUTION

À l'issue des 24 heures après l'injection durant lesquelles la pharmacocinétique a été suivie, les animaux ont été sacrifiés et perfusés avec une solution de NaCl à 0,9% pour éliminer la fraction sanguine, et les principaux organes (cœur, poumons, reins, foie, rate et cerveau) ont été prélevés pour évaluer la biodistribution du Fab3A2 et de l'ADC doublement marqué.

Étant donné que le poids moléculaire des Fabs est d'environ 50 kDa, ces derniers sont principalement filtrés par les reins et éliminés dans les urines<sup>345</sup>. Ainsi, il a été supposé que de la radioactivité pourrait être imagée dans les reins des souris sacrifiées 24 heures après l'injection. Par conséquent, dans le but de pouvoir faire la preuve de concept de la discrimination des deux radioisotopes par autoradiographie digitale sur coupe de tissus, des sections de reins d'une épaisseur standard de 20  $\mu\text{m}$  ont été coupées. Ces coupes de rein issues des trois études de pharmacocinétique ont été imagées simultanément pour pouvoir utiliser les Fab3A2 distinctement marqués au  $^3\text{H}$  ou au  $^{14}\text{C}$  comme référence d'isotope pur pour la déconvolution du signal de l'ADC doublement marqué (Figure 7).

<sup>345</sup> Xenaki, K. T., Oliveira, S. & van Bergen en Henegouwen, P. M. P. Antibody or antibody fragments: Implications for molecular imaging and targeted therapy of solid tumors. *Front. Immunol.* **8**, (2017).

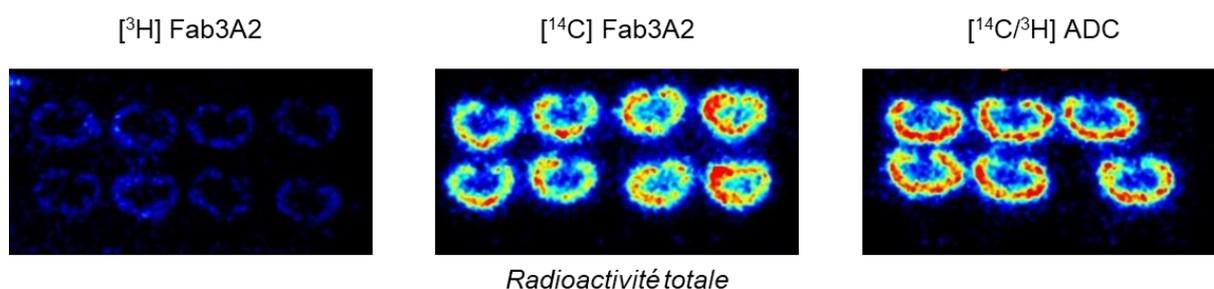


Figure 7 - Autoradiographie de coupes de reins (20 µm) prélevés 24 heures après l'injection montrant la radioactivité totale présente dans l'organe.

L'image de la radioactivité totale additionnant les signaux des deux radioisotopes montre une accumulation du Fab3A2 et de l'ADC dans le cortex rénal (Figure 7). Toutefois, on observe un signal beaucoup moins intense provenant des coupes de reins qui contiennent le Fab3A2 marqué au tritium, que de celles incluant le Fab3A2 marqué au carbone 14 ou de l'ADC doublement marqué. Ici et contrairement aux tests préliminaires de double détection réalisés sur un dépôt très fin, les coupes de tissus ont une certaine épaisseur (20 µm) qu'il semble nécessaire de prendre en compte pour la quantification des deux radioéléments. Le tritium étant un émetteur de faible énergie, la portée moyenne de son émission bêta au sein d'un tissu biologique est de 0,54 µm, contrairement au carbone 14 dont l'émission de plus haute énergie à une portée bien plus grande. Ainsi, sur les coupes de rein d'une épaisseur de 20 µm, le tritium est imagé uniquement sur les 0,54 premiers micromètres, tandis que le carbone 14 est détectable sur l'ensemble de l'échantillon. De cette façon, le BetaIMAGER™ détecte 37 fois plus de  $^{14}\text{C}$  que de  $^3\text{H}$  lorsque ces derniers sont en quantité stœchiométrique. Dans ces expériences préliminaires, le ratio  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  fixé à 2/1, correspondait à un facteur 18,5 en faveur du carbone 14 pouvant expliquer la différence d'intensité observée lors de l'acquisition.

L'inconvénient majeur du BetaIMAGER™ est la perte de sensibilité de détection pour les émissions de faibles intensités lorsque l'acquisition est faite en présence de quantités importantes de radioactivité. En effet, lorsque l'appareil détecte une forte émission radioactive, l'acquisition va se focaliser sur cette partie de l'échantillon au détriment des autres zones où la quantité de radioactivité est plus faible. De plus, dans cette situation, il est difficile de prolonger la durée de l'acquisition pour augmenter la sensibilité de détection sans risquer la formation de points chauds pouvant endommager l'appareil. A cet égard, lors de l'analyse

par autoradiographie des coupes de reins, les émissions du carbone 14 ont totalement occulté le signal du tritium, et aucune déconvolution du signal tritium n'a pu être réalisée (Figure 8).

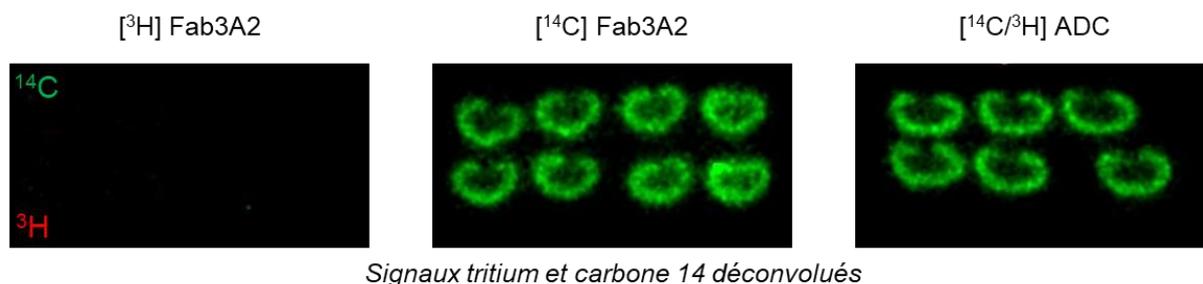


Figure 8 – En présence d'une trop grande quantité d'émission du carbone 14, le signal du tritium de plus faible énergie est occulté.

Plusieurs paramètres peuvent être optimisés afin de permettre la détection du tritium en présence de carbone 14. La première possibilité nécessite de faire varier la quantité de radioactivité incorporée à la structure moléculaire de l'ADC en diminuant la proportion de carbone 14 ou en augmentant celle du tritium. La seconde alternative consiste à abaisser l'épaisseur des coupes d'organes pour réduire la quantité de carbone 14 détectable sans modifier le ratio des isotopes. Cette seconde alternative a pu être regardée à partir des deuxièmes reins prélevés chez les souris auxquelles les composés marqués ont été injectés.

Il a été ainsi possible d'obtenir des coupes d'organes de 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Théoriquement, dans ces conditions, le facteur 18,5 en faveur du carbone 14 est abaissé à 6,5. Expérimentalement, l'analyse de ces nouvelles coupes de rein par autoradiographie a permis de diminuer significativement la quantité d'émission du carbone 14 et par conséquent, de prolonger la durée de l'acquisition sur le BetaIMAGER™, permettant d'obtenir un signal tritium exploitable. Le traitement des données d'autoradiographie à l'aide de l'algorithme de déconvolution a permis d'extraire deux signaux distincts attribuables aux deux isotopes, et dont la superposition correspond à l'image théorique de la localisation du tritium et du carbone 14 (Figure 9). De plus, l'intégration en nombre de coups par minutes (cpm) du signal pour chaque coupe de rein contenant l'ADC doublement marqué permet d'obtenir une quantification relative moyenne des deux isotopes. Expérimentalement, on a mesuré 1,89 fois plus de tritium que de carbone 14 ; ce qui est en accord avec le ratio théorique  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  fixé à 2/1.

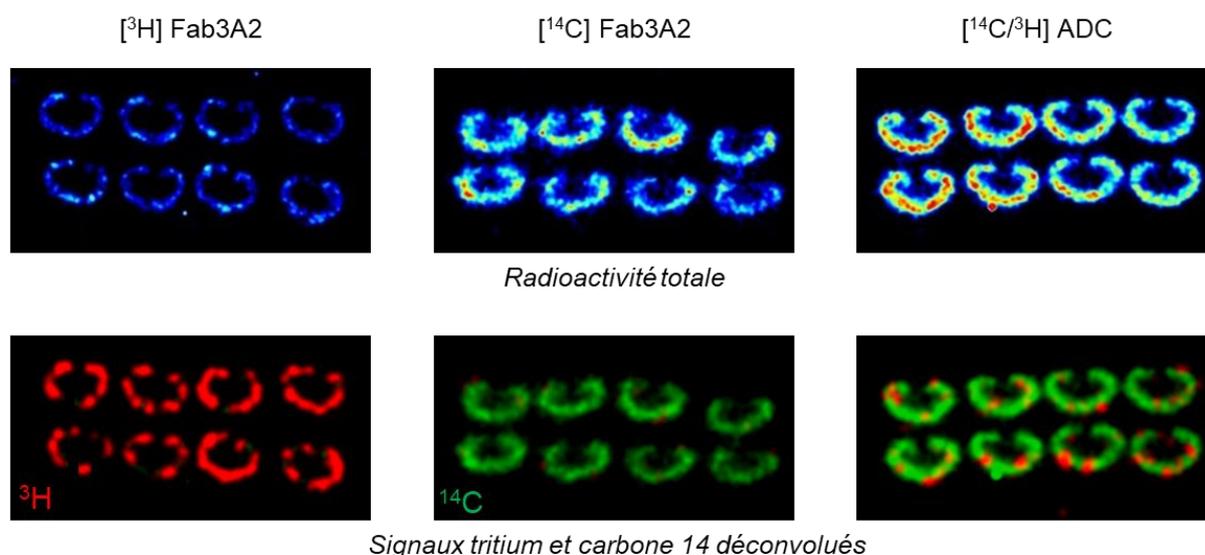


Figure 9 - Autoradiographie de coupes de reins (7 μm) prélevés 24 heures après l'injection montrant la présence des deux radioisotopes.

Cette série d'expérience a permis de faire la preuve de concept de la double détection par autoradiographie digitale sur des coupes de tissus biologiques. En outre, les conditions expérimentales nécessaires ont été mise en place, et pour la suite du projet, l'ensemble des organes seront coupés sur 7 μm d'épaisseur, et le ratio des isotopes sera maintenu à au moins 1,4/1 en faveur du tritium.

### 3 L'ÉVALUATION DES ADC DANS LE MODÈLE TUMORAL 4T1

#### 3.1 LE MODÈLE DE CARCINOME MAMMAIRE 4T1

Le carcinome mammaire 4T1 est une lignée cellulaire tumorale transplantable qui peut être développée *in vivo* comme une tumeur primaire chez les souris BALB/c femelles<sup>346,347</sup>. La

<sup>346</sup> Paschall, A. V. An Orthotopic Mouse Model of Spontaneous Breast Cancer Metastasis 2 . Live Mouse Bioluminescence Imaging of Tumor Growth. *J. Vis. Exp.* **114**, 1–7 (2016).

<sup>347</sup> Miller, F. & Care, A. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Curr. Protoc. Immunol.* **20.2.4**, (2000).

tumeur 4T1 présente plusieurs caractéristiques qui en font un modèle expérimental approprié du cancer du sein chez l'homme. Premièrement, les cellules tumorales sont facilement transplantables en sous-cutanée dans la glande mammaire abdominale de sorte que la tumeur primaire se développe dans le site anatomique adéquat. Deuxièmement, comme pour le cancer du sein humain, une prolifération métastatique du carcinome mammaire 4T1 se développe spontanément à partir de la tumeur primaire. De plus, la propagation progressive des métastases 4T1 à de multiples sites distants incluant les ganglions lymphatiques, le sang, le foie, les poumons, le cerveau et les os est très similaire à celle du cancer du sein humain. Enfin, dans le cadre de ce projet, le modèle tumoral 4T1 est particulièrement intéressant car il surexprime la métalloprotéase MMP-14 contre laquelle est dirigé l'anticorps 3A2. En effet, l'équipe de Xin Ge a mis en évidence le potentiel thérapeutique de l'anticorps 3A2 en montrant sa capacité à inhiber la croissance de la tumeur primaire, mais surtout à réduire significativement la prolifération métastatique dans un modèle de carcinome mammaire 4T1<sup>348</sup>. Bien que, dans le cadre de ce projet, le potentiel thérapeutique des ADC incorporant le Fab3A2 ne sera pas évalué, nous avons jugé intéressant d'imager leur biodistribution à la tumeur dans ce modèle animal.

### 3.2 L'ÉTUDE DE LA STABILITÉ DES CONJUGUÉS

Dans le but de sélectionner les objets qui seront évalués dans le modèle animal, nous avons réalisé des expériences préliminaires visant à déterminer le comportement des conjugués en circulation et au sein de la tumeur 4T1. Pour cela, six ADC incorporant le cytotoxique tritié MMAE conjugué via différentes méthodes et positions de conjugaison et présentant un linker clivable ou non-clivable ont été synthétisés (Figure 10).

---

<sup>348</sup> Remacle, A. G. et al. Selective function-blocking monoclonal human antibody highlights the important role of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in metastasis. *Oncotarget* **8**, 2781–2799 (2017).

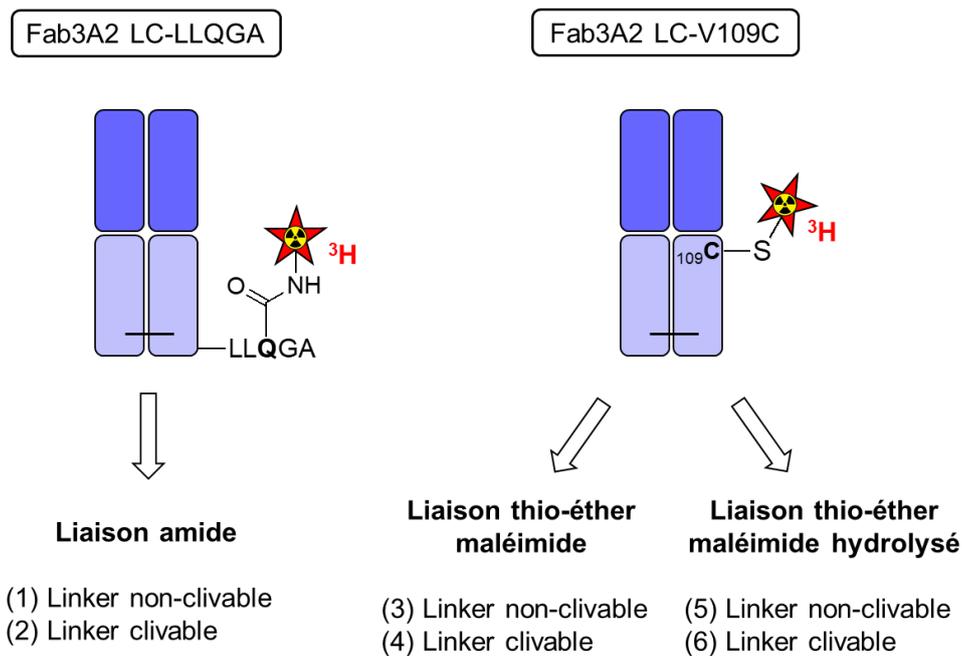


Figure 10 - Structure générale des six conjugués dont la stabilité a été évaluée.

### 3.2.1 La stabilité dans le plasma

Dans un premier temps, nous avons évalué le comportement de ces conjugués en circulation en estimant leur stabilité dans du plasma de souris. Pour cela, chacun des ADC marqué au tritium a été dilué dans du plasma à une concentration finale de 1  $\mu\text{M}$  ; ce qui équivaut à la concentration plasmatique obtenue in vivo lorsque 50% de la dose injectée reste en circulation. Les solutions ont été incubées à 37°C, et compte tenu du profil pharmacocinétique du Fab3A2, des échantillons ont été prélevés à 30 min ; 1 h ; 2 h ; 4 h et 6 h. Les différentes séries d'échantillons ont été déposées et laissées migrer sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE en condition non-réductrice puis transférées sur une membrane de type PVDF (polyfluorure de vinylidène) qui a été révélée par autoradiographie digitale (Figure 11).

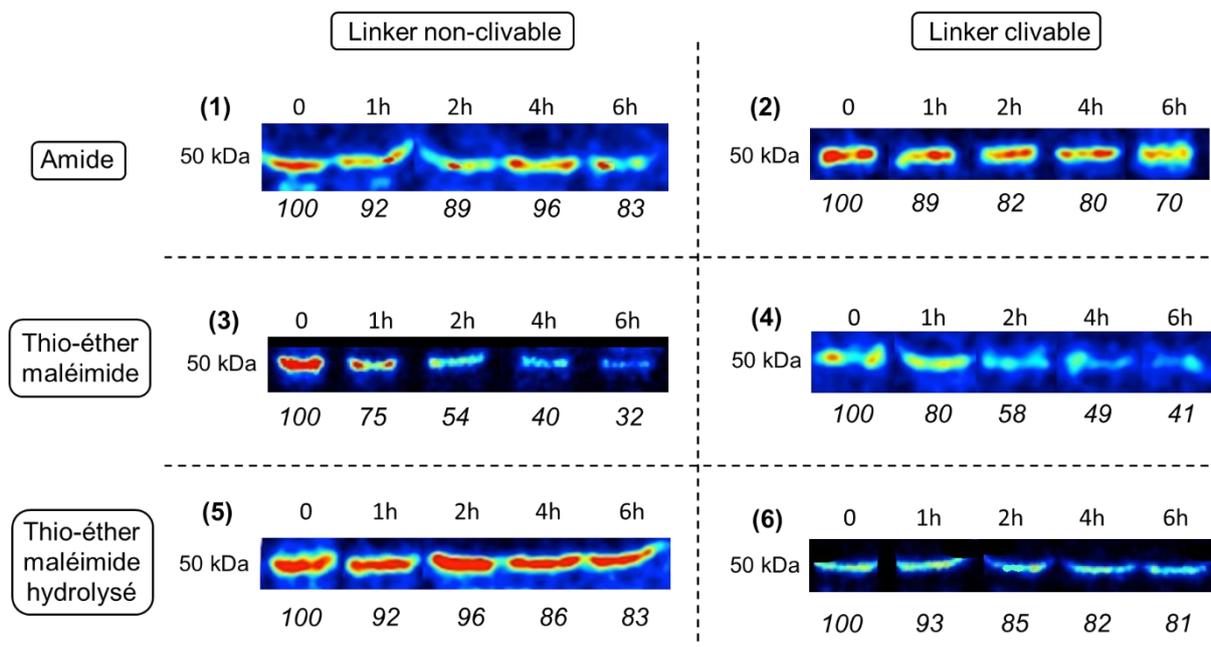


Figure 11 - Suivi de la stabilité dans le plasma des différents ADC portant la MMAE marquée au tritium par gel SDS-PAGE révélé par autoradiographie.

L'ADC radiomarqué donne une bande visible autour de 50 kDa, dont l'intensité permet d'estimer la proportion relative du conjugué intact au cours du temps. En effet, une perte d'intensité du signal radioactif est associée à la déconjugaison du cytotoxique tritié. L'intégration du signal en nombre de coups par minute pour chaque bande imagée permet d'évaluer de manière qualitative de la stabilité des composés au cours du temps. Cependant, cela ne donne pas l'accès à une quantification exacte en raison de différents paramètres pouvant introduire des variations entre les échantillons, tels que : la migration à l'intérieur du gel, l'efficacité du transfert sur membrane, la forme de la bande à intégrer.

L'ensemble de ces résultats permettent de tirer plusieurs conclusions :

1. L'introduction de la séquence peptidique clivable Val-Ala suivi de l'espaceur auto-immolable PABC entre le Fab et le cytotoxique n'est pas associée à l'observation d'une instabilité des conjugués. Ce linker n'est donc pas sensible aux protéases en circulation.
2. Les liaisons isopeptidiques formées par la BTG entre la fonction carboxamide de la glutamine et une amine primaire sont stables en circulation. Ce résultat est en accord avec l'observation

qui a été faite lors de la preuve de concept de la double détection in vivo : les deux isotopes conjugués par des liaisons peptidiques montraient des profils de décroissance superposables.

3. La déconjugaison par rétro-Michael de la liaison thio-éther maléimide qui a été décrite en présence de thiols circulants au cours du temps<sup>349</sup>, a effectivement été observée lors de l'incubation des conjugués dans le plasma à 37°C. À une concentration de 1 µM, environ 50% de déconjugaison a été observée après 2 heures d'incubation.

4. L'hydrolyse du maléimide par ouverture de cycle permet effectivement de stabiliser la liaison thio-éther et empêche sa déconjugaison au cours du temps.

### 3.2.2 La stabilité dans le broyat tumoral

Dans un second temps, nous avons évalué le comportement des conjugués au sein de l'environnement tumoral. Pour cela, après 15 jours de croissance en sous cutanée, les tumeurs mammaires ont été prélevées chez les souris BALB/c avant d'être broyées à l'aide du broyeur homogénéisateur d'échantillons biologiques Precellys® dans le tampon 10 mM Tris ; 150 mM NaCl ; 1% Triton X-100 et 0,01% Brij à pH=7,5. Le broyat tumoral préparé a été centrifugé pour éliminer les débris tissulaires et obtenir un extrait tumoral quantifié à environ 2 mg/mL en protéines par dosage Bradford. Les deux ADC conjugués par une liaison peptidique incorporant un linker clivable et non-clivable ont été dilués à une concentration finale de 1 µM dans cet extrait tumoral. De la même manière que précédemment, les solutions ont été incubées à 37°C et des prélèvements ont été faits à 30 min ; 1 h ; 2 h ; 4 h ; 6 h et 24 h pour suivre l'évolution de l'échantillon par autoradiographie sur membrane (Figure 12).

---

<sup>349</sup> Wei, C. et al. *Where Did the Linker-Payload Go? A Quantitative Investigation on the Destination of the Released Linker-Payload from an Antibody-Drug Conjugate with a Maleimide Linker in Plasma.* *Anal. Chem.* **88**, 4979–4986 (2016).

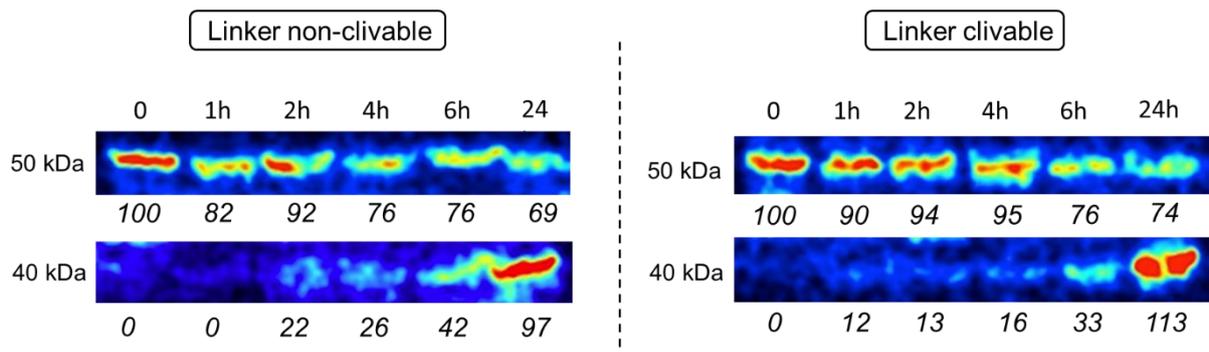


Figure 12 - Suivi de la stabilité dans le broyat tumoral 4T1 d'ADC portant la MMAE marquée au tritium par gel SDS-PAGE révélé par autoradiographie.

Dans le cas du linker clivable, nous avons fait l'hypothèse qu'il puisse y avoir une activité protéolytique au sein du broyat tumoral qui soit capable de libérer le cytotoxique en clivant le dipeptide Val-Ala. Dans ce cas de figure, une perte d'intensité de la bande à 50 kDa correspondant à l'ADC devrait être observée au fur et à mesure de la délivrance MMAE. Expérimentalement, nous avons effectivement observé une perte d'intensité du signal de la bande à 50 kDa, cependant, cette disparition a été accompagnée de l'apparition d'une seconde bande de plus faible poids moléculaire estimée à environ 40 kDa (Figure 12). L'intégration du signal radioactif n'a pas permis pas de quantifier avec précision la quantité de protéines marquées dans chacune des bandes, notamment entre les espèces de différents poids moléculaires qui ne sont pas transférées du gel vers la membrane avec la même efficacité. Néanmoins, un profil similaire a été observé pour l'ADC incorporant un linker non-clivable (Figure 12). L'ensemble de ces résultats suggère que l'ADC a été dégradé par une activité protéolytique conduisant à la bande de plus petit poids moléculaire. En revanche, l'intensité du signal radioactif à 24 h laisse penser que le cytotoxique est toujours lié de manière covalente à la protéine.

Cette protéolyse du Fab3A2 a également été observée et décrite par l'équipe de Xin Ge<sup>350</sup>. Il a en effet montré que, bien que le Fab3A2 soit un inhibiteur de l'activité protéolytique de la MMP-14, celui-ci peut également être clivé après une incubation prolongée en présence de fortes concentrations de la protéase. Il a par ailleurs montré qu'une double mutation en

<sup>350</sup> Lee, K. B., Dunn, Z. & Ge, X. Reducing proteolytic liability of a MMP-14 inhibitory antibody by site-saturation mutagenesis. *Protein Sci.* **28**, 643–653 (2019).

arginine des acides aminés Asn112 et Ala115 localisés au sein du domaine CDR-H3 et faisant vraisemblablement face aux sous-sites S1 et S3' de la MMP14, permet de rendre le Fab résistant à la protéolyse. Dans le cadre de ce projet, nous avons choisi de continuer à travailler avec le Fab3A2 sensible à la protéolyse. Cependant pour poursuivre vers une étude du potentiel thérapeutique des ADC, il serait pertinent d'introduire la double mutation HC-N112R et HC-A115R pour préserver l'intégrité structurale du domaine CDR-H3 nécessaire à l'inhibition de la MMP-14.

### 3.3 L'ÉVALUATION DANS LE MODÈLE TUMORAL 4T1

#### 3.3.1 La sélection de l'objet à évaluer

Lors de la preuve de concept de la double détection et de la double quantification d'un ADC doublement marqué *in vivo*, nous avons fait le choix de suivre un objet stable pour faciliter le processus. Cependant, l'un des avantages majeurs du double marquage d'ADC étant de pouvoir suivre simultanément les deux composants, cela en fait un outil approprié pour l'évaluation de la stabilité des conjugués *in vivo*. Dans ce contexte, nous avons fait le choix d'évaluer dans le modèle tumoral 4T1 un ADC présentant un profil instable *in vitro* et qui pourrait être également mis en évidence *in vivo* via l'utilisation du double marquage. Pour cela, sur la base des profils de stabilité dans le plasma, nous avons sélectionné un ADC pour lequel le cytotoxique MMAE est conjugué sur la LC-Cys109 par une liaison thio-éther maléimide. Le choix a également été fait d'incorporer le dipeptide clivable Val-Ala à la structure de l'ADC afin de pouvoir mettre en évidence la délivrance de la MMAE au sein de la tumeur. De plus, la conjugaison du cytotoxique MMAE via une fonction maléimide et un dipeptide clivable est une combinaison de linker-cytotoxique largement utilisée dans le développement d'ADC<sup>351,352</sup>.

Dans le cadre de l'évaluation *in vivo* des ADC dans le modèle tumoral 4T1, environ 300 000 cellules 4T1 ont été injectées en sous cutanée au niveau de la glande mammaire de souris

---

<sup>351</sup> Amiri-Kordestani, L. et al. FDA approval: Ado-trastuzumab emtansine for the treatment of patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **20**, 4436–4441 (2014).

<sup>352</sup> Deeks, E. D. Polatuzumab Vedotin: First Global Approval. *Drugs* **79**, 1467–1475 (2019).

BALB/c femelles pesant environ 20 g. Le développement tumoral a été suivi pendant une période de 15 jours à l'issue de laquelle les tumeurs avaient atteint un volume jugé suffisant et l'ADC doublement marqué a été injecté.

### **3.3.2 La détermination du profil pharmacocinétique**

Les expériences préliminaires ont permis de déterminer le profil de pharmacocinétique d'un ADC stable, ce qui nous a servi à réadapter les conditions de cette deuxième étude. Pour cela, la pharmacocinétique de ce deuxième ADC a été suivie pendant une période de 6 heures après l'injection en prélevant un échantillon sanguin à 5 min ; 15 min ; 30 min ; 45 min ; 1 h ; 2 h et 6 h. Pour chaque temps, 5 µL de chaque prélèvement sanguin ont été dilués dans 5 mL de liquide scintillant avant d'être analysés par scintillation liquide en suivant le protocole de comptage établi précédemment. Les valeurs expérimentales obtenues ont ensuite été réajustées à l'aide des facteurs correctifs préalablement déterminés pour tenir compte de l'extinction de signal causé par le sang.

Le Fab et le cytotoxique en circulation ont pu être quantifiés au cours du temps *via* la mesure de la concentration sanguine de la radioactivité du carbone 14 et du tritium respectivement (Figure 13A). Le ratio 2/1 en faveur du tritium introduit sur le conjugué a effectivement été retrouvé sur le profil de décroissance de la radioactivité dans le sang. En rapportant la concentration en radioactivité à un pourcentage de la dose injectée (Figure 13B), une évolution dans le temps des profils de décroissance des deux isotopes a été constatée. En effet, pendant la première heure de circulation, nous avons observé des profils superposables. Cependant, à partir de 2 heures de circulation, un début de décrochage des deux courbes a été remarqué. De plus, la superposition de la courbe du carbone 14 avec le profil de pharmacocinétique précédemment obtenu pour l'ADC stable a permis de mettre en évidence la décroissance légèrement plus lente du tritium : 4,8% de la dose injectée à 6 h contre 1,2 % pour le carbone 14.

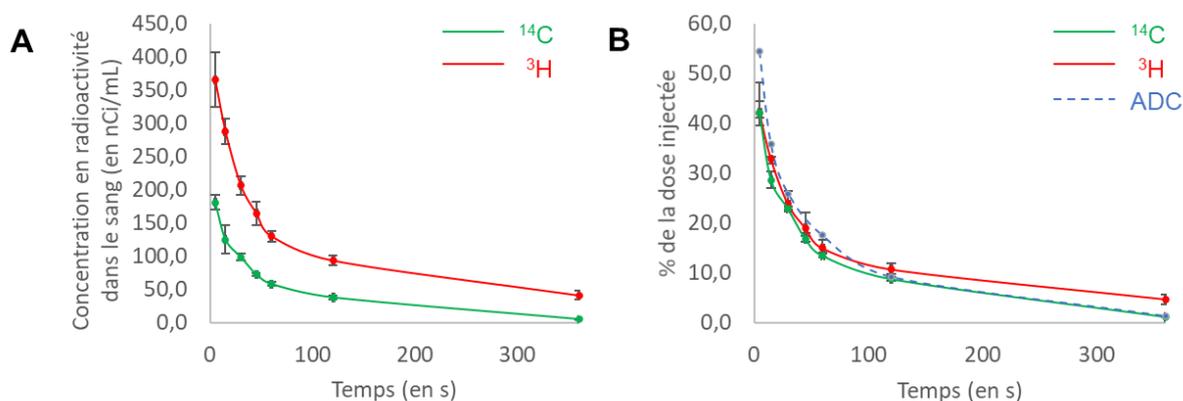


Figure 13 - Profil pharmacocinétique de l'ADC doublement marqué. (A) Représentation de la concentration en radioactivité en fonction du temps. (B) Représentation du pourcentage de dose injectée en fonction du temps. Le carbone 14 et le tritium représentent le Fab et le cytotoxique respectivement.

Ce profil de pharmacocinétique montrant un début de décrochage du signal des deux isotopes peut être interprété comme une instabilité du conjugué. Dans le cas d'une déconjugaison, le linker-cytotoxique libéré suivrait le profil d'élimination d'une petite molécule, qui se caractérise par une élimination plus rapide. Ici, au contraire, nous avons observé un ralentissement de l'élimination du cytotoxique. L'hypothèse qui a été formulée est la suivante : dans la circulation sanguine, l'abondance de sérualbumine entraîne un échange de thiol. Dans cette situation, une partie du linker-cytotoxique a été transférée du Fab à la sérualbumine, conduisant à la formation d'un adduit dont la demi-vie pourrait être augmentée. A cet égard, le signal tritium mesuré en circulation après l'élimination du Fab marqué au carbone 14 correspondrait à la part de linker-cytotoxique qui a été transférée à la sérualbumine. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en comparant le profil de pharmacocinétique de cet ADC à celui du même conjugué dont la liaison thio-éther maléimide aurait été stabilisée après hydrolyse par ouverture de cycle du motif succinimide.

### 3.3.3 L'évaluation de la biodistribution

Dans le cas de l'étude de la biodistribution, le choix a été fait d'appliquer deux temps de sacrifice différents pour imager la distribution à la tumeur au cours du temps. Un premier sacrifice à temps court a été fait à 1 heure lorsqu'environ 15% de la dose injectée est toujours en circulation, tandis que le second lot de souris a été sacrifié à 6 heures, lorsque moins de 5%

de la dose injecté est présente en circulation. Chacun des groupes correspondant à un temps de sacrifice était composé de quatre animaux qui ont été répartis de la façon suivante : trois animaux ont été sacrifiés puis perfusés pour éliminer le sang, et les principaux organes (cœur, poumons, reins, foie, rate et cerveau) ont été prélevés pour être coupés sur une épaisseur de 7  $\mu\text{m}$  et imagés individuellement, tandis que la quatrième souris a été coupée transversalement pour faire de l'imagerie sur corps entier.

### *3.3.3.1 L'imagerie sur corps entier*

Dans un premier temps, l'imagerie sur corps entier a été réalisée pour visualiser le profil général de biodistribution de l'ADC. Il s'agit d'une analyse préliminaire permettant d'estimer l'accumulation de l'ADC au sein de la tumeur et des tissus sains au cours du temps. Pour cela, l'acquisition au BetaIMAGER™ mesure la radioactivité totale émise par les deux radioéléments simultanément dans l'ensemble des organes (Figure 14). Globalement, il a été observé que le conjugué est présent principalement dans le tissu cible, et dans les organes d'élimination. En effet, le profil de biodistribution de l'ADC montre une accumulation dans la tumeur et dans les reins aux deux temps de sacrifice, ainsi que dans les intestins 6 heures après l'injection. Visuellement, nous avons estimé une plus grande quantité de radioactivité dans la tumeur chez l'animal sacrifié à 1 h. Cependant, il est important de noter que les animaux utilisés pour l'imagerie corps entier n'ont pas été perfusés. Ainsi la quantité de radioactivité qui est mesurée est la somme de la contribution de la radioactivité circulante dans le sang et de celle distribuée dans les tissus. C'est pourquoi, aucune quantification précise n'a pu être faite étant donné que 15% de la dose injectée était toujours en circulation à 1 heure contre environ 1% après 6 heures. Néanmoins, la présence plus importante de l'ADC sur l'analyse à temps court peut être interprétée de la manière suivante : une quantité importante d'ADC s'accumule dans la tumeur durant les premiers temps après l'injection, et cette dernière se décharge ensuite au cours du temps. L'accumulation dans la tumeur est principalement due à un ciblage passif de la tumeur par effet EPR, mais peut être également due à un ciblage actif de la protéine antigénique MMP-14 exprimée à la surface des cellules cancéreuses 4T1.

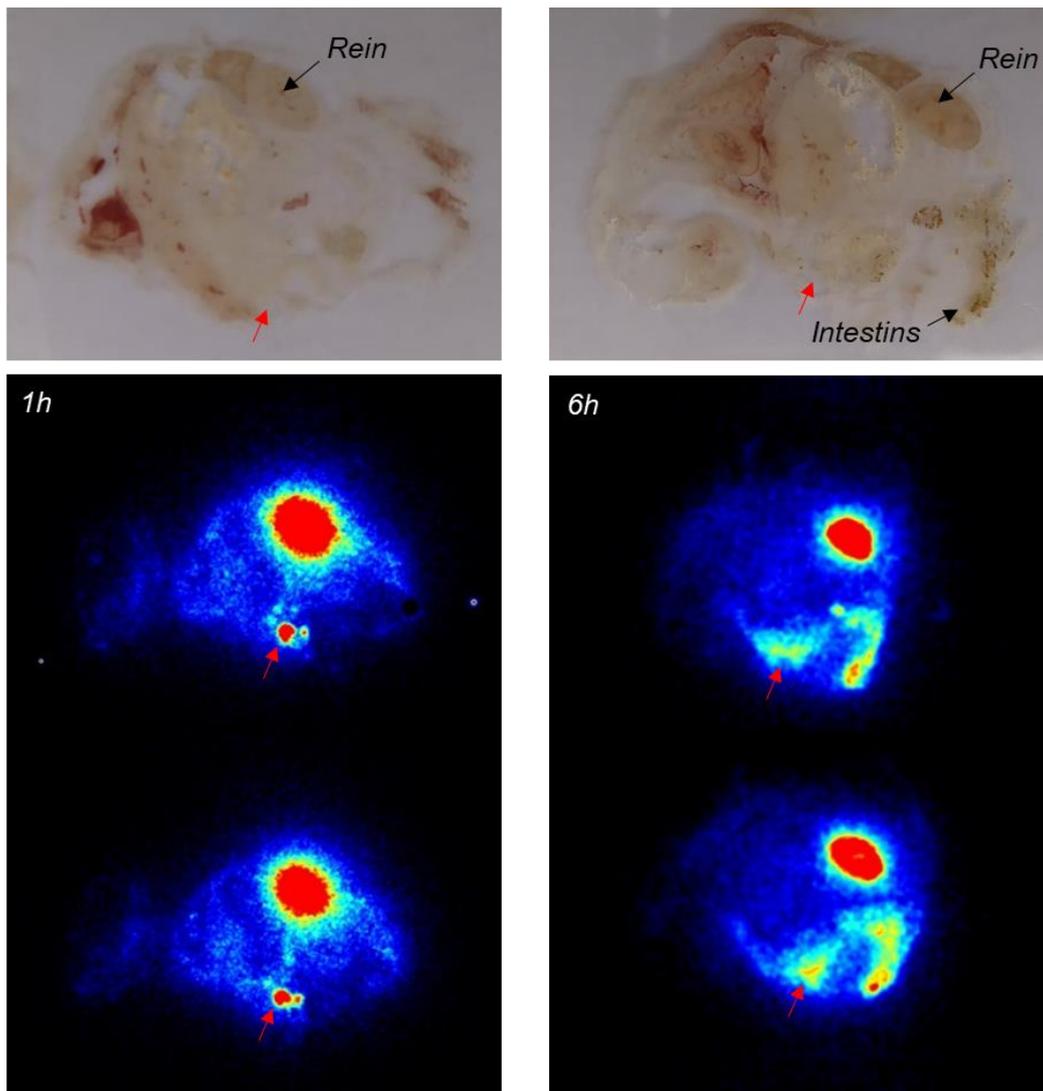


Figure 14 - Autoradiographie sur corps entier de la biodistribution de l'ADC doublement marqué dans le modèle de carcinome mammaire 4T1 au cours du temps. La flèche rouge représente la position de la tumeur.

En revanche, l'imagerie sur corps entier ne donne aucune information quant à la localisation et à la quantification des différents isotopes. En effet, il est impossible de réaliser une coupe transversale de corps entier sur une épaisseur de coupe suffisamment fine pour se placer dans des conditions adaptées à la déconvolution du signal des deux isotopes. Les coupes de corps entier faisant environ 30 à 35  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, la grande majorité du signal qui a été mesuré provient de l'émission du carbone 14. C'est pourquoi, il est indispensable d'analyser chaque organe individuellement en coupes plus fines pour pouvoir associer une quantification distincte des deux éléments à l'image de la biodistribution globale.

### 3.3.3.2 L'imagerie sur coupes de tumeur

Dans un second temps, les différents organes prélevés chez les souris aux mêmes temps de sacrifice (tumeur, reins, foie, rate, cœur, poumons et cerveau) ont été coupés sur une épaisseur de 7  $\mu\text{m}$  pour être imagés séparément. Des coupes ont été faites sur la moitié des organes afin qu'elles soient, d'une part, représentatives de l'ensemble de l'organe, et d'autre part de garder une partie des tissus pour les broyer et en extraire les molécules d'intérêt. Seul le cerveau, qui n'est pas un organe homogène a été coupé dans sa totalité pour pouvoir imager toutes les différentes zones qui le composent.

Les coupes de tumeur prélevées à 1 h et à 6 h ont été analysées simultanément afin de pouvoir faire une quantification relative de la radioactivité (Figure 15). Les images qui ont été obtenues sont en accord avec les premières observations qui ont été faites en imagerie corps entier. En effet, nous avons visualisé par autoradiographie une quantité de radioactivité totale plus importante dans la tumeur de l'animal sacrifié 1 heure après l'injection que dans celle de la souris sacrifiée après 6 heures. L'intégration de l'intensité du signal radioactif pour plusieurs coupes de tissu a donné une quantité de radioactivité surfacique moyenne de 104,5 fCi/mm<sup>2</sup> et 62,4 fCi/mm<sup>2</sup> de coupe pour les tumeurs à 1 h et à 6 h respectivement, soit environ un facteur 1,7 entre les quantités de radioactivité présentes dans le tissu cible aux deux temps. De plus, l'intégration du signal radioactif pour plusieurs coupes a permis de mettre en évidence l'homogénéité de distribution de l'ADC au sein de la tumeur. En effet, une quantité de radioactivité surfacique constante a été mesurée sur des coupes de tissus représentatives de l'ensemble de la masse tumorale. L'utilisation d'un fragment fonctionnel d'anticorps de taille réduite tel que le Fab permet donc de favoriser la diffusion du conjugué au sein des tumeurs solides.

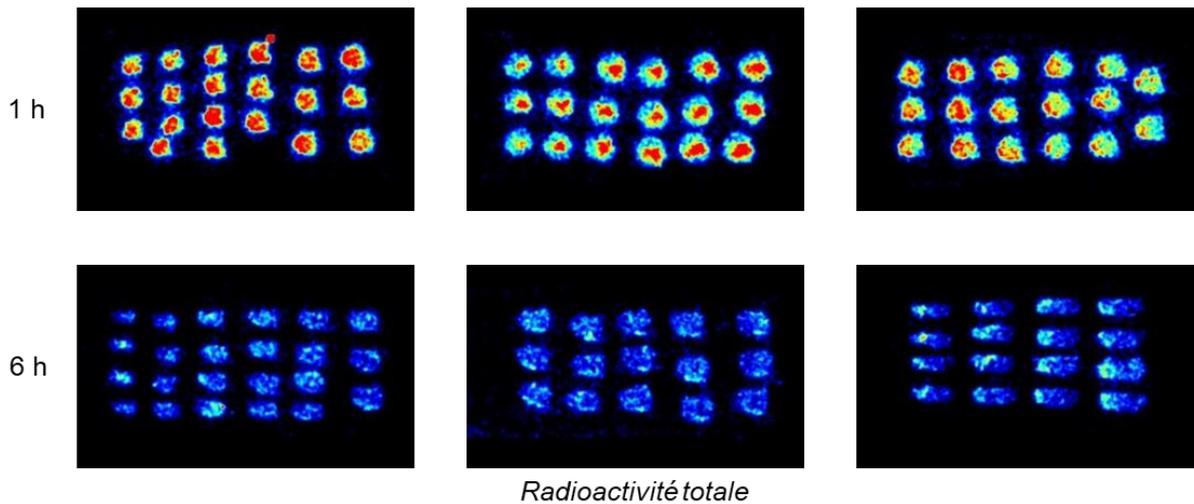
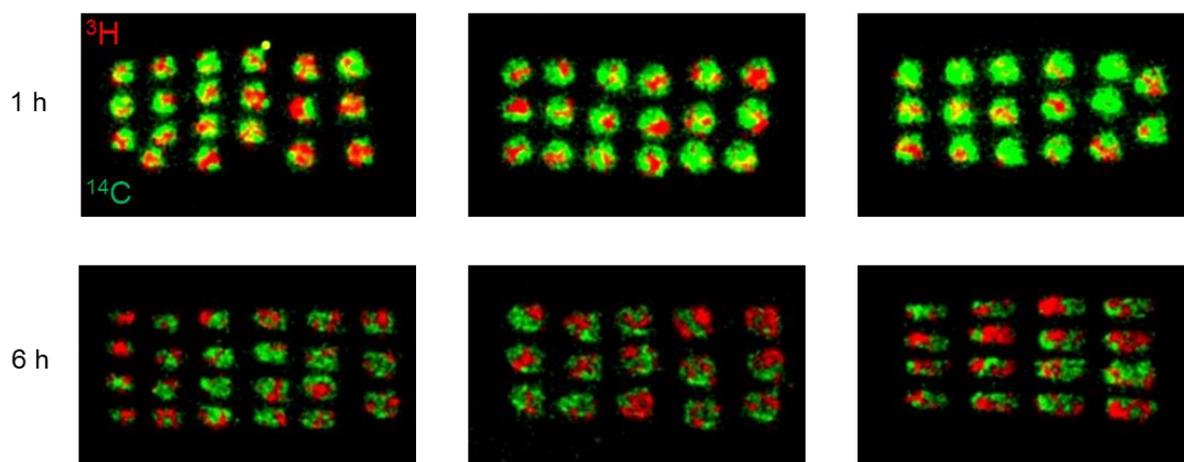


Figure 15 - Autoradiographie de coupes de tumeur (7  $\mu\text{m}$ ) prélevés 1 heure et 6 heures après l'injection montrant la radioactivité totale présente dans l'organe.

Les images qui ont été obtenues pour les différentes coupes de tumeurs ont ensuite été traitées à l'aide de l'algorithme de déconvolution pour extraire les signaux relatifs aux émissions des deux isotopes (Figure 16). La détermination du ratio entre les quantités des deux radioéléments au cours du temps permet de suivre l'évolution du conjugué *in vivo*. En effet, un changement de la valeur du ratio initial qui a été incorporé correspondrait à une dissociation des conjugués qui évolueraient désormais comme deux objets distincts et ayant un comportement différent.

De façon importante, nous avons observé la présence des deux isotopes dans les coupes de tumeurs aux deux temps de sacrifice. La mesure de l'intensité du signal radioactif émis par les deux isotopes sur plusieurs coupes de tissus a permis de déterminer le ratio expérimental  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  dans la tumeur aux deux temps de sacrifice. Nous avons calculé un ratio moyen de 4,79/1 et 5,97/1 en faveur du tritium sur les coupes de tumeur prélevées 1 heure et 6 heures après l'injection respectivement. Aux deux temps de sacrifice, la valeur calculée est différente du ratio initial 2/1 qui a été incorporé à la structure de l'ADC, ce qui témoigne d'une évolution des objets au sein de la tumeur dès les premiers instants.



*Signaux tritium et carbone 14 déconvolués*

*Figure 16 - La superposition des signaux relatifs aux deux isotopes montre la présence et la colocalisation du Fab et du cytotoxique dans la tumeur.*

En plus de la quantification relative des deux éléments, la mesure de la quantité de radioactivité volumique pour chaque isotope donne des informations concernant la quantité de Fab et de cytotoxique présents dans la tumeur au cours du temps (Tableau 6). Tandis que la quantité volumique de carbone 14 représentative du Fab a diminué de 40%, celle du tritium porté par le cytotoxique a, quant à elle, diminué de 25%. Ceci semble mettre en évidence une dissociation des deux composants du conjugué. À ce titre, le Fab semble être éliminé de la tumeur plus rapidement au cours du temps que le cytotoxique MMAE.

TEMPS	TRITIUM	CARBONE 14	RATIO $^3\text{H}/^{14}\text{C}$
1 HEURE	47,6 pCi/mm <sup>3</sup>	9,9 pCi/mm <sup>3</sup>	4,79
6 HEURES	35,4 pCi/mm <sup>3</sup>	5,9 pCi/mm <sup>3</sup>	5,97

*Tableau 6 – Mesure par autoradiographie digitale de la quantité de radioactivité volumique des deux radioisotopes sur les coupes de tumeurs prélevées 1 heure et 6 heures après l'injection de l'ADC.*

Une hypothèse raisonnable serait que la dissociation des conjugués observée au sein des tumeurs pourrait être corrélée à la délivrance du cytotoxique après clivage du linker peptidique par les protéases tumorales. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons broyé les demi-tumeurs

restantes qui ont été prélevées 6 heures après l'injection. Les petites molécules ont ensuite été extraites du broyat par précipitation des espèces protéiques dans l'acétone froid, puis ont été analysées en radio-HPLC (Figure 17). La superposition des profils radio-HPLC de la [<sup>3</sup>H]MMAE (Figure 17A), de la [<sup>3</sup>H]MMAE artificiellement ajoutée à du broyat tumoral 4T1 puis extraite (Figure 17B) et de l'extrait tumoral des tumeurs prélevées 6 heures après l'injection (Figure 17C) a permis de mettre en évidence la présence de MMAE libre au sein des tumeurs.

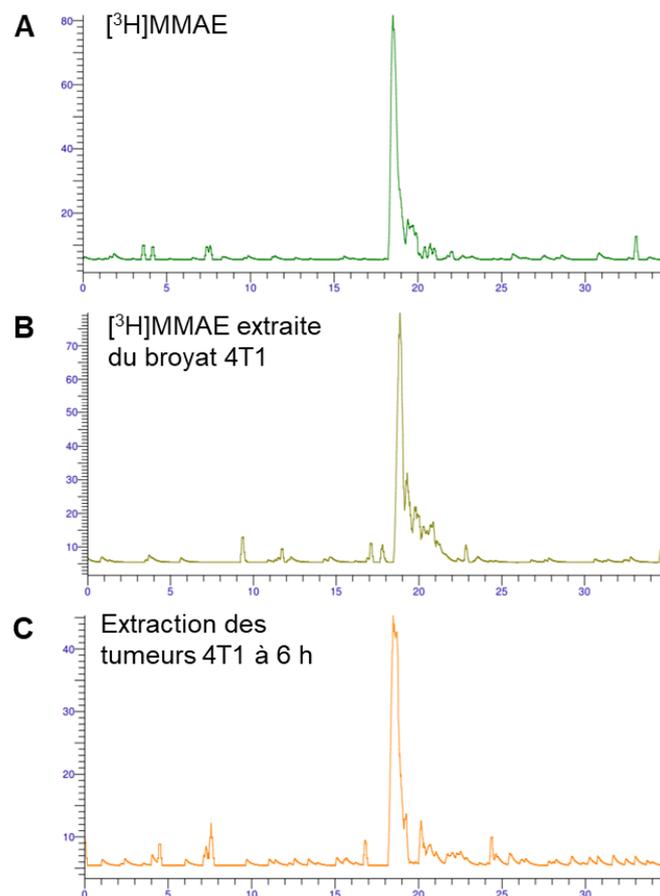


Figure 17 – L'analyse par radio HPLC montre un pic ( $t_R = 18,5$  min) mettant en évidence la présence de MMAE dans la tumeur. (A) Le cytotoxique MMAE tritié. (B) L'extraction de la MMAE tritié du broyat de tumeur 4T1. (C) L'extraction des espèces moléculaires présentes dans le broyat des tumeurs 4T1 prélevées 6 heures après l'injection.

Bien que le phénomène de délivrance intratumorale du cytotoxique MMAE ait été démontré, aucune conclusion ne peut être tirée concernant l'internalisation des ADC au sein des cellules 4T1. En effet, le dipeptide Val-Ala qui a été utilisé ici comme linker clivable a été décrit dans le

cas d'ADC non-internalisables compte tenu de sa capacité à être clivé extracellulairement pour libérer un cytotoxique capable d'atteindre sa cible intracellulaire par diffusion au travers des membranes cellulaires<sup>353</sup>. Ainsi, il est difficile d'associer de façon non ambiguë la délivrance de la MMAE à une activité protéolytique lysosomale après internalisation des conjugués. De plus, bien que la MMP-14 soit une protéase membranaire, la régulation de son activité dans l'espace péri cellulaire conduit à la libération de fragments solubles catalytiquement actifs dans le milieu extracellulaire par dégradation non-autocatalytique<sup>354</sup>. L'existence de ces formes solubles catalytiquement actives de la MMP-14 pourrait conduire à des complexes protéase-Fab3A2 non-internalisables concorderait avec une délivrance du cytotoxique dans le milieu extracellulaire. L'incubation d'un ADC doublement marqué en présence de cellules 4T1 accompagnée d'une mesure de la quantité de radioactivité dans le milieu de culture et dans le lysat cellulaire permettrait de répondre quant à l'internalisation du Fab3A2.

Par ailleurs, nous avons montré que l'ADC doublement marqué qui a été évalué *in vivo* possède des propriétés équivalentes au Fab3A2 en termes de capacité à inhiber l'activité catalytique de la MMP-14 *in vitro* (Figure 18A). De plus, nous avons également évalué la sélectivité de cet objet pour la MMP-14 parmi neuf autres MMP. En présence d'une concentration de 1  $\mu$ M d'ADC, nous avons observé une inhibition d'environ 90% de l'activité catalytique de la MMP-14 tandis que les autres MMP restent actives à plus de 80% (Figure 18B). Le profil de sélectivité de l'ADC est similaire à celui du Fab3A2, avec même une légère amélioration de la sélectivité pour les MMP-2 ; MMP-3 ; MMP-7 ; MMP-8 ; MMP-9 et MMP-13.

---

<sup>353</sup> Dal Corso, A., Cazzamalli, S., Gébleux, R., Mattarella, M. & Neri, D. Protease-Cleavable Linkers Modulate the Anticancer Activity of Noninternalizing Antibody-Drug Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **28**, 1826–1833 (2017).

<sup>354</sup> Toth, M. et al. Complex pattern of membrane type 1 matrix metalloproteinase shedding. Regulation by autocatalytic cell surface inactivation of active enzyme. *J. Biol. Chem.* **277**, 26340–26350 (2002).

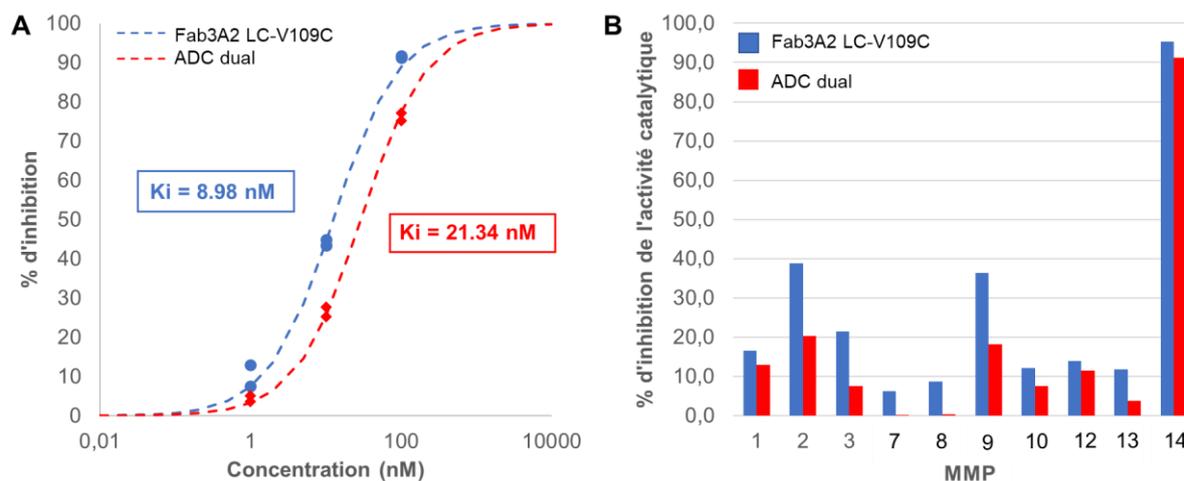


Figure 18 – Evaluation de l'ADC doublement marqué comme inhibiteur des MMP. (A) La détermination de la constante d'inhibition  $K_i$  pour la MMP-14. (B) La détermination du profil de sélectivité de l'inhibiteur Fab3A2 et de l'ADC correspondant sur un panel de MMP.

L'ensemble de ces résultats a montré la présence des deux composants de l'ADC au sein du tissu tumoral aux deux temps de sacrifice. De plus, l'analyse par radio-HPLC des petites molécules qui ont été extraites de la tumeur a mis en évidence le phénomène de délivrance intra-tumorale du cytotoxique. Également, nous avons démontré que l'ADC doublement marqué qui a été injecté dans le modèle animal est capable d'inhiber l'activité catalytique de la MMP-14 *in vitro*. Ainsi, le Fab et le cytotoxique seraient tous les deux capables d'exercer leur effet thérapeutique au sein du tissu tumoral. La quantification du signal radioactif sur les coupes de tumeurs permet, quant à elle, d'estimer si les quantités de Fab et de cytotoxique présentes au sein de la tumeur sont suffisantes pour pouvoir observer cet effet thérapeutique. En effet, à partir d'une estimation du volume de la tumeur, il a été possible i) de calculer la quantité de radioactivité totale et ii) de rapporter cette quantité à un pourcentage de dose injectée par gramme de tissu. Ce pourcentage a enfin permis d'estimer la concentration locale des deux composants au sein du tissu cible (Tableau 7).

Temps	1 heure		6 heures	
Composant	MMAE ( <sup>3</sup> H)	Fab3A2 ( <sup>14</sup> C)	MMAE ( <sup>3</sup> H)	Fab3A2 ( <sup>14</sup> C)
Radioactivité volumique (pCi/mm <sup>3</sup> )	47,6 +/- 10,6	9,9 +/- 3,6	35,4 +/- 5,8	5,9 +/- 1,4
Volume moyen de la tumeur (mm <sup>3</sup> )	135,2 mm <sup>3</sup>		155,4 mm <sup>3</sup>	
Radioactivité totale dans la tumeur (nCi)	6,4 +/- 1,4	1,3 +/- 0,5	5,5 +/- 0,9	0,9 +/- 0,2
% de dose injectée/g de tumeur	2,8 +/- 0,6	0,8 +/- 0,3	2,0 +/- 0,3	0,4 +/- 0,1
Concentration locale dans la tumeur (nM)	116,4 +/- 25,8	32,4 +/- 11,6	85,1 +/- 13,9	18,6 +/- 4,3

Tableau 7 – Le calcul de la quantité de radioactivité au sein de la tumeur permet d'accéder à l'estimation de la concentration locale de deux composants dans le tissu cible.

Les valeurs de %DI/g de tumeur obtenues ont été comparées aux valeurs qui ont été publiées lors de l'étude de la biodistribution d'un ADC doublement marqué<sup>355</sup>. Par scintillation liquide dans les broyats d'organes, les auteurs ont quantifié des pics maximaux de %DI/g de 40,9% et 82,3% dans la tumeur pour l'anticorps et le cytotoxique respectivement. Ces valeurs, bien supérieures à celles que nous avons estimées, peuvent être expliquées par la nature de l'anticorps utilisé. En effet, dans cette étude, Alley et ses collaborateurs ont évalué un ADC construit à partir d'une IgG pour lequel le pic maximal de %DI/g a été obtenu 48 heures après l'injection. La demi-vie prolongée en circulation des IgGs est favorable à leur accumulation progressive dans le tissu tumoral. Dans une autre étude, les auteurs ont évalué l'impact du format d'anticorps et du temps de circulation sur la distribution à la tumeur<sup>356</sup>. Ainsi, il a été mis en évidence qu'une élimination plasmatique rapide est associée à une faible accumulation dans la tumeur. En effet, une accumulation évaluée à 30%DI/g de tumeur a été mesurée dans le cas d'une IgG contre seulement 7%DI/g dans le cas d'un VHH. Les auteurs ont également démontré que la fusion de ce même VHH à un domaine de liaison à la sérualbumine permet

<sup>355</sup> Alley, S. C. et al. *The pharmacologic basis for antibody-auristatin conjugate activity. J. Pharmacol. Exp. Ther.* **330**, 932–938 (2009).

<sup>356</sup> Nessler, I. et al. *Increased tumor penetration of single-domain antibody-drug conjugates improves in vivo efficacy in prostate cancer models. Cancer Res.* **80**, 1268–1278 (2020).

d'une part, de prolonger le temps de circulation de ce dernier, et d'autre part, d'atteindre un taux d'accumulation dans la tumeur équivalent à celui obtenu pour le format IgG. Toutefois, malgré une plus faible quantité accumulée dans la tumeur, il a été montré que l'utilisation d'un format réduit d'anticorps permet une meilleure distribution intra-tumorale. De plus, ces résultats ont démontré que le fait d'atteindre un plus grand nombre de cellules avec une dose létale est plus fortement corrélé à une efficacité thérapeutique *in vivo* que la quantité totale accumulée dans la tumeur.

Dans le cadre de notre étude de la biodistribution dans le modèle 4T1, les %DI/g qui ont été estimés au sein de la tumeur sont bien plus faibles (< 1%). Cette différence significative pourrait être expliquée par le phénomène de protéolyse de la boucle CDR-H3 du Fab dans l'environnement tumoral, qui a précédemment été mise en évidence (section 3.2.2.). La protéolyse de ce domaine entraîne la destruction de la structure de la boucle exposée capable d'interagir avec la gorge catalytique de la MMP-14. Ainsi, la perte de la capacité de liaison à la cible antigénique pourrait être associée à la mauvaise rétention du Fab au sein de la tumeur. Néanmoins, bien que les %DI/g de tumeur soient faibles, les valeurs de concentration locales qui ont été estimées pour le cytotoxique aux deux temps de sacrifice (Tableau 7) sont des doses toxiques. En effet, l'IC50 du cytotoxique MMAE est de l'ordre du nanomolaire. En revanche, la valeur de Ki qui a été déterminée *in vitro* pour l'inhibition de l'activité catalytique de la MMP-14 par le Fab3A2 est autour de 20 nM (Figure 18). Ainsi, les concentrations locales en Fab qui ont été estimées au sein de la tumeur aux deux temps de sacrifice permettraient seulement l'inhibition d'une petite part de l'activité enzymatique.

### 3.3.3.3 L'imagerie sur coupes des principaux organes

Nous nous sommes ensuite intéressés à la biodistribution de l'ADC doublement marqué aux autres organes principaux. De la même manière que ce qui a été fait dans le cadre de l'analyse des tumeurs, les reins, le foie, le cœur, la rate, les poumons et le cerveau ont été coupés en section de 7 µm d'épaisseur. Chacun des organes prélevés 1 heure et 6 heures après l'injection a été analysé au BetaIMAGER™ pour pouvoir faire une quantification de la quantité de radioactivité dans les tissus (Figure 19).

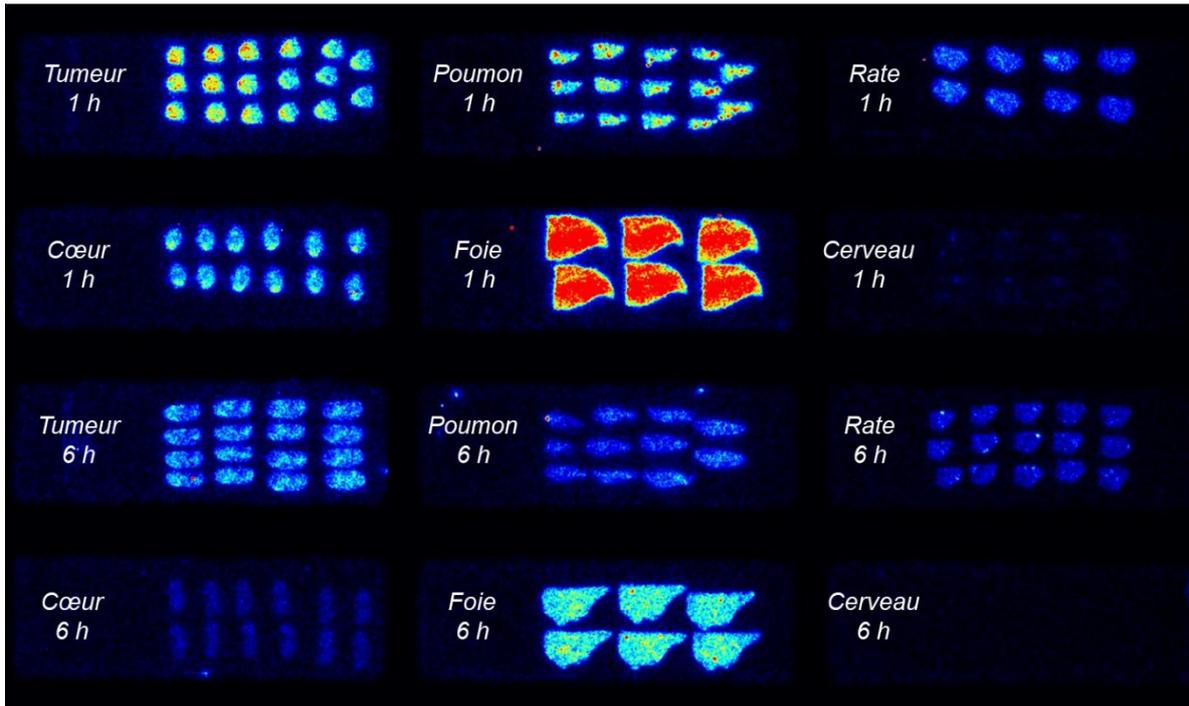


Figure 19 - Autoradiographie de coupes de tumeur, poumon, rate, cœur, foie et cerveau (7  $\mu$ m) prélevés 1 heure et 6 heures après l'injection montrant la radioactivité totale présente dans l'organe.

Les reins ont été analysés sur un temps d'acquisition plus court, séparément des autres organes, compte tenu de la plus grande quantité de radioactivité qu'ils contiennent (Figure 20).

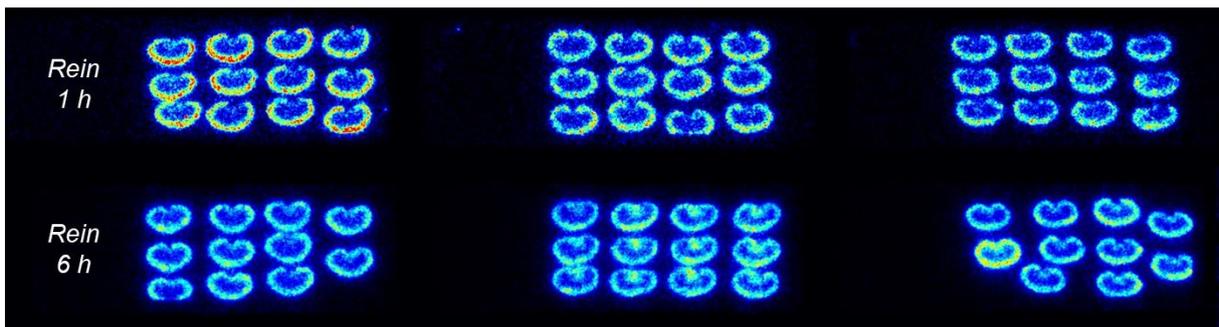


Figure 20 - Autoradiographie de coupes de rein (7  $\mu$ m) prélevés 1 heure et 6 heures après l'injection montrant la radioactivité totale présente dans l'organe.

Plusieurs observations ont été faites. Premièrement, aucune radioactivité n'a pu être détectée au-dessus du bruit de fond sur les coupes de cerveau, suggérant que le Fab3A2 ne passe pas la barrière hémato-encéphalique (Figure 19). Deuxièmement, pour l'ensemble des organes, nous

avons observé une diminution de la quantité de radioactivité totale au cours du temps. Et troisièmement, contrairement à ce qui avait été imagé sur corps entier (Figure 14), où seuls les reins et la tumeur étaient chargés en radioactivité, nous avons remarqué un marquage important du foie à 1 heure (Figure 19). Ce phénomène peut être expliqué de la façon suivante : la détection de la forte émission radioactive des reins par l'appareil a entraîné la focalisation de l'acquisition sur cette partie de l'échantillon faisant ainsi ressortir la tumeur et occultant le signal émis par le foie dans une autre zone. La même observation a été faite pour les poumons, qui semblent contenir une quantité de radioactivité équivalente à la tumeur à 1 heure (Figure 19) et qui n'ont pourtant pas été visualisés lors de l'imagerie sur corps entier.

Les images qui ont été obtenues pour les différentes coupes d'organes ont ensuite été traitées à l'aide de l'algorithme de déconvolution pour extraire les signaux relatifs aux émissions des deux isotopes. Le tritium et le carbone 14 n'étant pas imagés sur la même épaisseur de coupe de tissu, les signaux qui ont été intégrés ont ensuite été ramenés à une quantité volumique en radioactivité pour pouvoir être comparés (Figure 21).

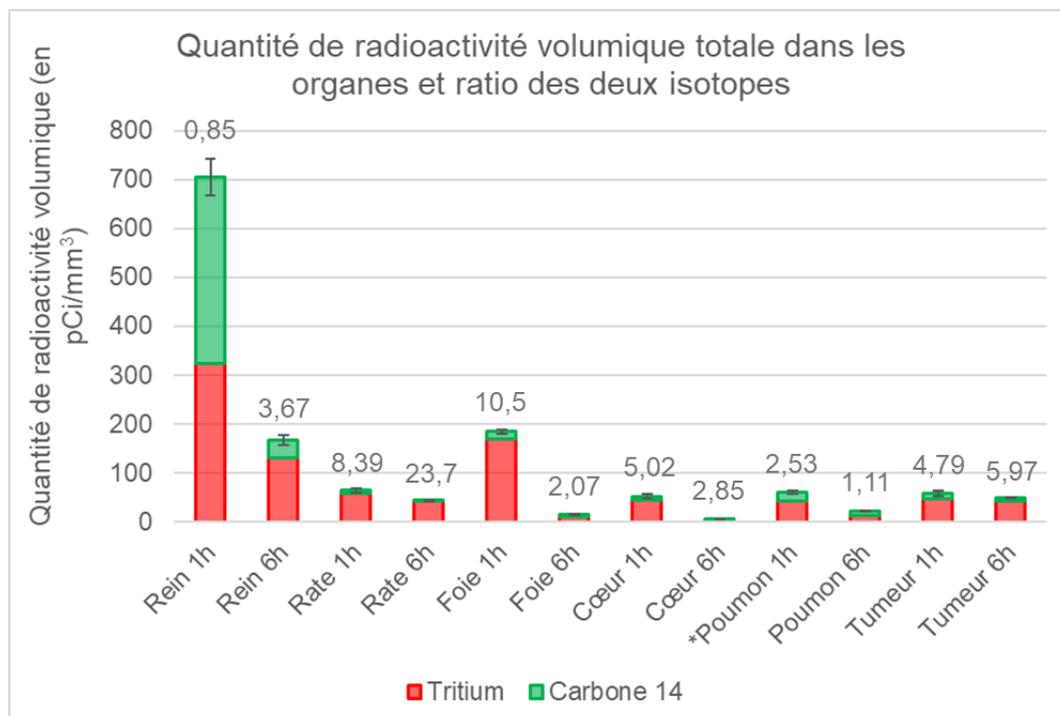


Figure 21 – Représentation de la quantité de radioactivité totale présente dans les organes au cours du temps ainsi que la répartition entre les deux isotopes. La valeur numérique correspond au ratio tritium/carbone 14. \*L'ensemble des données correspondent à une moyenne sur n=3 organes à l'exception du poumon à 1 heure qui ne représente que n=2.

La représentation de la quantité de radioactivité totale par volume d'organe a montré que le foie, et surtout les reins, sont les organes qui contiennent le plus de radioactivité une heure après l'injection. De plus, la répartition entre les différentes isotopes a montré un ratio élevé en faveur du tritium (10,5) dans le foie, tandis que le rein est le seul organe qui a montré un ratio tritium/carbone 14 inférieur à 1 (0,85). Ainsi, nous avons pu en conclure que la filtration rénale est la voie d'élimination préférentielle du Fab, tandis que le cytotoxique subit une part de capture hépatique. Globalement, le profil de biodistribution n'a pas montré pas un ciblage préférentiel de la tumeur par rapport aux autres organes. Néanmoins, le calcul du ratio des différents isotopes a donné des valeurs distinctes pour chaque organe, ce qui suggère un comportement différent du Fab et du cytotoxique vis-à-vis de chacun.

Le profil de biodistribution du carbone 14 (Figure 22A) a montré une diminution de la quantité de radioactivité volumique au cours du temps, correspondant à une élimination progressive du Fab par les organes. Une diminution de la quantité de radioactivité au cours du temps a également été observé pour les différents organes sur le profil de biodistribution du tritium (Figure 22B), notamment pour le foie et le cœur qui ont éliminé plus de 90% de la radioactivité tritium mesurée à 1 heure. La tumeur et la rate présentent une meilleure rétention du cytotoxique avec seulement 25% et 27% de perte de radioactivité respectivement entre 1 heure et 6 heures. Au sein de la tumeur, cette observation peut être expliquée par le phénomène de délivrance du cytotoxique par protéolyse du linker clivable qui a été démontré par radio-HPLC. Une fois libéré, le cytotoxique peut diffuser au travers des membranes cellulaires pour atteindre sa cible intra-cellulaire, ce qui limite son élimination. Dans la rate, en revanche, la présence de tritium s'accompagne d'une faible quantité de carbone 14 à 6 heures, ce qui suggère que le cytotoxique s'y trouve sous une forme non conjuguée à l'anticorps, ce qui pourrait causer une certaine toxicité.

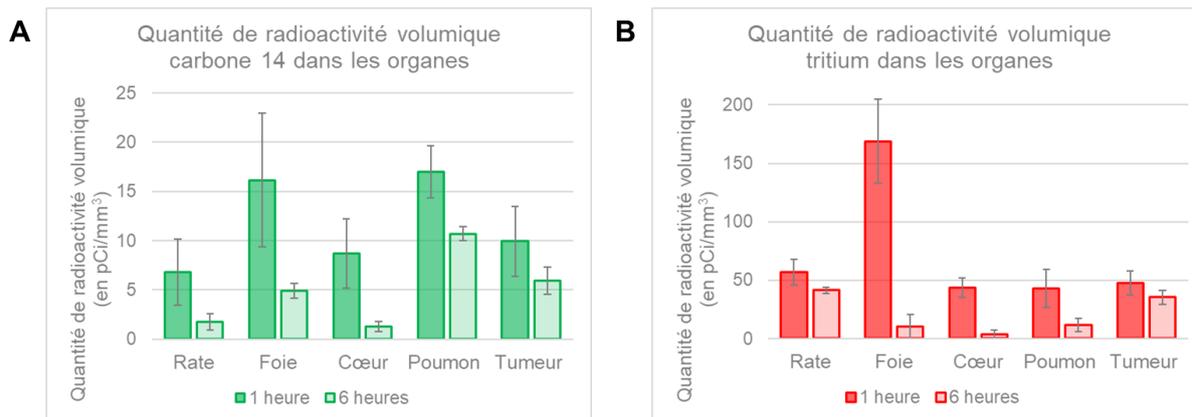


Figure 22 - Représentation de la quantité volumique de radioactivité des deux isotopes dans les différents organes prélevés 1 heure et 6 heures après l'injection. (A) Carbone 14. (B) Tritium.

Cette étude a permis de faire la preuve de concept de l'utilisation du double marquage radioactif tritium/carbone 14 pour l'évaluation de la biodistribution d'un ADC. Cette méthode de quantification très sensible a permis de mettre en évidence l'instabilité et le comportement complexe de ce conjugué in vivo. En effet, dès le premier temps d'analyse une grande variation des ratios des deux isotopes au sein des différents tissus a été observée. Ces variations peuvent s'expliquer par la fragilité de la structure du conjugué, qui peut subir d'une part, la déconjugaison du linker-cytotoxique et d'autre part la protéolyse du domaine CDR-H3 du Fab. L'ensemble de ces phénomènes augmentant la complexité du mélange moléculaire. La limitation principale de cette méthode est la nécessité d'y associer une méthode analytique afin de pouvoir caractériser les différentes espèces quantifiées. Par exemple, l'analyse radio-HPLC de l'extrait tumoral a permis de mettre en évidence la fraction de cytotoxique libéré au sein de la tumeur. Il en est de même pour l'étude de la pharmacocinétique, le comptage radioactif dans le sang ne donne qu'un profil "apparent", dans lequel aucune distinction n'est faite entre le conjugué et les différents adduits en circulation.

# CHAPITRE 6

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les ADC sont une puissante classe d'agents thérapeutiques utilisés dans le traitement du cancer. Durant les dernières décennies, de nombreux efforts ont été fait pour continuer d'accroître leur bénéfice thérapeutique, en jouant sur l'optimisation des différents composants et du design des conjugués et en améliorant la compréhension de leur mode d'action. Dans ce contexte, ce travail de thèse avait plusieurs objectifs :

1. Concevoir de nouveaux ADC ayant un design optimisé ainsi qu'un mode d'action original.

Pour cela, nous avons choisi d'incorporer à la structure des conjugués l'anticorps 3A2 développé par l'équipe du Dr. Xin Ge (université de Californie à Riverside), un puissant inhibiteur de la MMP-14 impliquée dans le phénomène de prolifération métastatique. À partir du fragment fonctionnel Fab de cet anticorps, nous avons mis au point trois méthodes de conjugaison régio-spécifique donnant lieu à l'obtention de conjugués ayant une stoechiométrie homogène et définie. Nous avons montré que i) la mutation d'un résidu judicieusement choisi permet l'introduction d'une cystéine réactive pour la modification chimique, ii) l'insertion d'une séquence peptidique au sein de la séquence du Fab permet de guider la modification régio-spécifique d'un résidu glutamine par l'enzyme BTG, et iii) l'immobilisation du Fab sur support solide permet d'obtenir de la sélectivité pour un résidu lysine parmi plusieurs lysines natives réactives lors de la conjugaison en présence de BTG. De plus, nous avons veillé à ce que l'ensemble de ces modifications aient été faites en préservant les propriétés de la protéine en termes de capacité à inhiber l'activité catalytique de la MMP-14 et de sélectivité pour la MMP-14 parmi la famille des MMP.

2. Développer une méthode d'analyse de la pharmacocinétique et de la biodistribution des ADC en utilisant un double marquage radioactif tritium/carbone 14.

Pour cela, nous avons travaillé en collaboration avec les équipes des Dr. Grégory Pieters et Dr. Davide Audisio (Service de chimie bioorganique et de marquage, CEA Saclay) afin de réaliser le marquage au tritium du cytotoxique MMAE ainsi que la synthèse d'une molécule tag marquée au carbone 14. Dans un premier temps, nous avons montré que la tritiation de la MMAE en présence de nanoparticules de ruthénium a permis d'obtenir une molécule marquée avec une haute activité spécifique par échange isotopique. Dans un second temps, nous avons présenté l'utilisation d'une réaction de Staudinger-Aza/Wittig en présence de  $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$  sur un

tétrapeptide de lysine pour conduire à la formation d'une molécule polyurée incorporant cinq atomes de carbone 14. Sa conjugaison de manière efficace a ensuite nécessité le développement d'une méthode chémo-enzymatique en deux étapes utilisant une réaction de chimie "click". L'utilisation de ces molécules marquées et d'une combinaison des méthodes de conjugaison chimique et enzymatique a permis l'obtention d'ADC doublement marqués au tritium et au carbone 14. La mise au point des méthodes de double détection radioactive dans les fluides et dans les tissus biologiques par scintillation liquide et par autoradiographie digitale respectivement, a été une étape clé dans le design des conjugués radiomarqués, notamment en termes de détermination de la radioactivité spécifique et du ratio des différents isotopes. La preuve de concept du suivi et de la quantification des deux composants de l'ADC *in vivo* par double détection radioactive tritium/carbone 14 a été faite chez la souris. En rapportant la concentration en radioactivité dans le sang à un pourcentage de dose injectée, il a été possible d'évaluer la stabilité des objets en circulation en comparant les courbes de pharmacocinétique pour les deux isotopes. La déconvolution du signal des deux radioéléments sur coupes d'organes a été possible à l'aide d'un algorithme de calcul de traitement des données d'autoradiographie ; ce qui a permis de suivre le ratio des deux isotopes dans les organes au cours du temps. L'évolution du ratio des différents isotopes au sein de la tumeur au cours du temps a été associée à la délivrance du cytotoxique après protéolyse du linker clivable, mise en évidence par l'analyse radio-HPLC de l'extrait tumoral. Cependant, afin de compléter l'étude, une expérience d'incubation des conjugués en présence de cellules 4T1 en culture pourrait être réalisée pour conclure sur le ciblage actif de la MMP-14 et l'internalisation des conjugués.

Au-delà de l'étude de la stabilité et du comportement des conjugués *in vivo*, nous avons montré que l'autoradiographie digitale est un outil puissant permettant une quantification des espèces marquées dans les coupes de tissus. Il a alors été possible de déterminer avec une très grande sensibilité la quantité d'anticorps et de cytotoxique ayant atteint le tissu cible, ce qui nous a permis d'estimer une concentration locale en Fab et en cytotoxique dans la tumeur. Ces informations sont primordiales pour l'évaluation thérapeutique des ADC dans le modèle tumoral, car elles permettent d'ajuster les paramètres d'administration (dose injectée, fréquence d'injection), pour maintenir une dose efficace et observer un bénéfice thérapeutique. Une telle étude permettrait d'évaluer le double mode d'action de ces ADC où d'une part, l'anticorps est capable d'inhiber l'activité catalytique pro-cancéreuse de la MMP-

14, pouvant ainsi réduire la prolifération métastatique, tandis que d'autre part la petite molécule conjuguée induit la mort cellulaire, ce qui diminue aussi le volume tumoral. Toutefois, afin de pouvoir conclure sur la contribution de l'anticorps 3A2 inhibiteur compétitif de la MMP-14 à l'activité anti-cancéreuse de l'ADC, il apparaît nécessaire de le comparer à un ADC incorporant un anticorps anti-MMP-14 non-inhibiteur. De plus, cette étude devra être menée en utilisant le double mutant HC-N112R et HC-A115R résistant à la protéolyse afin de maintenir l'intégrité de la boucle CDR-H3 impliquée dans l'interaction inhibante avec le site actif de la MMP-14.

L'étude de cet ADC anti-MMP-14 a permis de faire la preuve de concept de l'utilisation du double marquage radioactif comme d'un outil de suivi et de quantification pour la bioanalyse des ADC. Dans un contexte plus large, cette approche peut être appliquée à l'étude de n'importe quels conjugués. Par exemple, dans une étape de sélection, le double marquage pourrait permettre de comparer la stabilité et l'efficacité de plusieurs conjugués dans un même modèle. Également, il pourrait être intéressant de comparer la biodistribution de plusieurs ADC construits sur des formats d'anticorps différents (IgG, Fab, scFv, VHH...), afin de pouvoir conclure sur l'impact de paramètres tels que, la taille de la protéine ou le temps de demi-vie en circulation sur le ciblage tumoral.

# CHAPITRE 7

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

# 1 INFORMATIONS GÉNÉRALES

---

## 1.1 RÉACTIFS

L'ensemble des réactifs et des solvants ont été utilisés sans étape de purification. Les acides aminés protégés, les résines Wang et Rink Amide et l'agent de couplage HATU proviennent de Novabiochem/Merck Biosciences. Le cytotoxique MMAE a été acheté chez eNovation Chemicals. Le maléimide auto-hydrolysable Mal-L-Dap(Boc)-OH\*DCHA a été provient de chez Iris Biotech GmbH. Le 4-azidobutan-1-amine a été acheté chez Zedira GmbH. L'ensemble des autres réactifs chimiques ont été achetés chez Sigma-Aldrich et les solvants proviennent de chez SDS-Carlo Erba. La suspension de résine Protino Ni-NTA Agarose a été achetée chez Macherey-Nagel. Les lignées cellulaires 4T1 et HEK293 ont été achetées chez Life Technologies. L'enzyme BTG a été achetée chez Zedira GmbH. Le domaine catalytique de la MMP-14 a été produit par l'IGBMC à Strasbourg. Les substrats fluorogéniques ont été synthétisés à façon par Enzo Life Sciences.

## 1.2 INSTRUMENTS

Les synthèses peptidiques au micro-onde ont été faites à l'aide du micro-onde Discover (CEM) en utilisant le mode réacteur ouvert et la prise de température par fibre optique. Les synthèses ont été réalisées dans des réacteurs munis d'un polyéthylène (Supelco).

Les analyses en HPLC analytiques et les séparations en HPLC semi-préparative des produits froids ont été réalisées sur des appareils Shimadzu (module de pompe : LC-20AB ; détecteur UV : PD-20A) en utilisant les colonnes i) analytique Phenomenex Kinetex® C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6 µm), ii) semi-préparative AIT France Kromasil C18 (250 x 10 mm ; 5 µm), ou iii) semi-préparative Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5 µm). Les phases mobiles qui ont été utilisées sont A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA. Les temps de rétention indiqués sont donnés en minutes.

Les analyses et les purifications en HPLC analytique des molécules radioactives ont été réalisées sur un système LaChrom Elite (module de pompe : Hitachi L-2130 ; détecteur UV : L-2400)

équipé d'un détecteur à scintillation liquide LB 507 A (Berthold) en utilisant les colonnes i) analytique Supelco Ascentis® Express C18 (100 x 4,6 mm ; 2,7 µm), ou ii) analytique Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3 µm). Les phases mobiles qui ont été utilisées sont A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% AF. Les temps de rétention indiqués sont donnés en minutes.

L'analyse LC-MS des protéines a été faite sur une chaîne HPLC 1100 series (Agilent) couplée à une trappe ionique Esquire HCT (Bruker Daltonics) en utilisant une colonne de dessalage Thermo Scientific ProSwift RP-4H (1 x 50 mm). Les phases mobiles qui ont été utilisées sont A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA.

Les analyses en spectrométrie de masse de type ESI-MS ont été faites à l'aide d'une trappe ionique Esquire HCT (Bruker Daltonics) utilisée en mode positif et négatif. Les analyses MALDI-TOF ont été faites avec le 4800 MALDI-TOF (Applied Biosystems). Les échantillons ont été co-cristallisés avec une solution d'acide α-cyano-4-hydroxy-cinnamique (HCCA) à 10 g/L. Les valeurs de m/z reportées correspondent au pic monoisotopique.

La purification et le dessalage des fragments d'anticorps produits en système cellulaire ont été faits à l'aide d'un système AKTA pure (GE Healthcare life sciences) muni d'une colonne de purification HisTrap HP ou d'exclusion stérique Sephacryl S2000.

Les coupes d'organes et de corps entier ont été faites sur le cryostat CM3050 S (Leica). Les acquisitions en autoradiographie digitale ont été réalisées avec les appareils BetaIMAGER 2000 et BetaIMAGER Tracer (Biospace). Les broyats d'organes ont été réalisés à l'aide de broyeur Precellys Evolution (Bertin Technologies). Les comptages radioactifs ont été faits à l'aide du compteur à scintillation TriCarb 2100TR (Perkin Elmer) en utilisant le liquide scintillant Ultima Gold (Perkin Elmer).

Le signal de fluorescence a été analysé par un fluorimètre Fluoroskan Ascent (Thermolab Systems) équipé d'un thermostat et d'un système d'agitation, et les mesures UV ont été faites à l'aide d'un spectrophotomètre UV-1800 (Shimadzu).

Pour chaque molécule synthétisée, l'identité et la pureté ont été évaluées par HPLC analytique et par spectrométrie de masse. L'activité spécifique des molécules radiomarquées a été

déterminée en analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF. L'identité des protéines et des conjugués a été vérifiée par spectrométrie de masse ESI-trappe ionique sous forme entière et par analyse MALDI-TOF des peptides issus de la digestion trypsique. La concentration des solutions de protéines a été calculée à partir de l'absorbance UV à 280 nm. L'activité spécifique des conjugués radiomarqués a été déterminée à partir d'une mesure de radioactivité en scintillation liquide associée à une absorbance UV à 280 nm.

## 2 SYNTHÈSE DES MOLÉCULES MODÈLE

### 2.1 LA MOLÉCULE AMINE PRIMAIRE

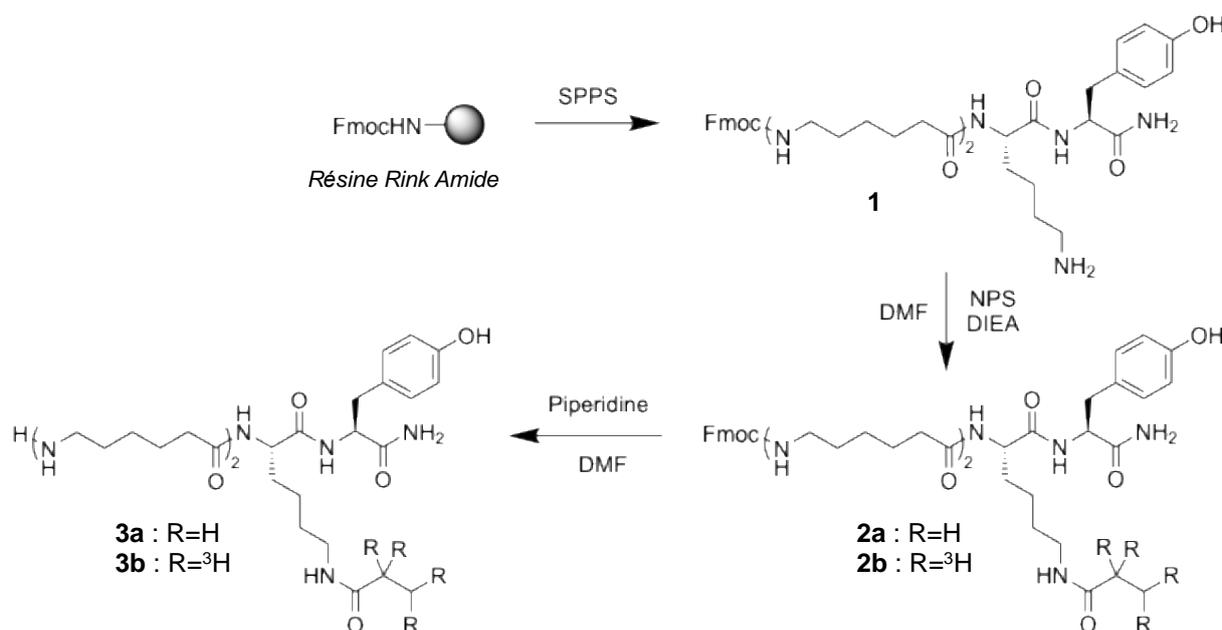
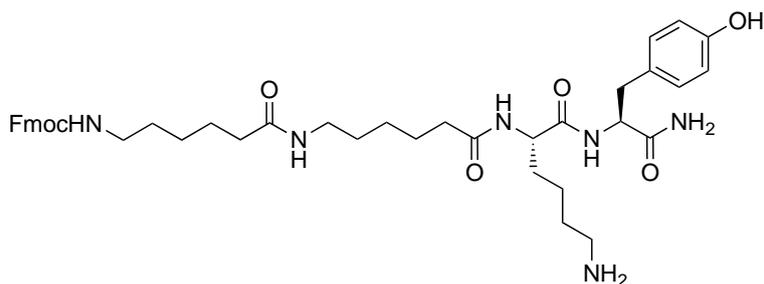


Figure 1 - Voie de synthèse de la molécule modèle 3a/3b.

### Composé 1 – Fmoc-Ahx<sub>2</sub>-Lys-Tyr-NH<sub>2</sub>



Le pseudopeptide a été préparé par synthèse peptidique sur support solide en stratégie Fmoc à partir de la résine Fmoc-Rink Amide (42 mg ; 30  $\mu$ mol). Le groupement protecteur Fmoc a été déprotégé par trois traitements successifs de la résine par une solution de piperidine à 20% dans la DMF (2 mL) pendant 3 minutes au micro-onde (25 W ; 60°C). Les acides aminés protégés Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH (69 mg ; 150  $\mu$ mol ; 5 équ.) et Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (69 mg ; 150  $\mu$ mol ; 5 équ.) ainsi que l'acide aminohexanoïque protégé Fmoc-Ahx-OH (53 mg ; 150  $\mu$ mol ; 5 équ.) ont été introduits en double couplage en présence de HATU (46 mg ; 120  $\mu$ mol ; 4 équ.) et de DIEA (25  $\mu$ L ; 150  $\mu$ mol ; 5 équ.) dans la DMF (1 mL) pendant 20 minutes au micro-onde. Le pseudopeptide synthétisé a été déprotégé et clivé du support solide par un traitement avec une solution de TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (92,5/5/2,5) (5 mL) pendant 2 heures à température ambiante et sous agitation. Le pseudopeptide a ensuite été précipité par dilution dans l'éther diéthylique (45 mL) à 0°C, puis récupéré par centrifugation avant d'être solubilisé dans une solution d'acide acétique à 10%. Après congélation et lyophilisation on obtient le produit **1** (8,2 mg ; 10,8  $\mu$ mol ; 36%).

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu$ m), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 17,3 minutes.

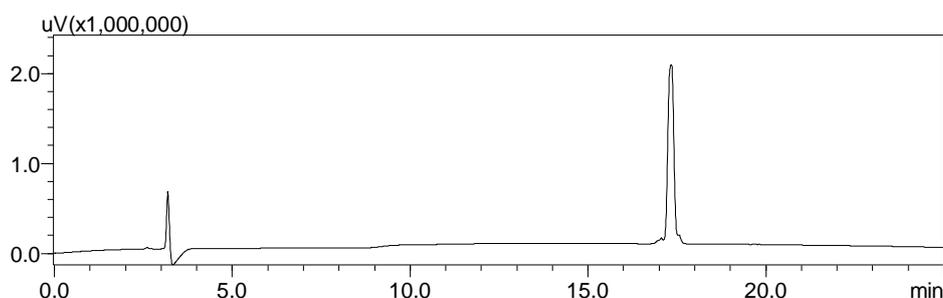


Figure 2 - Profil HPLC analytique du composé **1**.

ESI-MS (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>42</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> : 757,42 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 757,4.  
[M+TFA]<sup>-</sup> théorique pour C<sub>42</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> : 869,32 ; [M+TFA]<sup>-</sup> expérimental : 869,3.

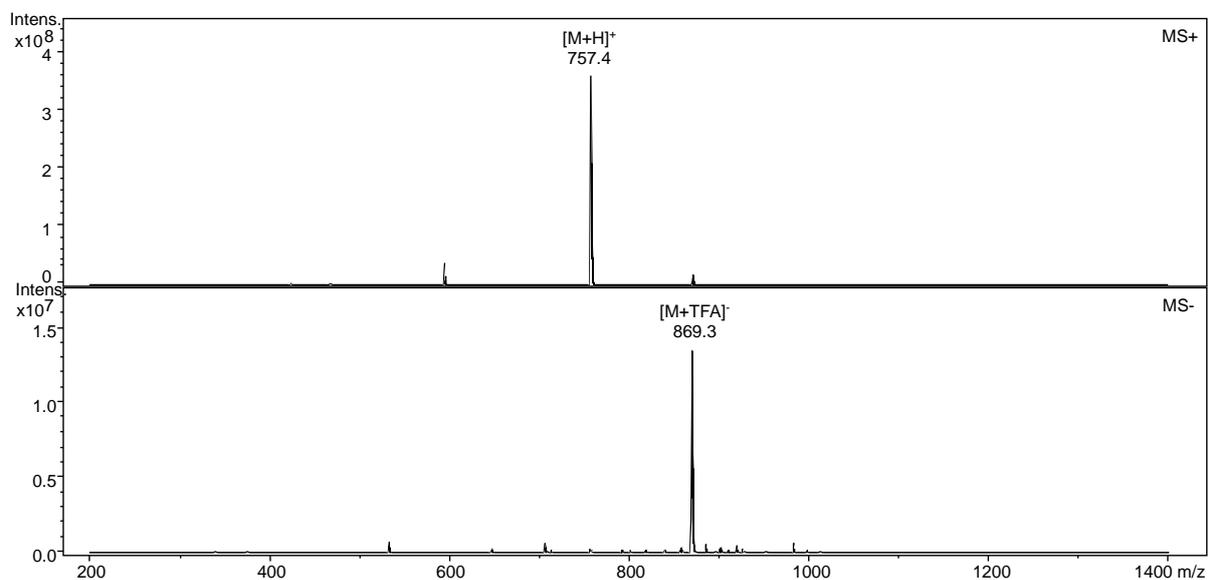
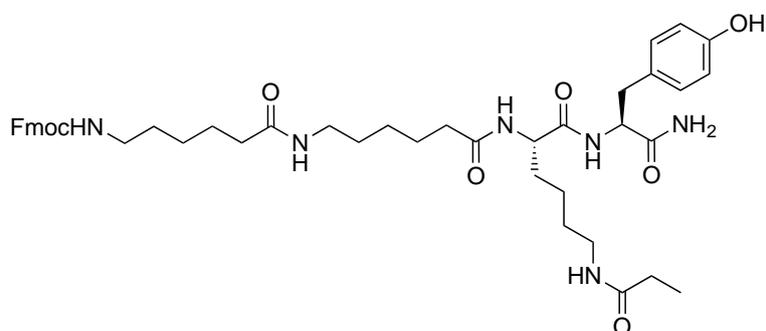


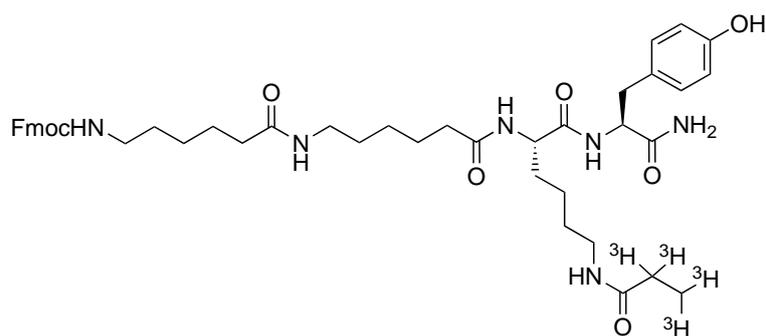
Figure 3 - Spectre de masse ESI-MS du composé **1** en mode positif et négatif.

### Composé **2a** – Fmoc-Ahx<sub>2</sub>-Lys(Pr)-Tyr-NH<sub>2</sub>



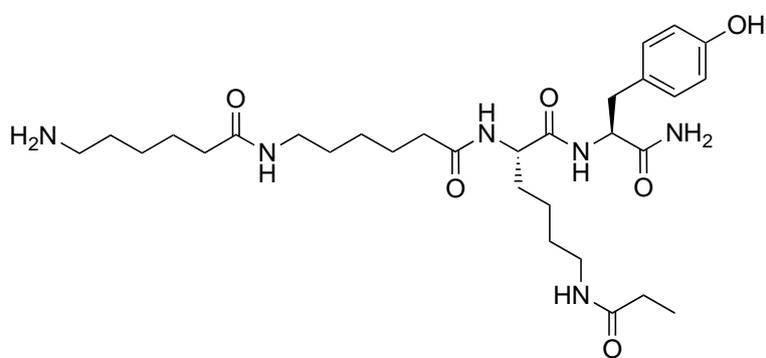
À une solution du composé **1** (2,3 mg ; 3 μmol ; 1 éq.) dans la DMF (50 μL) à température ambiante ont été ajoutés la DIEA (2,5 μL ; 15 μmol ; 5 éq.) et le N-(propionyloxy)succinimide (0,8 mg ; 4,5 μmol ; 1,5 éq.). Le mélange a été agité à température ambiante pendant deux heures, et la réaction a été suivie en HPLC analytique. Le produit **2a** a été engagé dans la suite de la synthèse sans être isolé.

**Composé 2b** – Fmoc-Ahx<sub>2</sub>-Lys([<sup>3</sup>H]Pr)-Tyr-NH<sub>2</sub>



À une solution du composé **1** (0,2 mg ; 260 nmol ; 1 éq.) dans la DMF (50 µL) à température ambiante ont été ajoutés la DIEA (0,5 µL ; 2,6 µmol ; 10 éq.) et le [<sup>3</sup>H]N-(propionyloxy)succinimide (7,8 mCi ; 130 nmol ; 0,5 éq.). Le mélange a été agité à température ambiante pendant deux heures, et la réaction a été suivie en radio-HPLC analytique. Le produit **2b** a été engagé dans la suite de la synthèse sans être isolé.

**Composé 3a** – H<sub>2</sub>N-Ahx<sub>2</sub>-Lys(Pr)-Tyr-NH<sub>2</sub>



Au brut réactionnel du composé **2a** (3 µmol ; 1 éq.) dans la DMF (50 µL) à température ambiante a été ajoutée la piperidine (6,5 µL ; 60 µmol ; 20 éq.). Le mélange a été agité à température ambiante pendant une heure. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **3a** (0,7 mg ; 1,2 µmol ; 40%).

**Purification** : colonne AIT France Kromasil C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA). Temps de rétention : 11,9 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 13,9 minutes.

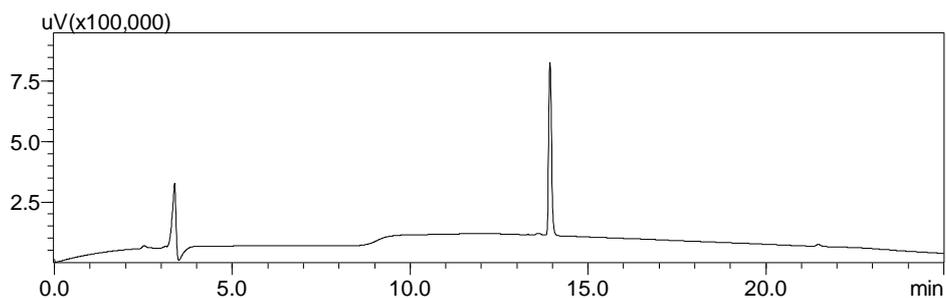


Figure 4 - Profil HPLC analytique du composé **3a**.

**ESI-MS** ( $m/z$ ) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  théorique pour  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{N}_6\text{O}_6$  : 591,38 ;  $[\text{M}+\text{H}]^+$  expérimental : 591,4.  
 $[\text{M}+\text{TFA}]^-$  théorique pour  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{N}_6\text{O}_6$  : 703,28 ;  $[\text{M}+\text{TFA}]^-$  expérimental : 703,3.

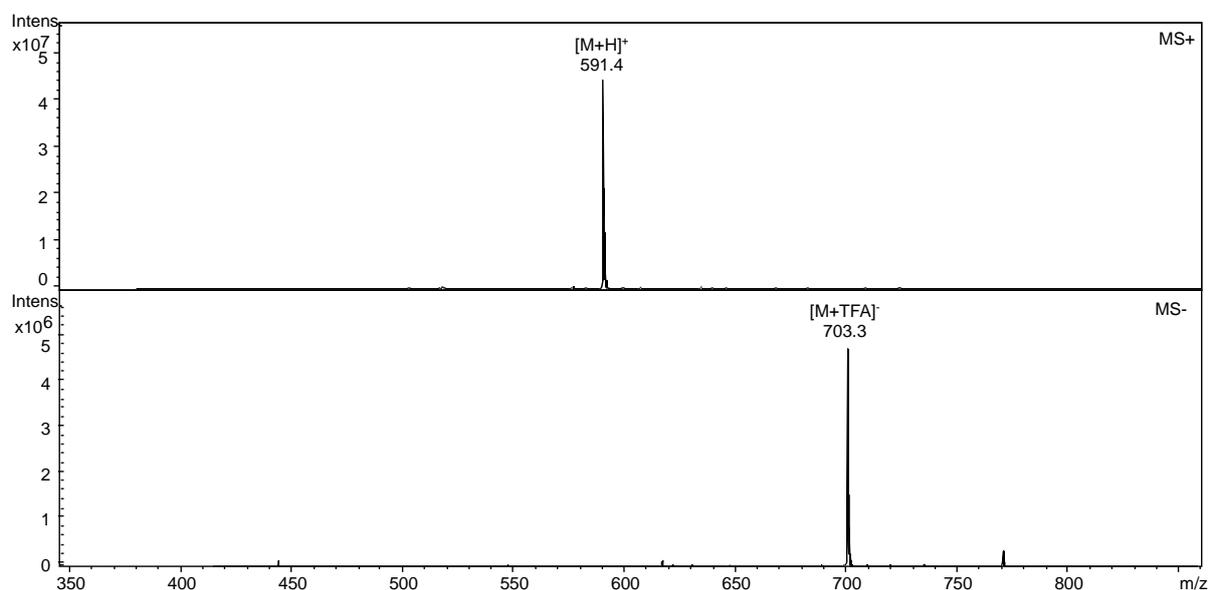
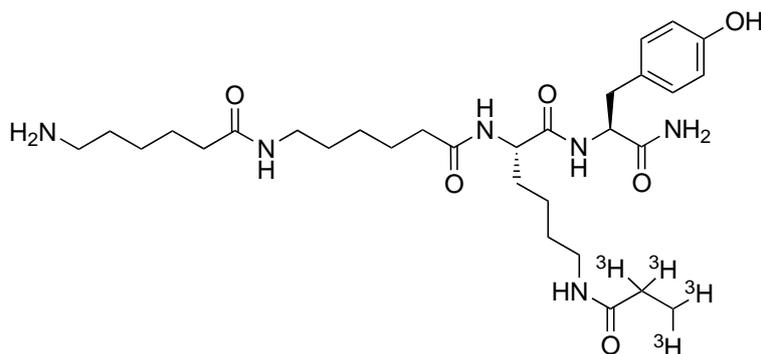


Figure 5 - Spectre de masse ESI-MS du composé **3a** en mode positif et négatif.

Composé **3b** – H<sub>2</sub>N-Ahx<sub>2</sub>-Lys([<sup>3</sup>H]Pr)-Tyr-NH<sub>2</sub>



Au brut réactionnel du composé **2b** (130 nmol ; 1 éq.) dans la DMF (50 µL) à température ambiante a été ajoutée la piperidine (0,3 µL ; 2,6 µmol ; 20 éq.). Le mélange a été agité à température ambiante pendant une heure. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC analytique. Après évaporation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **3b** (2,58 mCi ; 43 nmol ; 33%).

**Purification** : colonne Supelco Ascentis® Express C18 (100 x 4,6 mm ; 2,7 µm), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF). Temps de rétention : 11,0 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Supelco Ascentis® Express C18 (100 x 4,6 mm ; 2,7 µm), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF), détection radioactive par scintillation liquide. Temps de rétention : 11,0 minutes.

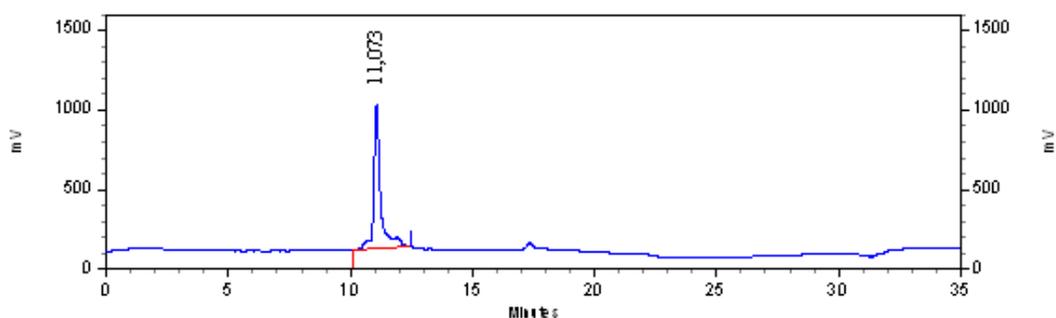


Figure 6 - Profil radio-HPLC analytique du composé **3b**.

**Activité spécifique** : réaction effectuée sans dilution isotopique, le produit a la même activité spécifique que le réactif [<sup>3</sup>H]N-(propionyloxy)succinimide, soit 64 Ci/mmol.

## 2.2 LES SUBSTRATS GLUTAMINE

### 2.2.1 Le substrat CBz-Gln-Gly-Val-Ala

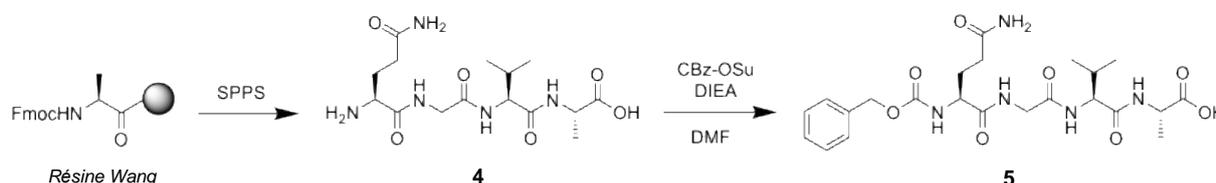
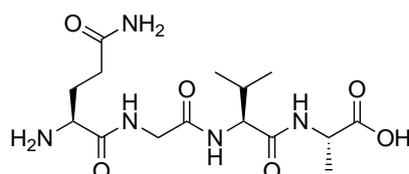


Figure 7 - Voie de synthèse de la molécule modèle 5.

#### Composé 4 – Le térapeptide H<sub>2</sub>N-Gln-Gly-Val-Ala-OH



Le térapeptide a été préparé par synthèse peptidique sur support solide en stratégie Fmoc à partir de la résine Fmoc-Ala-Wang (60 mg ; 25 μmol). Le groupement protecteur Fmoc a été déprotégé par trois traitements successifs de la résine par une solution de piperidine à 20% dans la DMF (2 mL) pendant 3 minutes au micro-onde (25 W ; 60°C). Les acides aminés protégés Fmoc-L-Val-OH (24 mg ; 75 μmol ; 3 éq.), Fmoc-Gly-OH (24 mg ; 75 μmol ; 3 éq.) et Fmoc-L-Gln(Trt)-OH (45 mg ; 150 μmol ; 3 éq.) ont été introduits en double couplage en présence de HATU (23 mg ; 62 μmol ; 2,5 éq.) et de DIEA (20 μL ; 125 μmol ; 5 éq.) dans la DMF (1 mL) pendant 20 minutes au micro-onde. Le peptide synthétisé a été déprotégé et clivé du support solide par un traitement avec une solution de TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (92,5/5/2,5) (5 mL) pendant 2

heures à température ambiante et sous agitation. Le peptide a ensuite été précipité par dilution dans l'éther diéthylique (45 mL) à 0°C, puis récupéré par centrifugation avant d'être solubilisé dans une solution d'acide acétique à 10%. Après congélation et lyophilisation on obtient le produit **4** (5,6 mg ; 15 µmol ; 60%).

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex® C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6 µm), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 11,9 minutes.

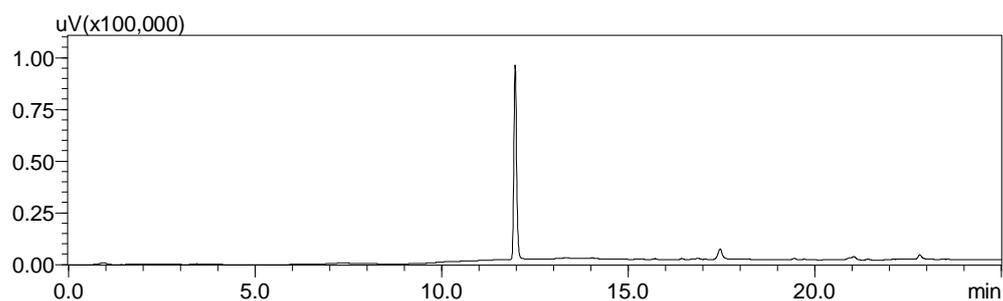


Figure 8 - Profil HPLC analytique du composé **4**.

**ESI-MS** (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>15</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> : 374,20 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 374,1.  
[M+TFA]<sup>-</sup> théorique pour C<sub>15</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> : 486,1 ; [M+TFA]<sup>-</sup> expérimental : 486,0.

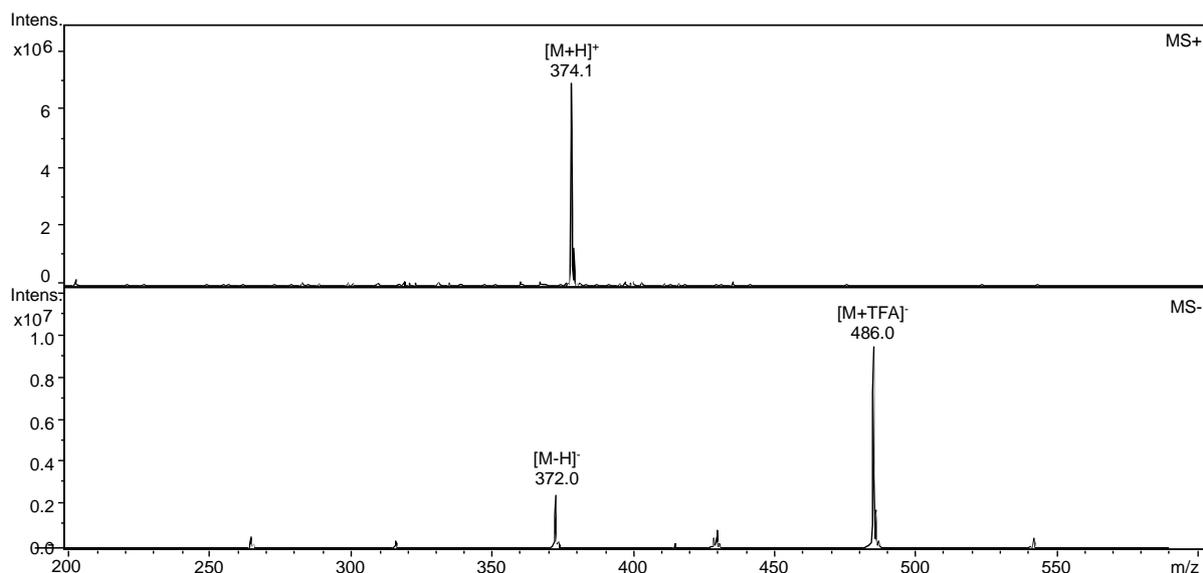
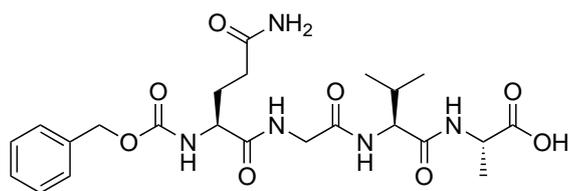


Figure 9 - Spectre de masse ESI-MS du composé **4** en mode positif et négatif.

## Composé 5 – Le térapeptide protégé CBz-Gln-Gly-Val-Ala-OH



À une solution du composé **4** (5,6 mg ; 15  $\mu\text{mol}$  ; 1  $\text{eq.}$ ) dans la DMF (90  $\mu\text{L}$ ) à température ambiante ont été ajoutés la DIEA (5,7  $\mu\text{L}$  ; 37,5  $\mu\text{mol}$  ; 2,5  $\text{eq.}$ ) et le CBz-OSu (4,5 mg ; 18  $\mu\text{mol}$  ; 1,2  $\text{eq.}$ ). Le mélange a été agité à température ambiante pendant deux heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **5** (5,8 mg ; 1,9  $\mu\text{mol}$  ; 75%).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-50% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA). Temps de rétention : 14,1 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 14,6 minutes.

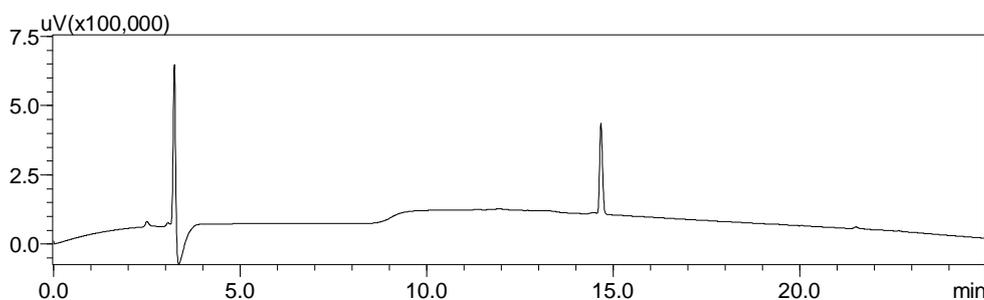


Figure 10 - Profil HPLC analytique du composé **5**.

**ESI-MS** (m/z) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  théorique pour  $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_8$  : 508,23 ;  $[\text{M}+\text{H}]^+$  expérimental : 508,2 ; fragmentation à la source -89,0.  $[\text{M}+\text{TFA}]^-$  théorique pour  $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_8$  : 620,13 ;  $[\text{M}+\text{TFA}]^-$  expérimental : 620,1.

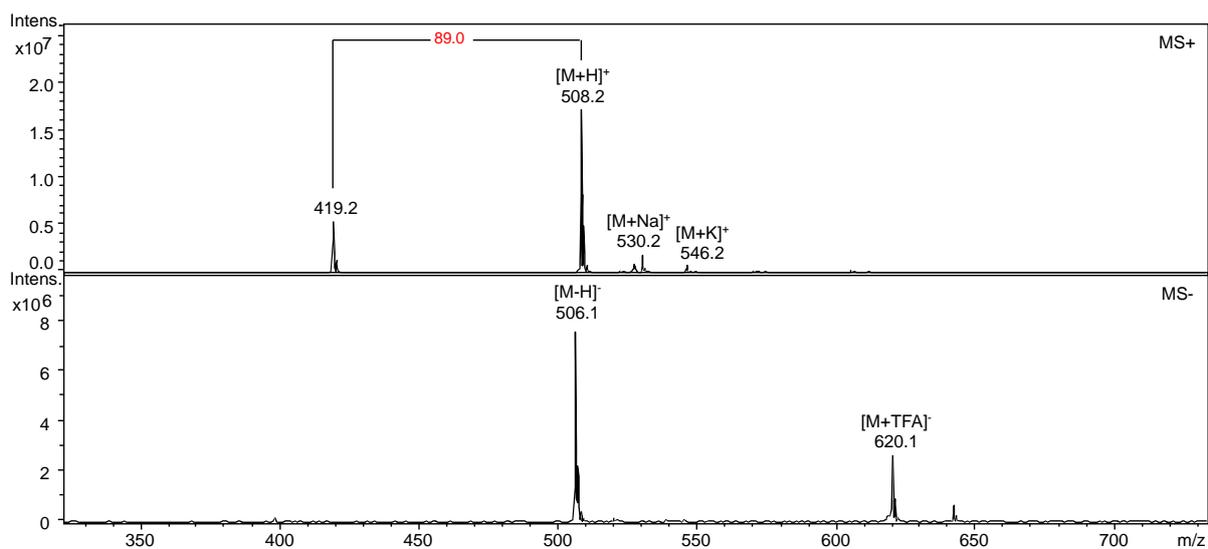


Figure 11 - Spectre de masse ESI-MS du composé **5** en mode positif et négatif.

## 2.2.2 Le substrat CBz-Gln-Gly-Lys(Pr)

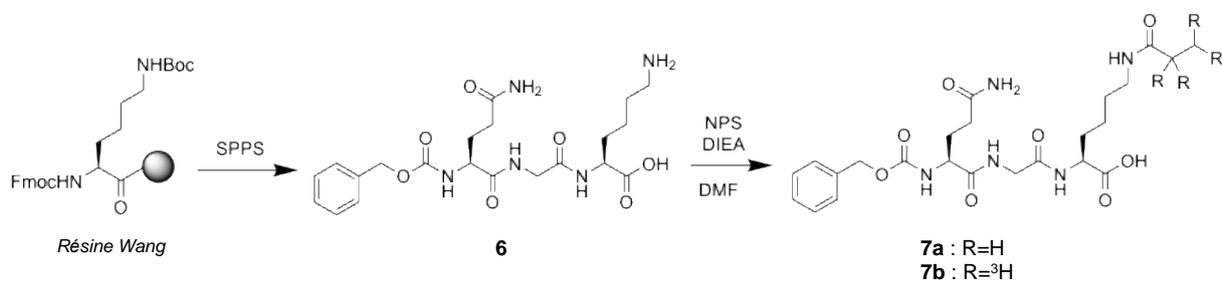
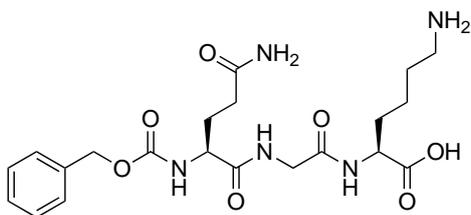


Figure 12 - Voie de synthèse de la molécule modèle **7a/7b**.

### Composé **6** – Le térapeptide protégé CBz-Gln-Gly-Lys-OH



Le tétrapeptide a été préparé par synthèse peptidique sur support solide en stratégie Fmoc à partir de la résine Fmoc-Lys(Boc)-Wang (50 mg ; 15  $\mu\text{mol}$ ). Le groupement protecteur Fmoc a été déprotégé par trois traitements successifs de la résine par une solution de piperidine à 20% dans la DMF (1 mL) pendant 3 minutes au micro-onde (25 W ; 60°C). Les acides aminés protégés Fmoc-Gly-OH (13 mg ; 45  $\mu\text{mol}$  ; 3 éq.) et CBz-L-Gln-OH (12 mg ; 45  $\mu\text{mol}$  ; 3 éq.) ont été introduits en double couplage en présence de HATU (14 mg ; 37,5  $\mu\text{mol}$  ; 2,5 éq.) et de DIEA (13  $\mu\text{L}$  ; 75  $\mu\text{mol}$  ; 5 éq.) dans la DMF (500  $\mu\text{L}$ ) pendant 20 minutes au micro-onde. Le tétrapeptide synthétisé a été déprotégé et clivé du support solide par un traitement avec une solution de TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (92,5/5/2,5) (5 mL) pendant 2 heures à température ambiante et sous agitation. Le pseudopeptide a ensuite été précipité par dilution dans l'éther diéthylique (45 mL) à 0°C, puis récupéré par centrifugation avant d'être solubilisé dans une solution d'acide acétique à 10%. Après congélation et lyophilisation on obtient le produit **6** (3,9 mg ; 8,4  $\mu\text{mol}$  ; 56%).

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex® C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 13,3 minutes.

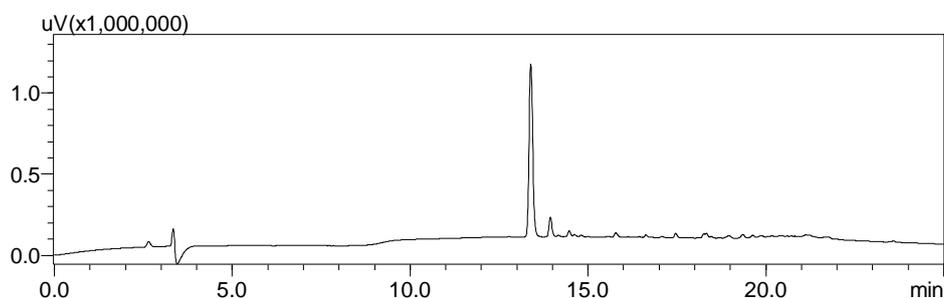


Figure 13 - Profil HPLC analytique du composé **6**.

**ESI-MS** (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> : 466,22 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 466,2.  
[M+TFA]<sup>-</sup> théorique pour C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> : 578,12 ; [M+TFA]<sup>-</sup> expérimental : 578,1.

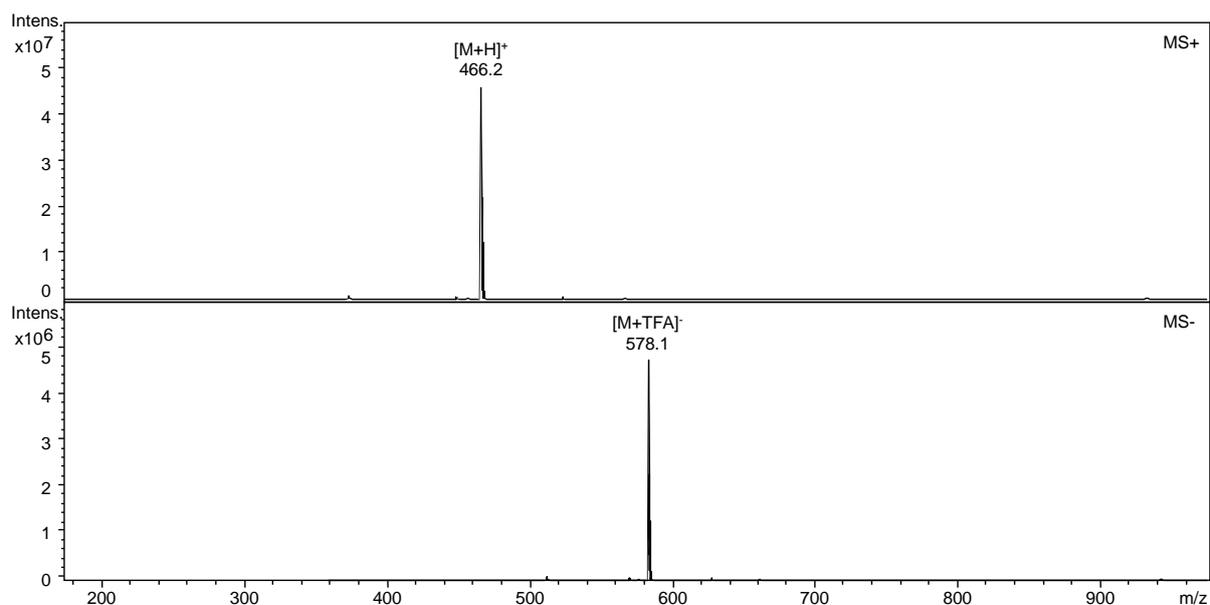
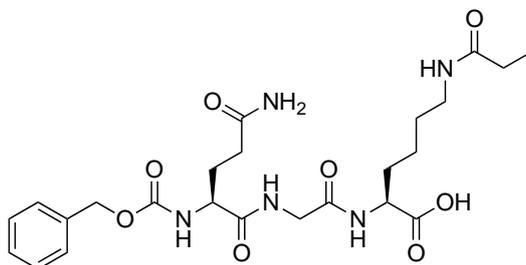


Figure 14 - Spectre de masse ESI-MS du composé **6** en mode positif et négatif.

### Composé **7a** – Le térapeptide protégé CBz-Gln-Gly-Lys(Pr)-OH



À une solution du composé **6** (3,9 mg ; 8,4  $\mu\text{mol}$  ; 1 éq.) dans la DMF (100  $\mu\text{L}$ ) à température ambiante ont été ajoutés la DIEA (7  $\mu\text{L}$  ; 41  $\mu\text{mol}$  ; 5 éq.) et le N-(propionyloxy)succinimide (2,2 mg ; 12,5  $\mu\text{mol}$  ; 1,5 éq.). Le mélange a été agité à température ambiante pendant deux heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **7a** (2,1 mg ; 4  $\mu\text{mol}$  ; 48%).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA). Temps de rétention : 9,9 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex® C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu$ m), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 15,1 minutes.

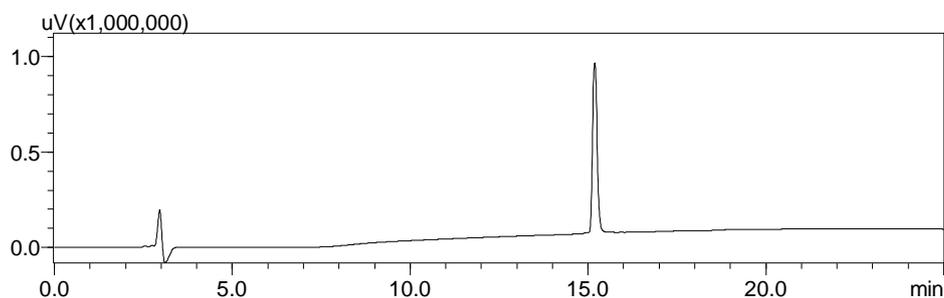


Figure 15 - Profil HPLC analytique du composé **7a**.

**ESI-MS** (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>24</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub> : 522,25 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 522,3.  
[M+TFA]<sup>-</sup> théorique pour C<sub>24</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub> : 634,15 ; [M+TFA]<sup>-</sup> expérimental : 634,2.

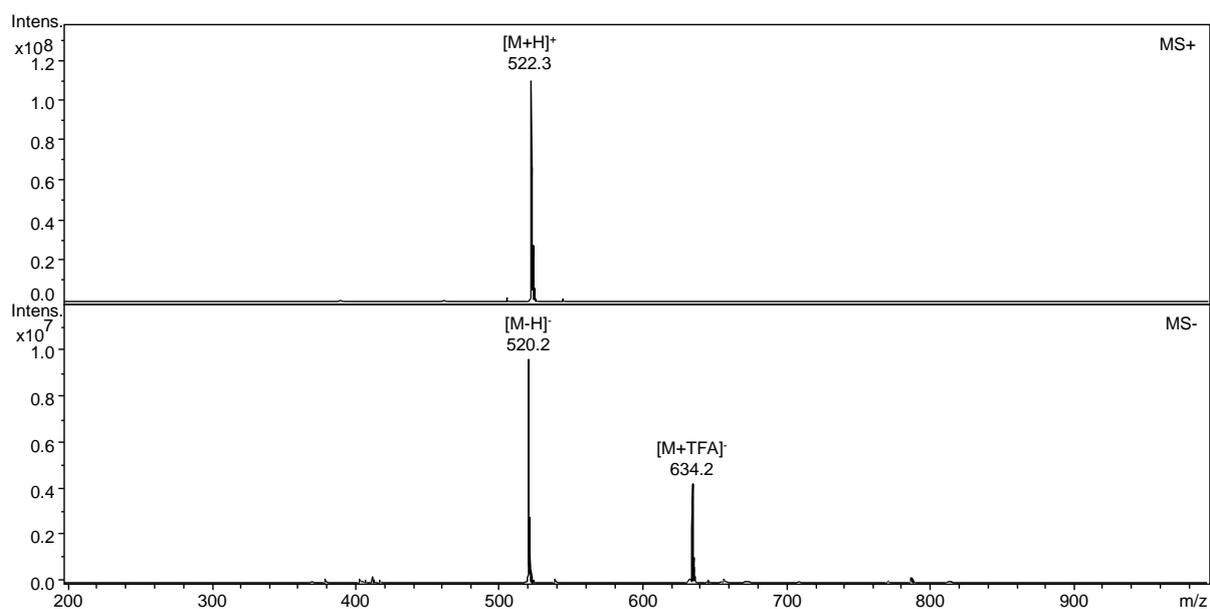
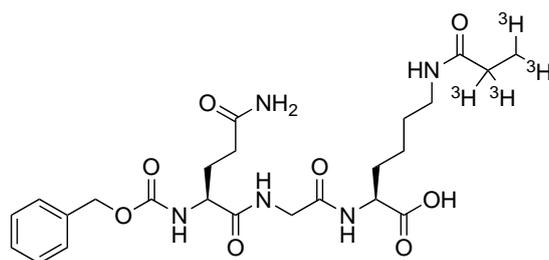


Figure 16 - Spectre de masse ESI-MS du composé **7a** en mode positif et négatif.

### Composé 7b – Le tétrapeptide protégé CBz-Gln-Gly-Lys(<sup>3</sup>H)Pr)-OH



À une solution du composé **6** (40 µg ; 87 nmol ; 1 éq.) dans la DMF (50 µL) à température ambiante ont été ajoutés la DIEA (0,2 µL ; 870 nmol ; 10 éq.) et le [<sup>3</sup>H]N-(propionyloxy)succinimide (5,6 mCi ; 87 nmol ; 1 éq.). Le mélange a été agité à température ambiante pendant deux heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC analytique. Après évaporation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **7b** (638 µCi ; 10 nmol ; 11%).

**Purification** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3 µm), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF). Temps de rétention : 15,1 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3 µm), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF), détection radioactive par scintillation liquide. Temps de rétention : 15,1 minutes.

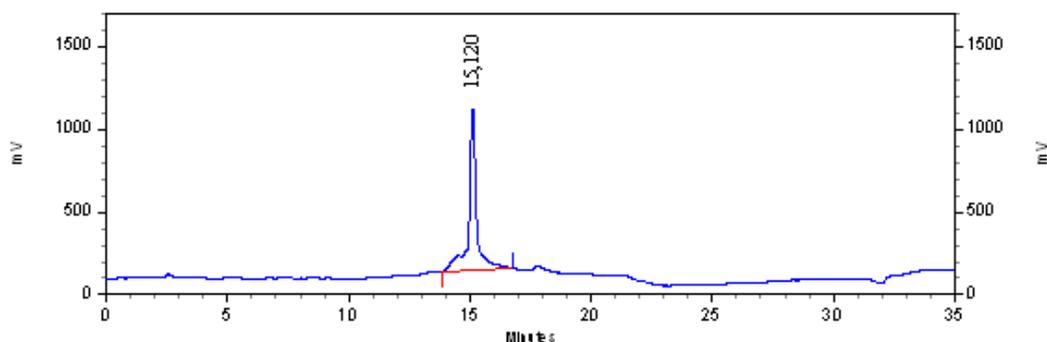


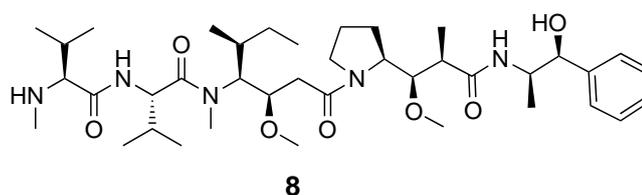
Figure 17 - Profil radio-HPLC analytique du composé **7b**.

**Activité spécifique** : réaction effectuée sans dilution isotopique, le produit a la même activité spécifique que le réactif [<sup>3</sup>H]N-(propionyloxy)succinimide, soit 64 Ci/mmol.

### 3 RADIOMARQUAGE AU TRITIUM DE LA MONOMÉTHYLE AURISTATINE (MMAE) ET SYNTHÈSE DES LINKER-CYTOTOXIQUE

---

#### 3.1 RADIOMARQUAGE DE LA MMAE



En boîte à gants sous atmosphère d'argon, une quantité catalytique (<1mg) de nanoparticules de ruthénium Ru@NHC ICy a été placée dans une bouteille Fisher-Porter de 10 mL. Une solution de MMAE (4 mg ; 5,57  $\mu\text{mol}$ ) dans le THF anhydre (125  $\mu\text{L}$ ) a été ajoutée sur les nanoparticules. La bouteille Fisher-Porter a été transférée en boîte à gants radioactive et connectée à une bouteille de tritium gaz. Après congélation du milieu réactionnel dans l'azote liquide, la bouteille a été mise sous vide puis sous atmosphère de tritium (880 mbars). Après le retour à température ambiante, le milieu réactionnel a été chauffé à 55°C sous agitation pendant 16 heures. Après élimination des nanoparticules par filtration, le THF a été évaporé et la molécule marquée **8** (250 mCi) a été remise en solution dans l'EtOH à une concentration de 0,73 mCi/mL pour être stockée.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF), détection radioactive par scintillation liquide. Temps de rétention : 14,5 minutes.

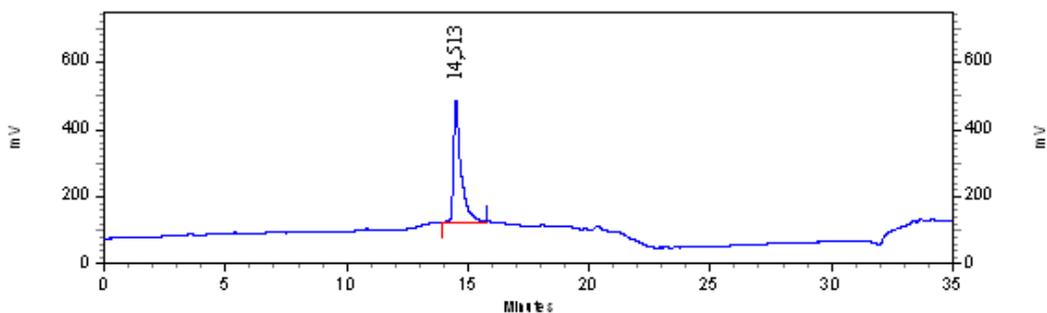


Figure 18 - Profil radio-HPLC analytique du composé **8**.

MALDI-MS (m/z) :  $[M+H]^+$  expérimental : 724,5594, correspondant à l'isotopologue majoritaire  $C_{39}H_{64}N_5O_7T_3$ .

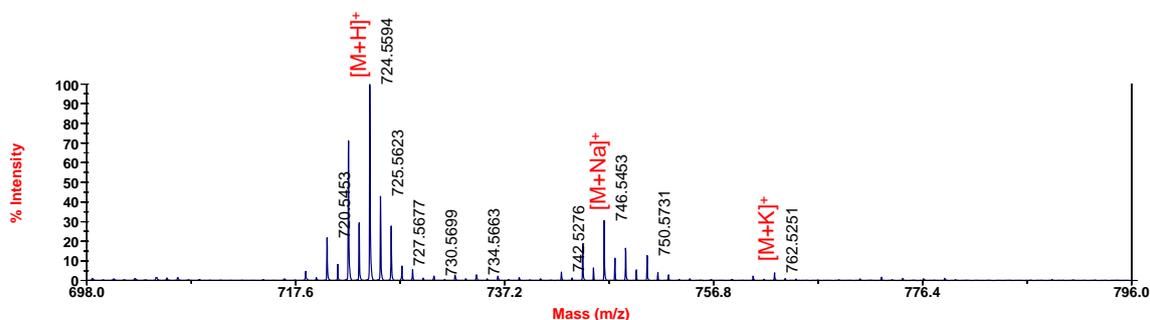


Figure 19 - Spectre de masse MALDI-TOF du composé **8**.

**Activité spécifique** : abondance isotopique moyenne déterminée sur  $[M+H]^+$  : 2,6 atomes de tritium par molécule de MMAE. Soit une activité spécifique de 74 Ci/mmol.

ISOTOPOLOGUE	M+1 ( $T_0$ )	M+3 ( $T_1$ )	M+5 ( $T_2$ )	M+7 ( $T_3$ )	M+9 ( $T_4$ )	M+11 ( $T_5$ )
M/Z	718,5	720,5	722,5	724,5	726,5	728,5
ABONDANCE	2%	10%	32%	44%	10%	2%

Tableau 1 - Abondance relative des différents isotopologues de la molécule marquée **8**.

## 3.2 LES LINKER-CYTOTOXIQUES NON-CLIVABLES

### 3.2.1 Le linker-cytotoxique maléimide

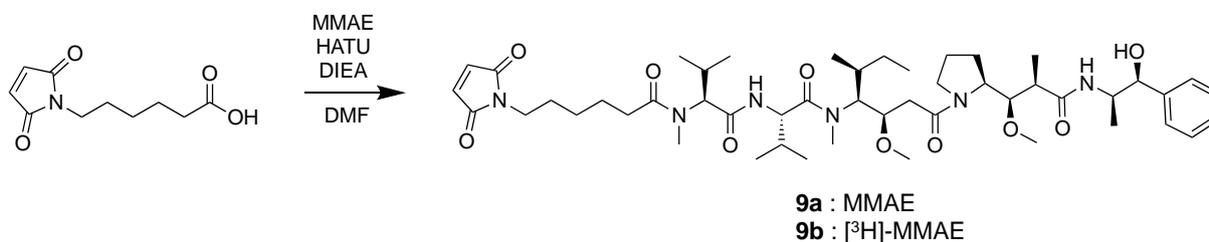
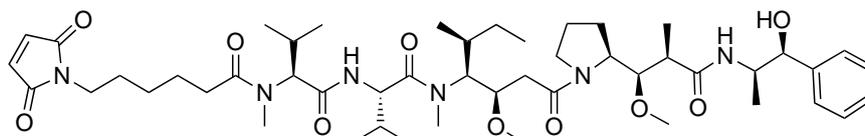


Figure 20 - Voie de synthèse du linker-cytotoxique non-clivable **9a/9b**.

#### Composé **9a** – Mc-MMAE



À une solution d'acide 6-maléimidocaproïque (2,7 mg ; 13  $\mu\text{mol}$  ; 2 éq.) dans la DMF (65  $\mu\text{L}$ ) à température ambiante ont été ajoutés la DIEA (2,5  $\mu\text{L}$  ; 16,2  $\mu\text{mol}$  ; 2,5 éq.) et le HATU (3,6 mg ; 9,7  $\mu\text{mol}$  ; 1,5 éq.). Le mélange a été agité à température ambiante quelques instants avant d'ajouter la MMAE (5 mg ; 6,5  $\mu\text{mol}$  ; 1 éq.) et de poursuivre l'agitation pendant deux heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **9a** (5 mg ; 5,5  $\mu\text{mol}$  ; 83%).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA). Temps de rétention : 14,6 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex® C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu\text{m}$ ), gradient 20-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 14,9 minutes.

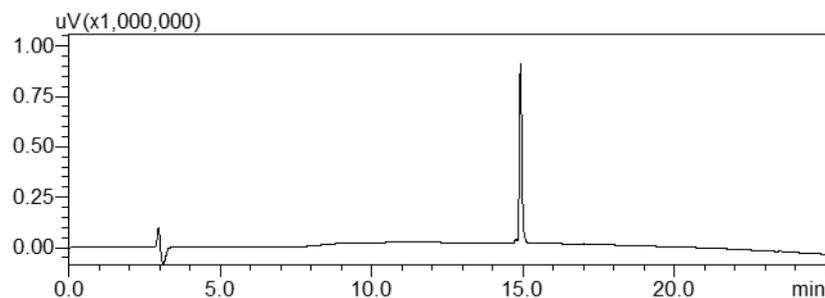


Figure 21 - Profil HPLC analytique du composé **9a**.

ESI-MS (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>49</sub>H<sub>78</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub> : 911,58 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimentale : 911,6.  
[M+TFA]<sup>-</sup> théorique pour C<sub>49</sub>H<sub>78</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub> : 1023,56 ; [M+TFA]<sup>-</sup> expérimentale : 1023,5.

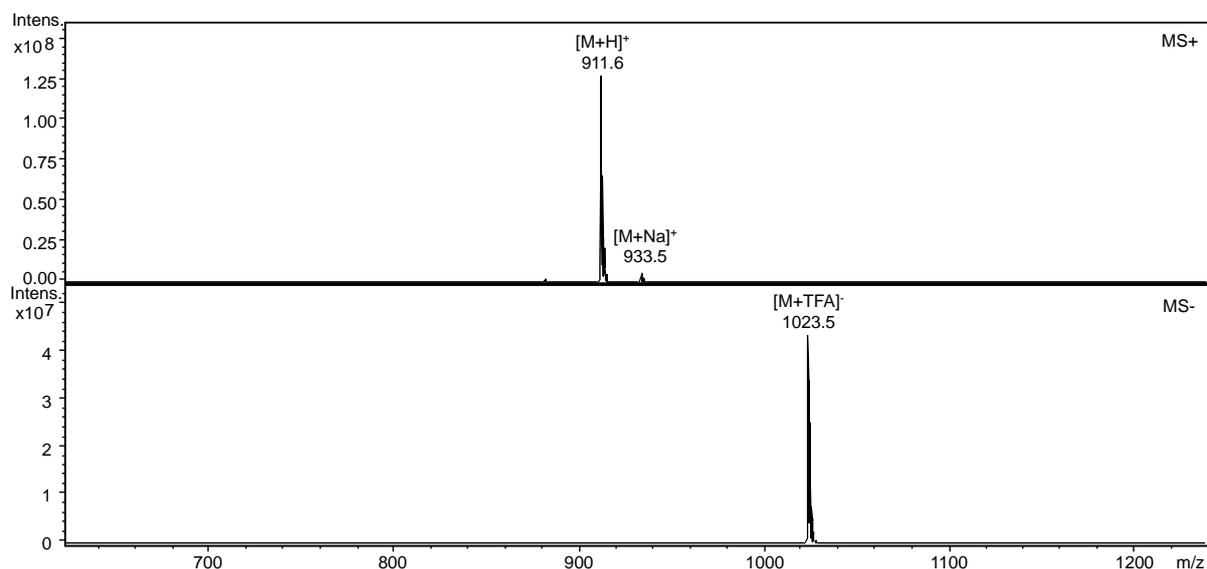


Figure 22 - Spectre de masse ESI-MS du composé **9a** en mode positif et négatif.

### Composé **9b** – Mc-[<sup>3</sup>H]MMAE

À une solution d'acide 6-maléimidocaproïque (13 µg ; 62,5 nmol ; 5 éq.) dans la DMF (20 µL) à température ambiante ont été ajoutés la DIEA (20 nL ; 125 nmol ; 10 éq.) et le HATU (19 µg ; 50 nmol ; 4 éq.). Le mélange a été agité à température ambiante quelques instants avant d'ajouter un mélange de la molécule marquée **8** (188 µCi ; 2,5 nmol ; 0,2 éq.) et de la MMAE (7 µg ; 10 nmol ; 0,8 éq.) et de poursuivre l'agitation pendant quatre heures. Le produit d'intérêt

a été isolé par purification en HPLC analytique. Après évaporation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **9b** (60  $\mu$ Ci ; 4 nmol ; 32%).

**Purification** : colonne Phenomenex Luna<sup>®</sup> Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3  $\mu$ m), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF). Temps de rétention : 20,4 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Luna<sup>®</sup> Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3  $\mu$ m), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF), détection radioactive par scintillation liquide. Temps de rétention : 20,4 minutes.

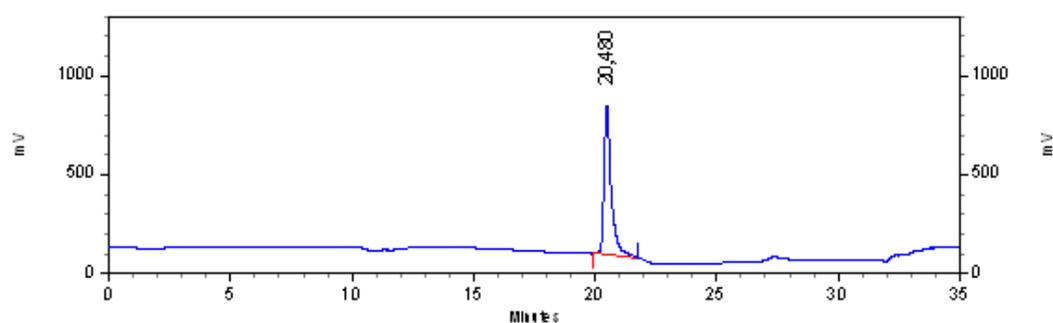


Figure 23 - Profil radio-HPLC analytique du composé **9b**.

**MALDI-MS** (m/z) : [M+Na]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>49</sub>H<sub>78</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub> : 933,5877 ; [M+Na]<sup>+</sup> expérimental : 933,5825. [M+K]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>49</sub>H<sub>78</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub> : 949,5516 ; [M+K]<sup>+</sup> expérimental : 949,5521.

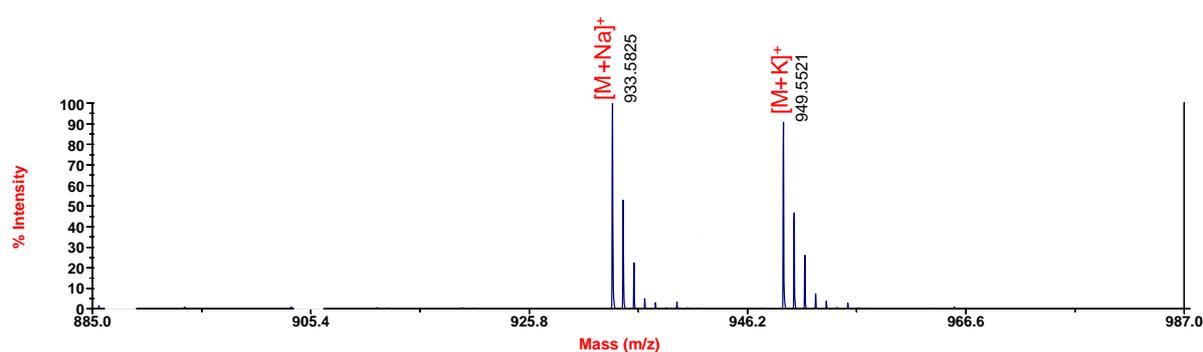


Figure 24 - Spectre de masse MALDI-TOF du composé **9b**.

**Activité spécifique** : dilution isotopique avec 80% de MMAE non marquée conduisant à une abondance isotopique moyenne 0,5 atomes de tritium par molécule de MMAE. Soit une activité spécifique de 15 Ci/mmol.

ISOTOPOLOGUE	M+1 (T <sub>0</sub> )	M+3 (T <sub>1</sub> )	M+5 (T <sub>2</sub> )	M+7 (T <sub>3</sub> )	M+9 (T <sub>4</sub> )	M+11 (T <sub>5</sub> )
M/Z	911,5	913,5	915,5	917,5	919,5	921,5
ABONDANCE	80,4%	2,0%	6,4%	8,8%	2,0%	0,4%

Tableau 11 - Abondance relative des différents isotopologues de la molécule marquée **9b**.

### 3.2.2 Le linker-cytotoxique maléimide auto-hydrolysable

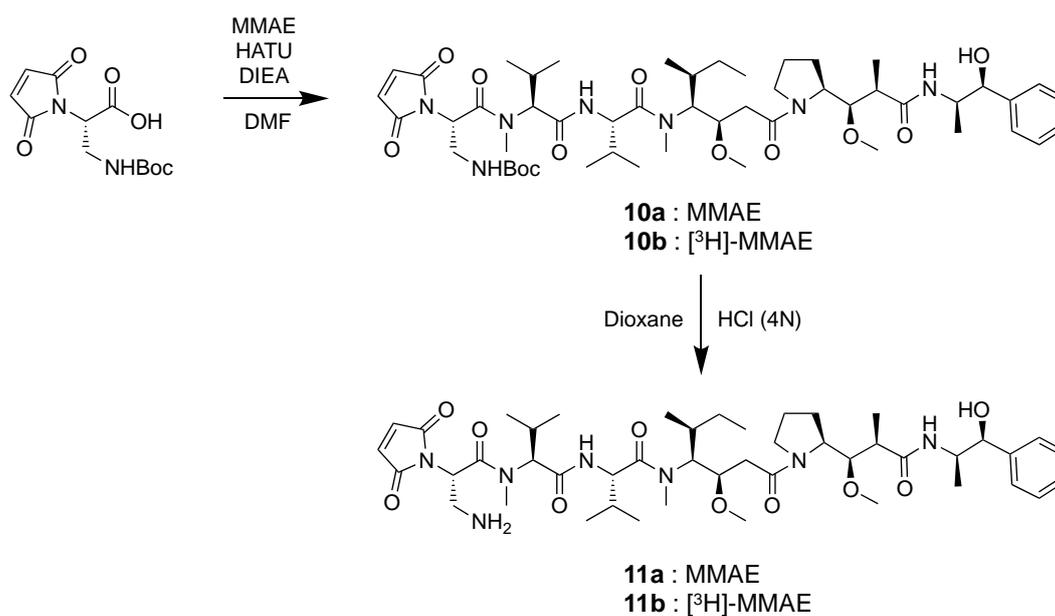


Figure 25 - Voie de synthèse du linker-cytotoxique non-clivable **11a/11b**.



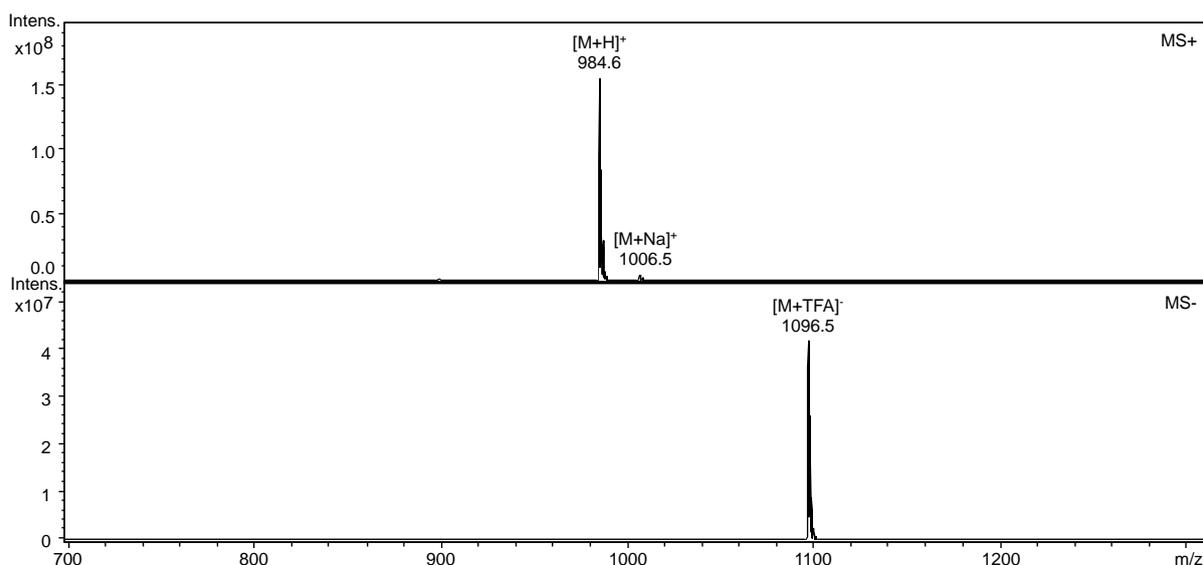


Figure 27 - Spectre de masse ESI-MS du composé **10a** en mode positif et négatif.

### Composé **10b** – Mal-Dap(Boc)- $^3\text{H}$ MMAE

À une solution d'acide Mal-L-Dap(Boc)-OH\*DCHA (24  $\mu\text{g}$  ; 52,5 nmol ; 5 éq.) dans la DMF (20  $\mu\text{L}$ ) à température ambiante ont été ajoutés la DIEA (17 nL ; 105 nmol ; 10 éq.) et le HATU (16  $\mu\text{g}$  ; 42 nmol ; 4 éq.). Le mélange a été agité à température ambiante quelques instants avant d'ajouter un mélange de la molécule marquée **8** (157  $\mu\text{Ci}$  ; 2,1 nmol ; 0,2 éq.) et de la MMAE (6  $\mu\text{g}$  ; 8,4 nmol ; 0,8 éq.) et de poursuivre l'agitation pendant quatre heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC analytique. Après évaporation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **10b** (50  $\mu\text{Ci}$  ; 3,3 nmol ; 31%).

**Purification** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% AF et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,1% AF). Temps de rétention : 20,6 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% AF et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,1% AF), détection radioactive par scintillation liquide. Temps de rétention : 20,6 minutes.

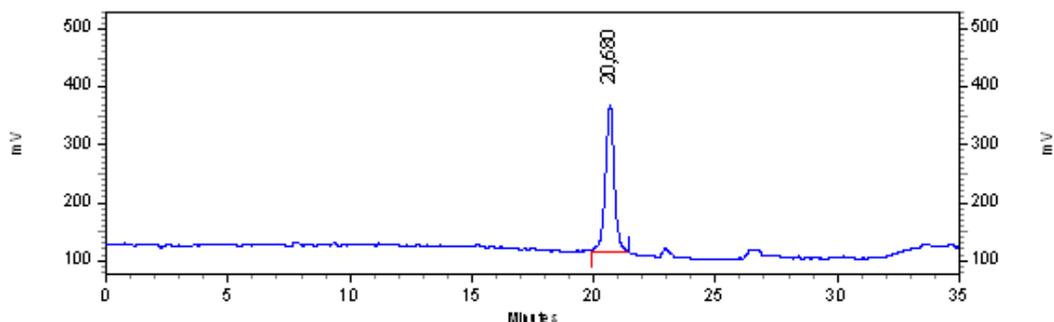


Figure 28 - Profil radio-HPLC analytique du composé **10b**.

MALDI-MS (m/z) : [M+Na]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>51</sub>H<sub>81</sub>N<sub>7</sub>O<sub>12</sub> : 1006,6841 ; [M+Na]<sup>+</sup> expérimental : 1006,6786. [M+K]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>51</sub>H<sub>81</sub>N<sub>7</sub>O<sub>12</sub> : 1022,6580 ; [M+K]<sup>+</sup> expérimental : 1022,6533.

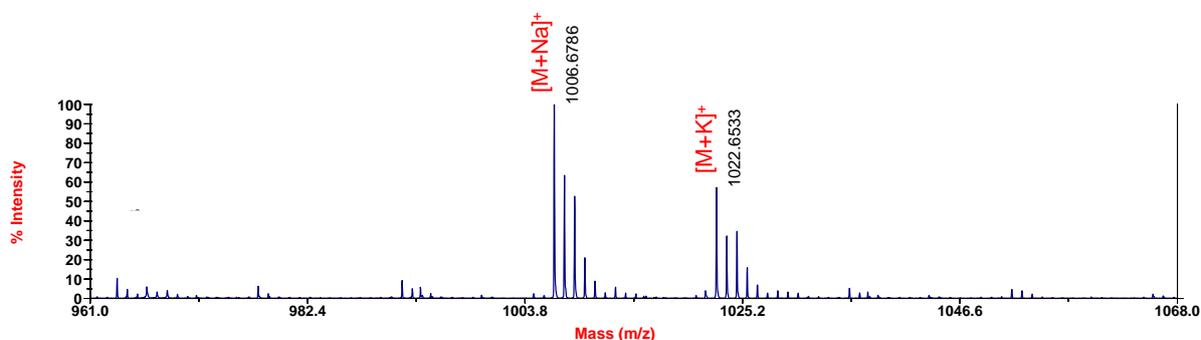


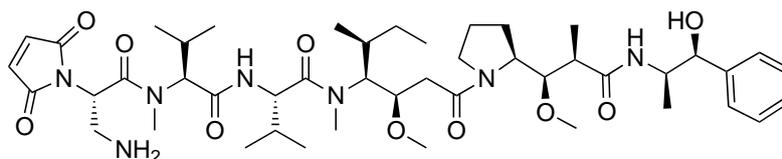
Figure 29 - Spectre de masse MALDI-TOF du composé **10b**.

**Activité spécifique** : dilution isotopique avec 80% de MMAE non marquée conduisant à une abondance isotopique moyenne 0,5 atomes de tritium par molécule de MMAE. Soit une activité spécifique de 15 Ci/mmol.

ISOTOPOLOGUE	M+1 (T <sub>0</sub> )	M+3 (T <sub>1</sub> )	M+5 (T <sub>2</sub> )	M+7 (T <sub>3</sub> )	M+9 (T <sub>4</sub> )	M+11 (T <sub>5</sub> )
M/Z	1006,6	1008,6	1010,6	1012,6	1014,6	1016,6
ABONDANCE	80,4%	2,0%	6,4%	8,8%	2,0%	0,4%

Tableau 3 - Abondance relative des différents isotopologues de la molécule marquée **10b**.

### Composé 11a – Mal-Dap-MMAE



Le composé **10a** (3 mg ; 3  $\mu\text{mol}$ ) a été dissout dans une solution de HCl à 4N dans le dioxane (100  $\mu\text{L}$ ) et le mélange a été agité à température ambiante pendant 1 heure. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **11a** (2,1 mg ; 2,3  $\mu\text{mol}$  ; 77%).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-60% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA). Temps de rétention : 16,3 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 16,8 minutes.

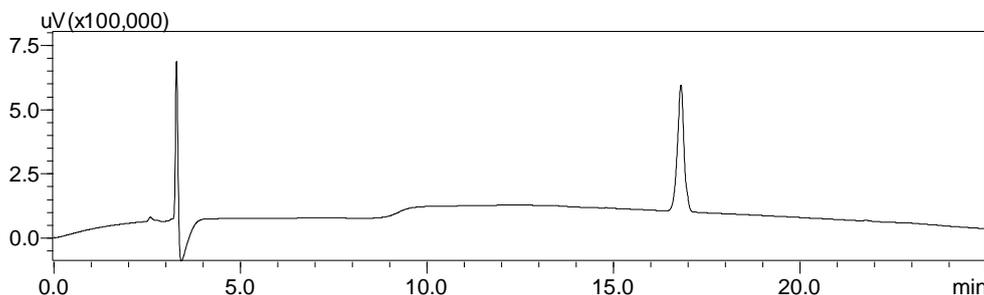


Figure 30 - Profil HPLC analytique du composé **11a**.

**ESI-MS** (m/z) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  théorique pour  $\text{C}_{46}\text{H}_{73}\text{N}_7\text{O}_{10}$  : 884,54 ;  $[\text{M}+\text{H}]^+$  expérimental : 884,5.  
 $[\text{M}+\text{TFA}]^-$  théorique pour  $\text{C}_{46}\text{H}_{73}\text{N}_7\text{O}_{10}$  : 996,53 ;  $[\text{M}+\text{TFA}]^-$  expérimental : 996,5.

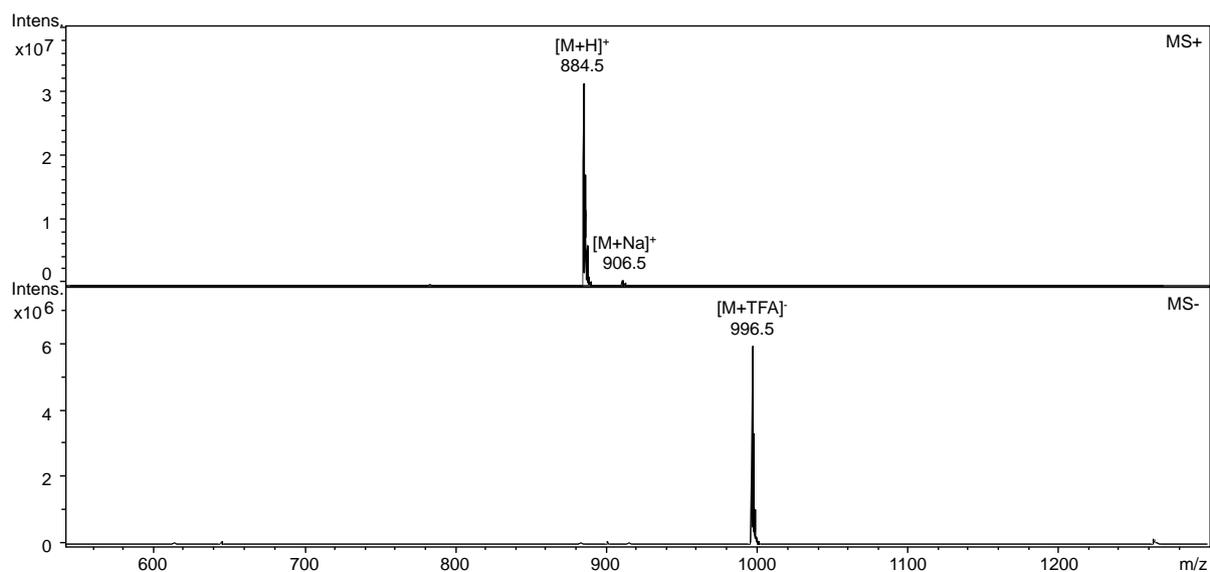


Figure 31 - Spectre de masse ESI-MS du composé **11a** en mode positif et négatif.

### Composé **11b** – Mal-Dap-[<sup>3</sup>H]MMAE

Le composé **10b** (23  $\mu$ Ci ; 1,5 nmol) a été dissout dans une solution de HCl à 4N dans le dioxane (20  $\mu$ L) et le mélange a été agité à température ambiante pendant 1 heure. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC analytique. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **11b** (16  $\mu$ Ci ; 1 nmol ; 66%).

**Purification** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3  $\mu$ m), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF). Temps de rétention : 15,3 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3  $\mu$ m), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF), détection radioactive par scintillation liquide. Temps de rétention : 15,3 minutes.

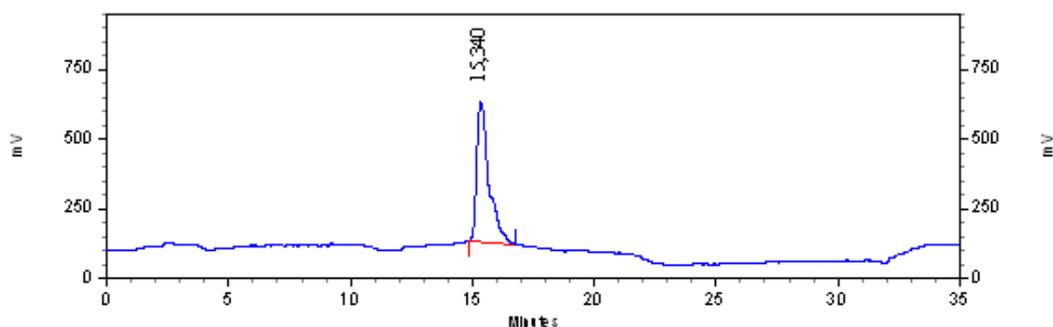


Figure 32 - Profil radio-HPLC analytique du composé **11b**.

MALDI-MS (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>46</sub>H<sub>73</sub>N<sub>7</sub>O<sub>10</sub> : 884,5598 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 884,4918. [M+Na]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>46</sub>H<sub>73</sub>N<sub>7</sub>O<sub>10</sub> : 906,5316 ; [M+Na]<sup>+</sup> expérimental : 906,4702. [M+K]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>46</sub>H<sub>73</sub>N<sub>7</sub>O<sub>10</sub> : 920,5056 ; [M+K]<sup>+</sup> expérimental : 920,4659.

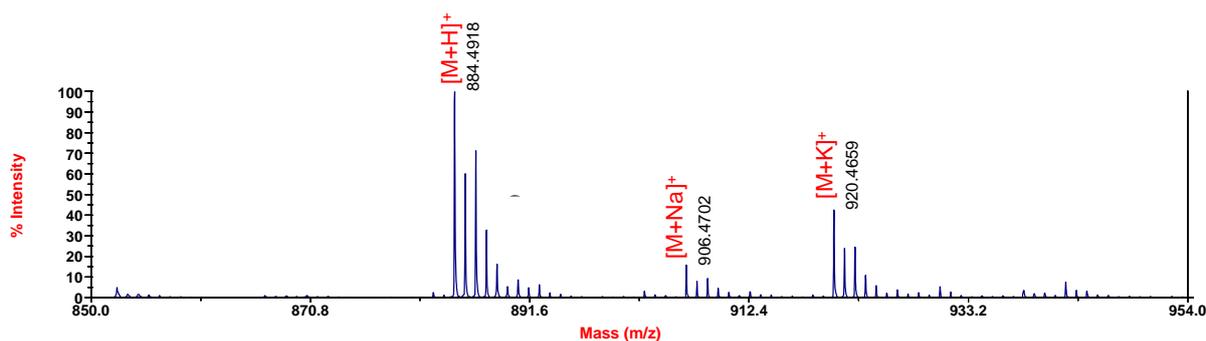


Figure 33 - Spectre de masse MALDI-TOF du composé **11b**.

**Activité spécifique** : dilution isotopique avec 80% de MMAE non marquée conduisant à une abondance isotopique moyenne 0,5 atomes de tritium par molécule de MMAE. Soit une activité spécifique de 15 Ci/mmol.

ISOTOPOLOGUE	M+1 (T <sub>0</sub> )	M+3 (T <sub>1</sub> )	M+5 (T <sub>2</sub> )	M+7 (T <sub>3</sub> )	M+9 (T <sub>4</sub> )	M+11 (T <sub>5</sub> )
M/Z	884,4	886,4	888,4	890,4	892,4	894,4
ABONDANCE	80,4%	2,0%	6,4%	8,8%	2,0%	0,4%

Tableau 4 - Abondance relative des différents isotopologues de la molécule marquée **11b**.

### 3.2.3 Le linker-cytotoxique glutamine

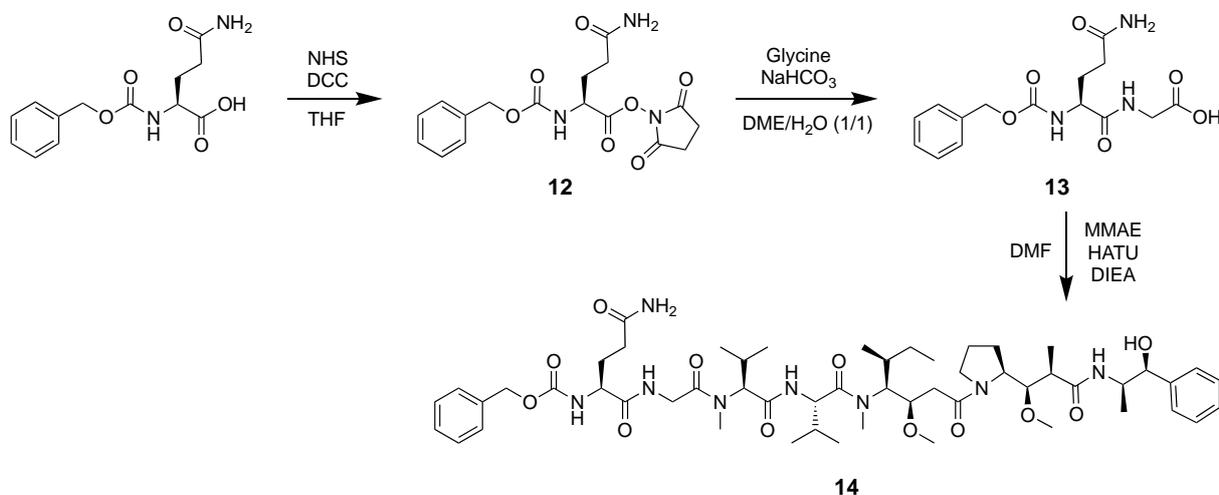
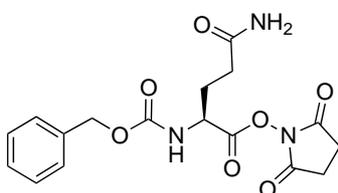


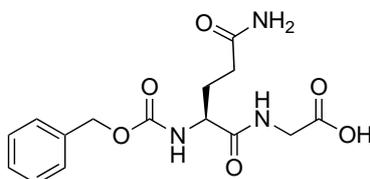
Figure 34 - Voie de synthèse du linker-cytotoxique non-clivable **14**.

#### Composé **12** – CBz-Gln-OSu



Une solution de CBz-L-Gln-OH (200 mg ; 712  $\mu$ mol ; 1  $\text{eq.}$ ) et de NHS (80 mg ; 712  $\mu$ mol ; 1  $\text{eq.}$ ) dans le THF anhydre (2 mL) a été refroidie à 0°C avant d'ajouter le DCC (146 mg ; 712  $\mu$ mol ; 1  $\text{eq.}$ ). Après 15 minutes à 0°C, la réaction a été agitée pendant deux heures supplémentaires à température ambiante. Le sous-produit DCU insoluble formé durant la réaction a été éliminé par filtration, et le filtrat a été évaporé pour obtenir le produit **12** qui a été engagé dans la suite de la synthèse sans étape de purification.

### Composé **13** – CBZ-Gln-Gly-OH



À une solution de **12** (260 mg ; 712  $\mu\text{mol}$  ; 1 éq.) dans le DME (1 mL) à température ambiante, a été ajoutée une solution de glycine (58 mg ; 783  $\mu\text{mol}$  ; 1,1 éq.) et de  $\text{NaHCO}_3$  (65 mg ; 783  $\mu\text{mol}$  ; 1,1 éq.) dans l'eau (1 mL). Du THF (0,5 mL) a été ajouté pour permettre une complète solubilité. La réaction a été agitée pendant une nuit à température ambiante. Une solution aqueuse d'acide citrique 15% (8 mL) a été ajoutée jusqu'à la neutralité de pH et le mélange a ensuite été extrait deux fois à l'AcOEt (10 mL). Les phases organiques ont ensuite été collectées, séchées sur  $\text{MgSO}_4$  et le solvant a été évaporé pour donner le produit **13** qui a été engagé dans la suite de la synthèse sans étape de purification.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 13,9 minutes.

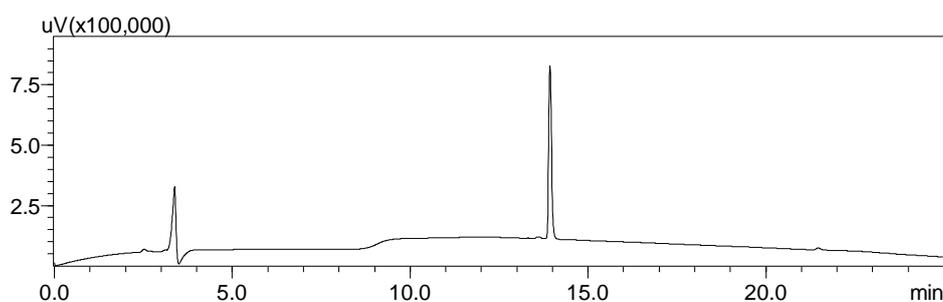


Figure 35 - Profil HPLC analytique du composé **13**.

**ESI-MS** ( $m/z$ ) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  théorique pour  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_6$  : 338,13 ;  $[\text{M}+\text{H}]^+$  expérimental : 338,1.  $[\text{M}-\text{H}]^-$  théorique pour  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_6$  : 336,1 ;  $[\text{M}-\text{H}]^-$  expérimental : 336,0.  $[\text{M}+\text{TFA}]^+$  théorique pour  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_6$  : 450,03 ;  $[\text{M}+\text{H}]^+$  expérimental : 449,9.

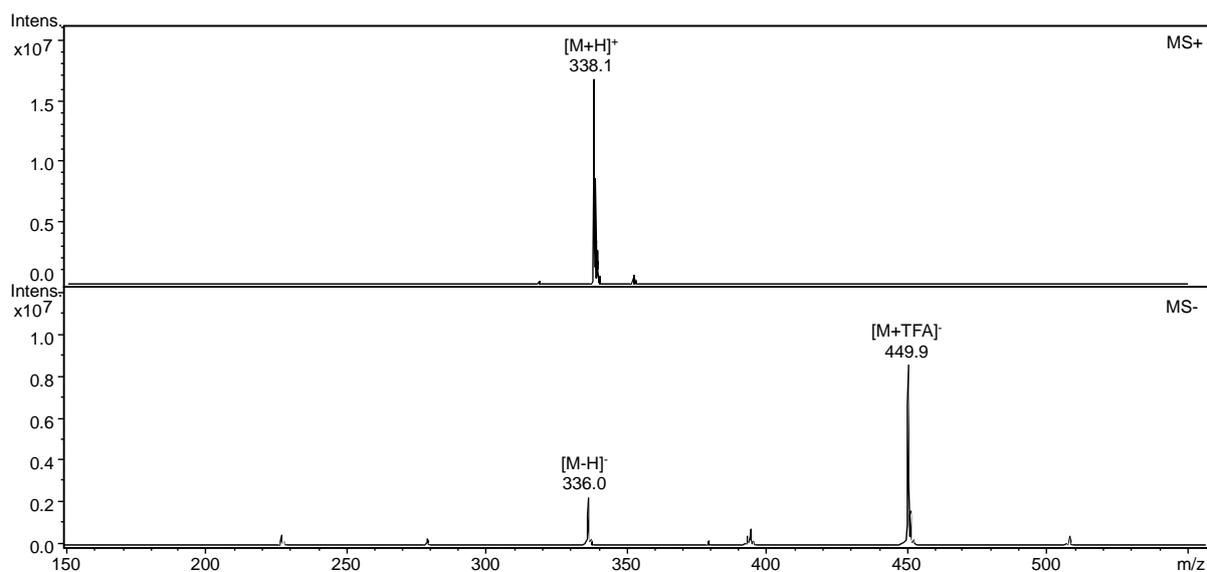
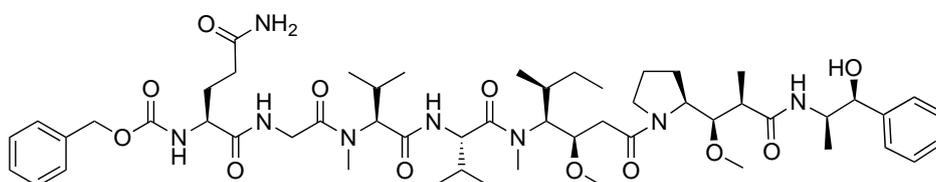


Figure 36 - Spectre de masse ESI-MS du composé **13** en mode positif et négatif.

#### Composé **14**– CBz-Gln-Gly-MMAE



À une solution du composé **13** (3 mg ; 9,5  $\mu\text{mol}$  ; 1,5  $\text{éq.}$ ) dans la DMF (50  $\mu\text{L}$ ) à température ambiante ont été ajoutés la DIEA (5  $\mu\text{L}$  ; 32,5  $\mu\text{mol}$  ; 5  $\text{éq.}$ ) et le HATU (2,5 mg ; 6,5  $\mu\text{mol}$  ; 1  $\text{éq.}$ ). Le mélange a été agité à température ambiante quelques instants avant d'ajouter la MMAE (5 mg ; 6,5  $\mu\text{mol}$  ; 1  $\text{éq.}$ ) et de poursuivre l'agitation pendant deux heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **14** (5,1 mg ; 4,9  $\mu\text{mol}$  ; 75%).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-60% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA). Temps de rétention : 13,7 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex® C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu$ m), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 18,3 minutes.

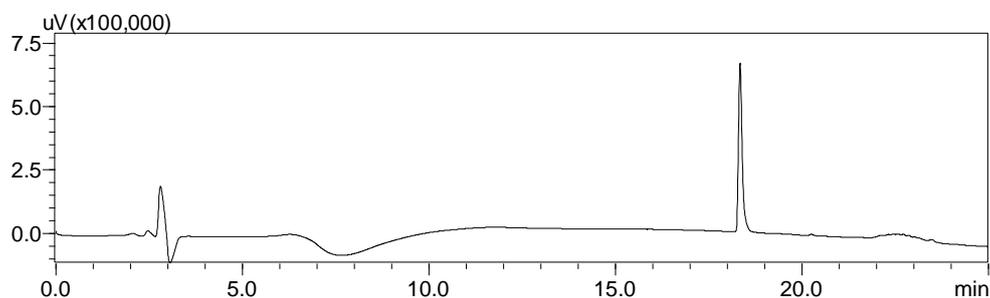


Figure 37 - Profil HPLC analytique du composé **14**.

**ESI-MS** (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>54</sub>H<sub>84</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub> : 1037,62 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 1037,7.  
[M+TFA]<sup>-</sup> théorique pour C<sub>54</sub>H<sub>84</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub> : 1149,52 ; [M+TFA]<sup>-</sup> expérimental : 1149,6.

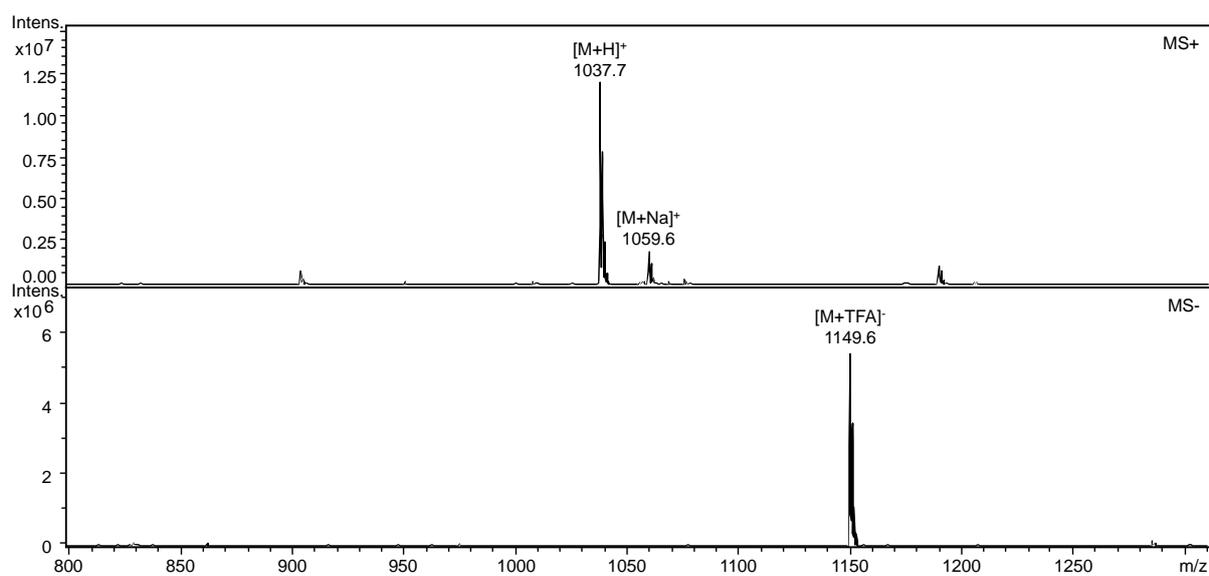


Figure 38 - Spectre de masse ESI-MS du composé **14** en mode positif et négatif.

### 3.2.4 Le linker-cytotoxique amine primaire

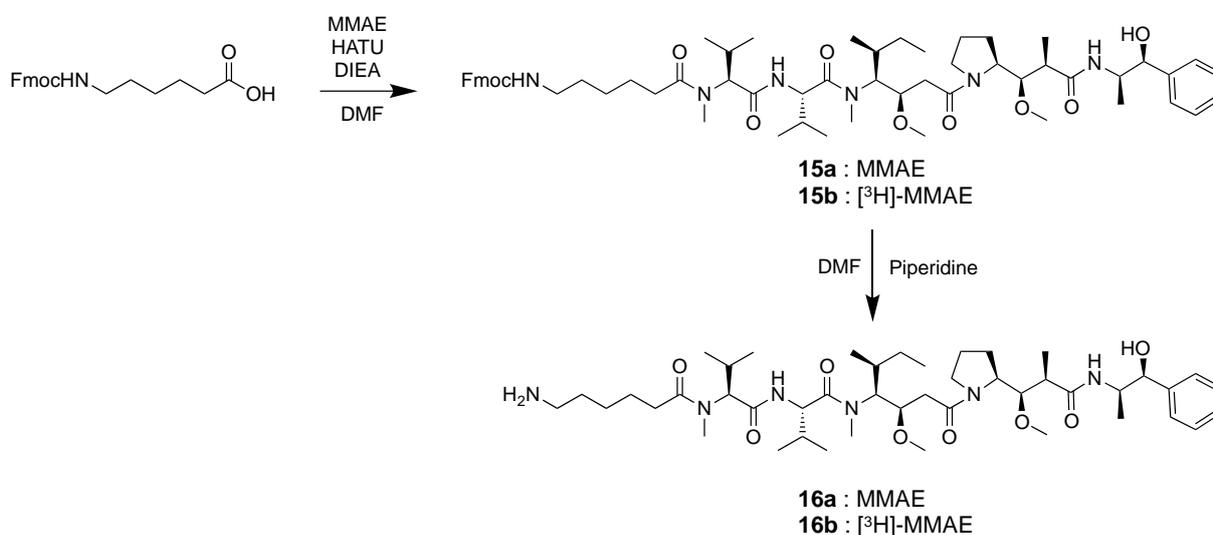
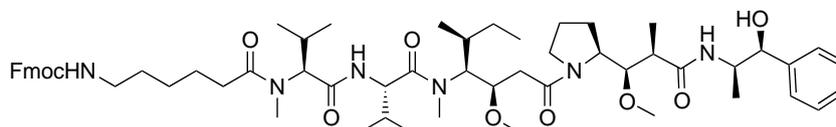


Figure 39 - Voie de synthèse du linker-cytotoxique non-clivable **16a/16b**.

#### Composé **15a** – Fmoc-Ahx-MMAE



À une solution Fmoc-Ahx-OH (2,9 mg ; 8,2  $\mu\text{mol}$  ; 2  $\text{éq.}$ ) dans la DMF à température ambiante ont été ajoutés la DIEA (1,6  $\mu\text{L}$  ; 10,2  $\mu\text{mol}$  ; 2,5  $\text{éq.}$ ) et le HATU (2,3 mg ; 6,1  $\mu\text{mol}$  ; 1,5  $\text{éq.}$ ). Le mélange a été agité à température ambiante quelques instants avant d'ajouter la MMAE (3 mg ; 4,1  $\mu\text{mol}$  ; 1  $\text{éq.}$ ) et de poursuivre l'agitation pendant deux heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **15a** (3,5 mg ; 3,3  $\mu\text{mol}$  ; 80%).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu\text{m}$ ), gradient 30-80% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA). Temps de rétention : 20,9 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex® C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6 µm), gradient 20-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 20,7 minutes.

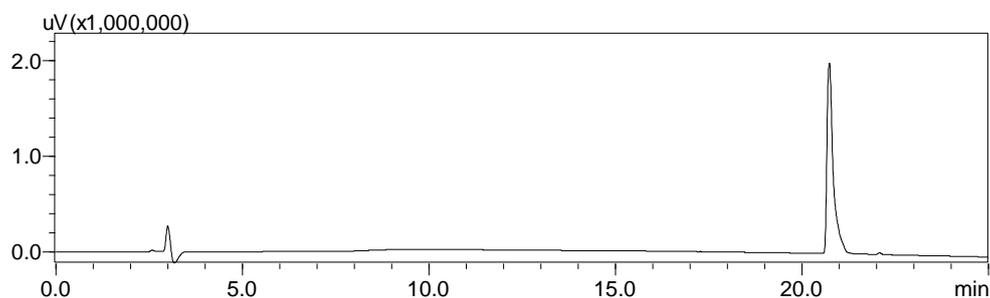


Figure 40 - Profil HPLC analytique du composé **15a**.

**ESI-MS** (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>60</sub>H<sub>88</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub> : 1053,66 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 1053,6.  
[M+TFA]<sup>-</sup> théorique pour C<sub>60</sub>H<sub>88</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub> : 1165,66 ; [M+TFA]<sup>-</sup> expérimental : 1165,7.

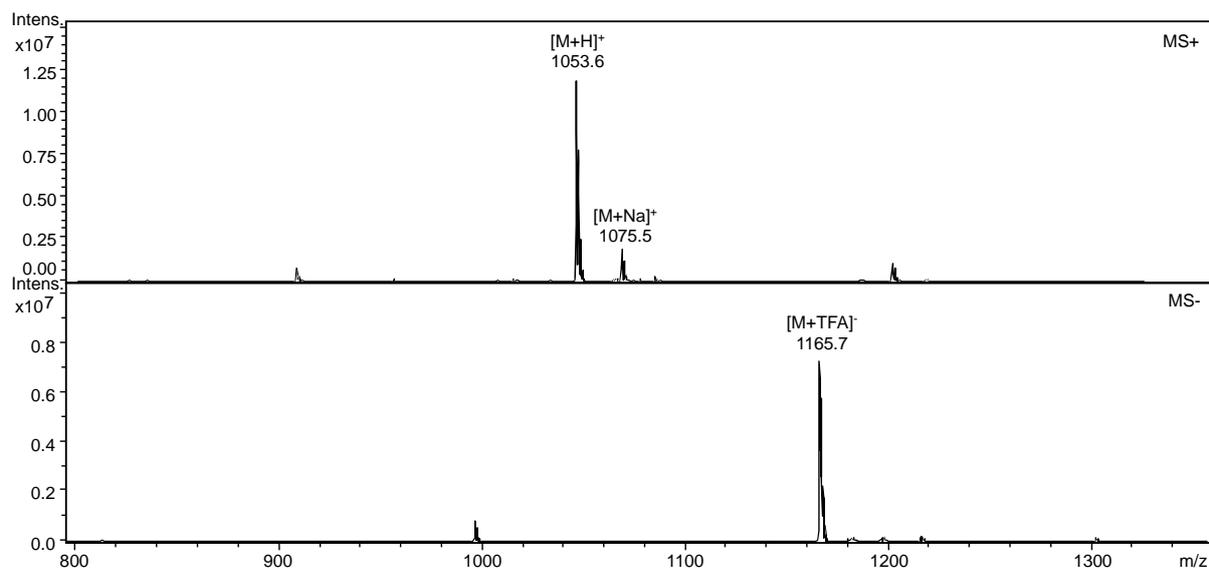


Figure 41 - Spectre de masse ESI-MS du composé **15a** en mode positif et négatif.

### Composé **15b** – Fmoc-Ahx-[<sup>3</sup>H]MMAE

À une solution de Fmoc-Ahx-OH (18 µg ; 52,5 nmol ; 5 éq.) dans la DMF (20 µL) à température ambiante ont été ajoutés la DIEA (17 nL ; 105 nmol ; 10 éq.) et le HATU (16 µg ; 42 nmol ; 4 éq.).

Le mélange a été agité à température ambiante quelques instants avant d'ajouter un mélange de la molécule marquée **8** (160  $\mu\text{Ci}$  ; 2,1 nmol ; 0,2 éq.) et de la MMAE (6  $\mu\text{g}$  ; 8,4 nmol ; 0,8 éq.) et de poursuivre l'agitation pendant quatre heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC analytique. Après évaporation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **15b** (65  $\mu\text{Ci}$  ; 4,3 nmol ; 41%).

**Purification** : colonne Phenomenex Luna<sup>®</sup> Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF). Temps de rétention : 22,8 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Luna<sup>®</sup> Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF), détection radioactive par scintillation liquide. Temps de rétention : 22,8 minutes.

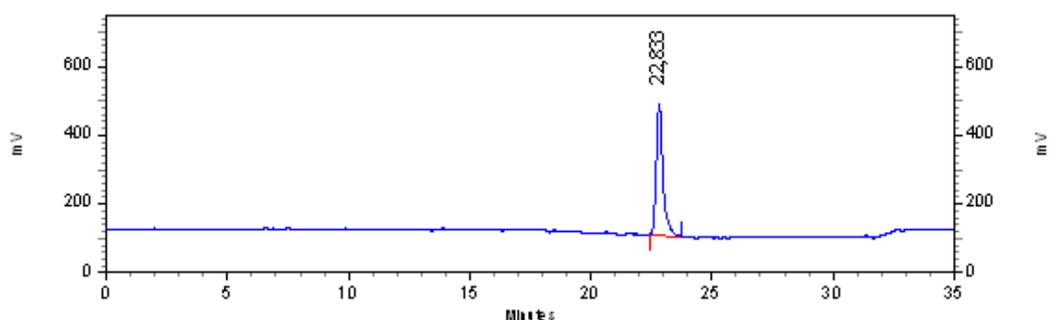


Figure 42 - Profil radio-HPLC analytique du composé **15b**.

**MALDI-MS** (m/z) : [M+Na]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>60</sub>H<sub>88</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub> : 1075,6459 ; [M+Na]<sup>+</sup> expérimental : 1075,5521. [M+K]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>60</sub>H<sub>88</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub> : 1091,6199 ; [M+K]<sup>+</sup> expérimental : 1091,5238.

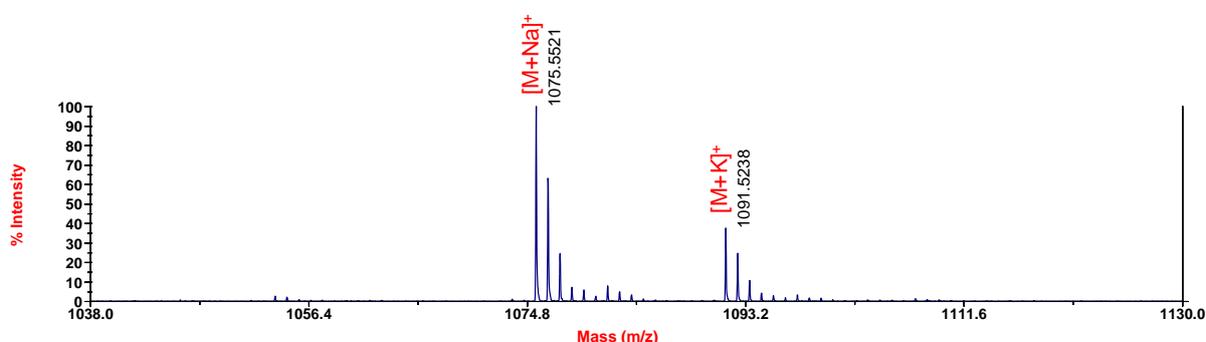


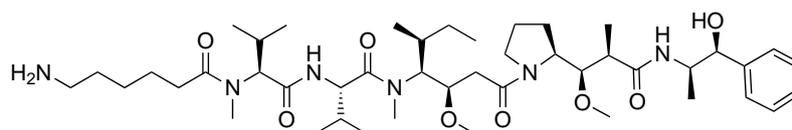
Figure 43 - Spectre de masse MALDI-TOF du composé **15b**.

**Activité spécifique** : dilution isotopique avec 80% de MMAE non marquée conduisant à une abondance isotopique moyenne 0,5 atomes de tritium par molécule de MMAE. Soit une activité spécifique de 15 Ci/mmol.

ISOTOPOLOGUE	M+1 (T <sub>0</sub> )	M+3 (T <sub>1</sub> )	M+5 (T <sub>2</sub> )	M+7 (T <sub>3</sub> )	M+9 (T <sub>4</sub> )	M+11 (T <sub>5</sub> )
M/Z	1075,5	1077,5	1079,7	1081,5	1083,5	1085,5
ABONDANCE	80,4%	2,0%	6,4%	8,8%	2,0%	0,4%

Tableau 5 - Abondance relative des différents isotopologues de la molécule marquée **15b**.

### Composé 16a – H<sub>2</sub>N-Ahx-MMAE



À une solution du composé **15a** (3 mg ; 2,8 µmol ; 1 éq.) dans la DMF (50 µL) à température ambiante a été ajoutée la piperidine (6 µL ; 56 µmol ; 20 éq.). Le mélange a été agité à température ambiante pendant une heure. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **16a** (2,0 mg ; 2,4 µmol ; 85%).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5 µm), gradient 30-80% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA). Temps de rétention : 12,1 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex® C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6 µm), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 17,0 minutes.

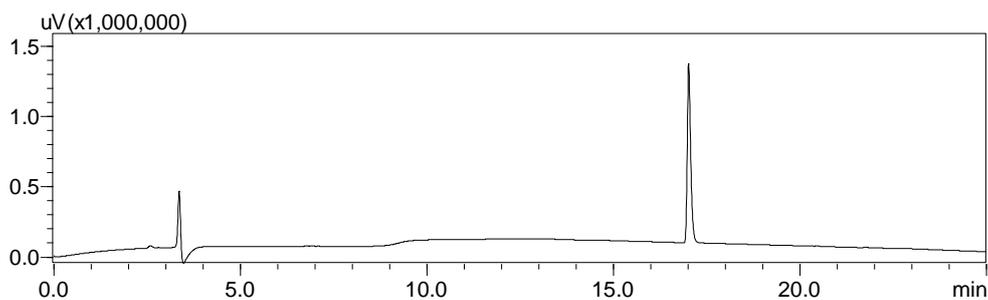


Figure 44 - Profil HPLC analytique du composé **16a**.

ESI-MS (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>45</sub>H<sub>78</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub> : 831,59 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 831,6.  
[M+TFA]<sup>-</sup> théorique pour C<sub>45</sub>H<sub>78</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub> : 943,49 ; [M+TFA]<sup>-</sup> expérimental : 943,5.

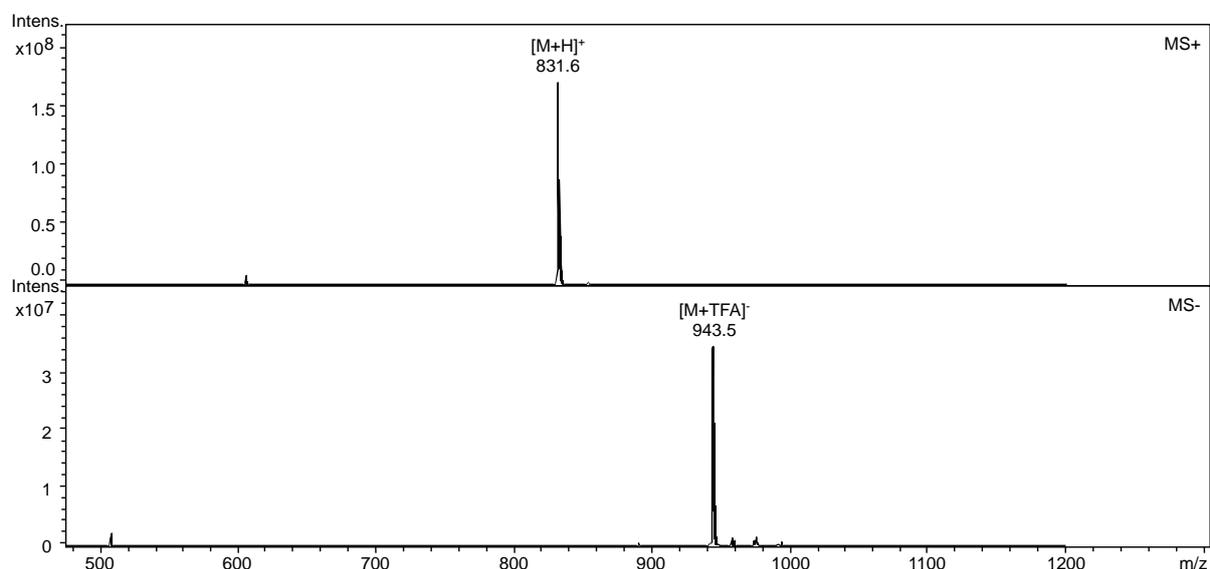


Figure 45 - Spectre de masse ESI-MS du composé **16a** en mode positif et négatif.

### Composé **16b** – H<sub>2</sub>N-Ahx-[<sup>3</sup>H]MMAE

À une solution du composé **15b** (59 µCi ; 3.9 nmol ; 1 éq.) dans la DMF à température ambiante a été ajoutée la piperidine (9 nL ; 78 nmol ; 20 éq.). Le mélange a été agité à température ambiante pendant une heure. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC analytique. Après évaporation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **16b** (42 µCi ; 2.7 nmol ; 71%).

**Purification** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3 µm), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF). Temps de rétention : 16,5 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3 µm), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF), détection radioactive par scintillation liquide. Temps de rétention : 16,5 minutes.

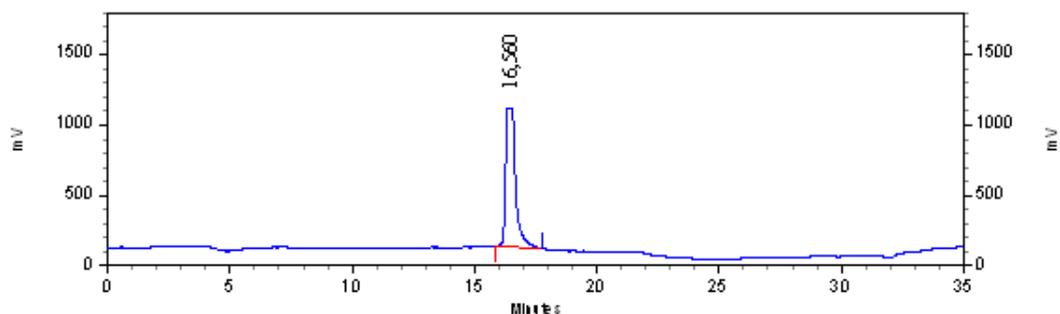


Figure 46 - Profil radio-HPLC analytique du composé **16b**.

**MALDI-MS** (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>45</sub>H<sub>78</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub> : 831,5959 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 831,5233. [M+Na]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>45</sub>H<sub>78</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub> : 853,4778 ; [M+Na]<sup>+</sup> expérimental : 853,4995.

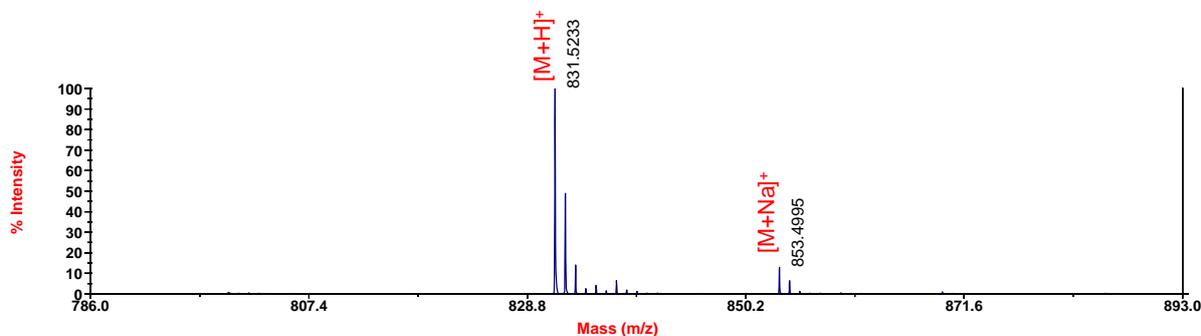


Figure 47 - Spectre de masse MALDI-TOF du composé **16b**.

**Activité spécifique** : dilution isotopique avec 80% de MMAE non marquée conduisant à une abondance isotopique moyenne 0,5 atomes de tritium par molécule de MMAE. Soit une activité spécifique de 15 Ci/mmol.

ISOTOPOLOGUE	M+1 (T <sub>0</sub> )	M+3 (T <sub>1</sub> )	M+5 (T <sub>2</sub> )	M+7 (T <sub>3</sub> )	M+9 (T <sub>4</sub> )	M+11 (T <sub>5</sub> )
M/Z	831,5	833,5	835,7	837,5	839,5	841,5
ABONDANCE	80,4%	2,0%	6,4%	8,8%	2,0%	0,4%

Tableau 12 - Abondance relative des différents isotopologues de la molécule marquée **16b**.

### 3.3 LES LINKER-CYTOTOXIQUES CLIVABLES

#### 3.3.1 Le dipeptide clivable Val-Ala<sup>357</sup>

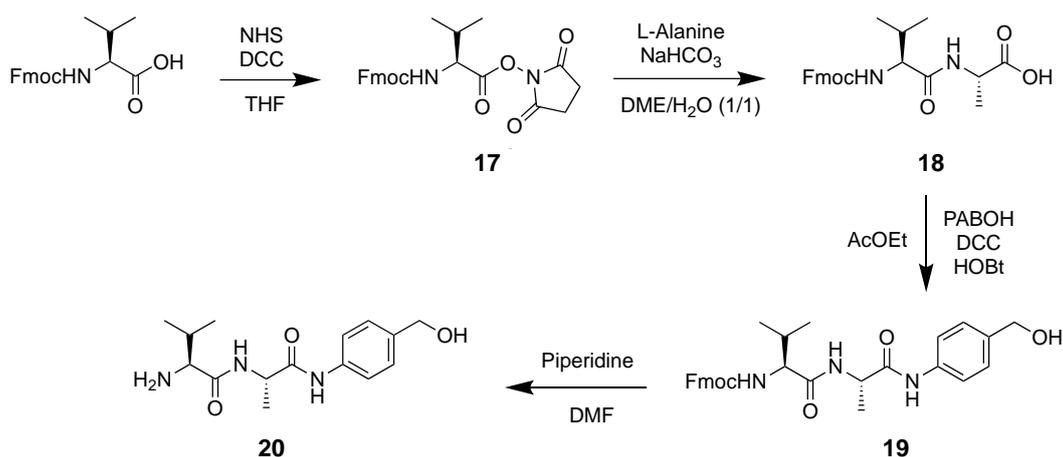
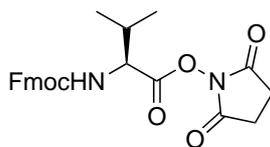


Figure 48 - Voie de synthèse du dipeptide clivable **20**.

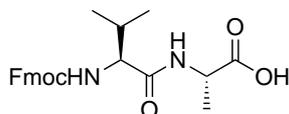
<sup>357</sup> Dubowchik, G. M. et al. Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: Model studies of enzymatic drug release and antigen-specific in vitro anticancer activity. *Bioconjug. Chem.* **13**, 855–869 (2002).

### Composé 17 – Fmoc-Val-OSu



Une solution de Fmoc-L-Val-OH (300 mg ; 880  $\mu$ mol ; 1  $\text{eq.}$ ) de NHS (101 mg ; 880  $\mu$ mol ; 1  $\text{eq.}$ ) dans le THF anhydre (3 mL) a été refroidie à 0°C avant d'ajouter le DCC (181 mg ; 880  $\mu$ mol ; 1  $\text{eq.}$ ). Après 15 minutes à 0°C, la réaction a été agitée pendant deux heures supplémentaires à température ambiante. Le sous-produit DCU insoluble formé durant la réaction a été éliminé par filtration, et le filtrat a été évaporé pour obtenir le produit **17** qui a été engagé dans la suite de la synthèse sans étape de purification.

### Composé 18 – Fmoc-Val-Ala-OH



À une solution de **17** (384 mg ; 880  $\mu$ mol ; 1  $\text{eq.}$ ) dans le DME (1,5 mL) à température ambiante, a été ajoutée une solution de L-Alanine (85 mg ; 968  $\mu$ mol ; 1,1  $\text{eq.}$ ) et de  $\text{NaHCO}_3$  (81 mg ; 968  $\mu$ mol ; 1,1  $\text{eq.}$ ) dans l'eau (1,5 mL). Du THF (0,5 mL) a été ajouté pour permettre une complète solubilité. La réaction a été agitée pendant une nuit à température ambiante. Une solution aqueuse d'acide citrique 15% (12 mL) a été ajoutée jusqu'à la neutralité de pH et le mélange a ensuite été extrait deux fois à l'AcOEt (15 mL). Les phases organiques ont ensuite été collectées, séchées sur  $\text{MgSO}_4$  et le solvant a été évaporé pour donner le produit **18** qui a été engagé dans la suite de la synthèse sans étape de purification.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu$ m), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 19,2 minutes.

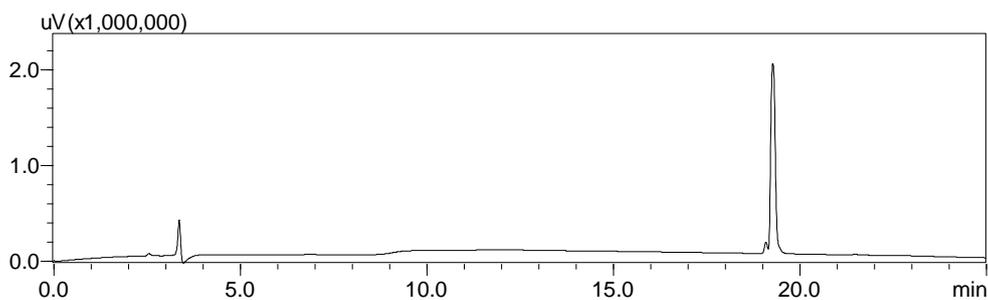


Figure 49 - Profil HPLC analytique du composé **18**.

ESI-MS (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : 411,18 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 411,1.  
 [M+TFA]<sup>-</sup> théorique pour C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : 523,08 ; [M+TFA]<sup>-</sup> expérimental : 523,0.

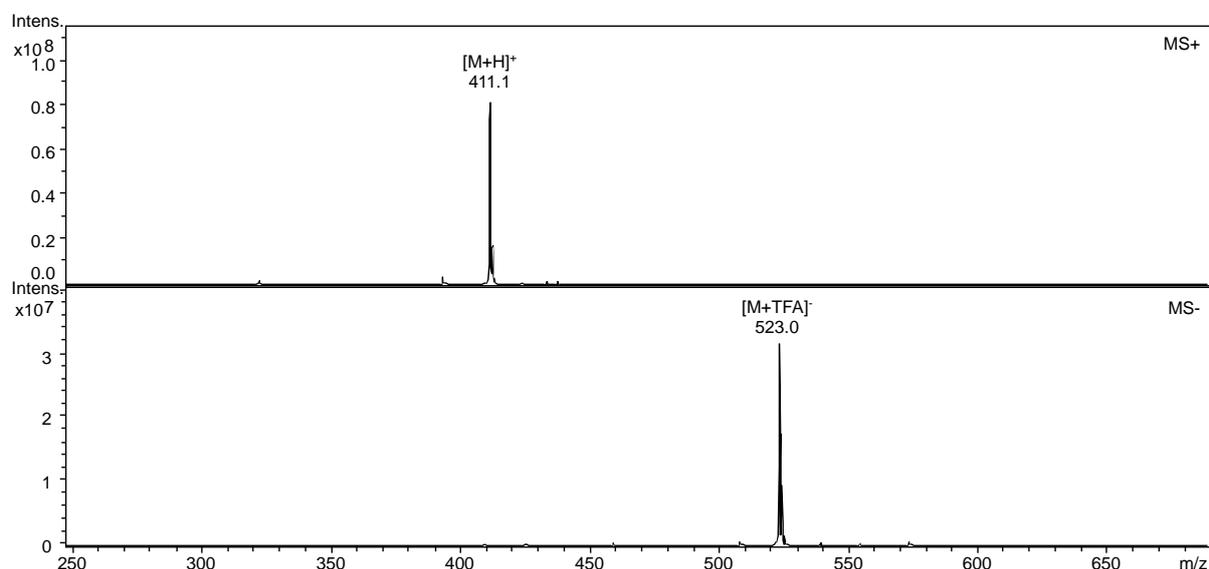
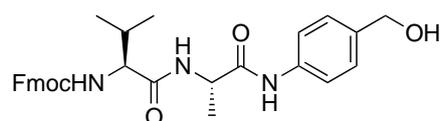


Figure 50 - Spectre de masse ESI-MS du composé **18** en mode positif et négatif.

### Composé **19** – Fmoc-Val-Ala-PABOH



Une solution de **18** (360 mg ; 880 μmol ; 1 éq.) et de HOBT (130 mg ; 968 μmol ; 1,1 éq.) dans l'AcOEt (3 mL) a été refroidie à 0°C avant d'ajouter le DCC (199 mg ; 968 μmol ; 1,1 éq.). Après

30 minutes d'agitation à 0°C, PABOH (108 mg ; 880 µmol ; 1 éq.) et DIEA (135 µL ; 880 µmol ; 1 éq.) ont été ajoutés, et la réaction a été agitée pendant deux heures supplémentaires à température ambiante. Le sous-produit DCU insoluble formé durant la réaction a été éliminé par filtration. Le filtrat a ensuite été évaporé et le résidu a été purifié par chromatographie sur colonne de silice pour obtenir le produit **19** (250 mg ; 590 µmol ; 67%).

**Purification** : colonne de silice, élution avec AcOEt/CHX (3/2), Rf : 0,25.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex® C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6 µm), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 19,4 minutes.

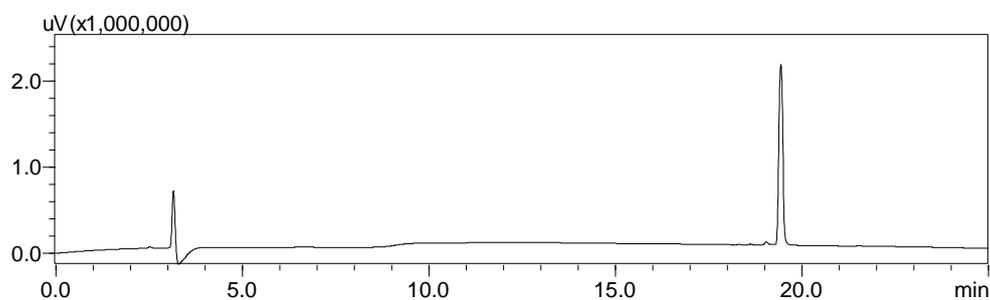


Figure 51 - Profil HPLC analytique du composé **19**.

**ESI-MS** (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>30</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> : 516,24 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 516,2 ; fragmentation à la source -18,0 et -123,1. [M+TFA]<sup>-</sup> théorique pour C<sub>30</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> : 628,14 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 628,1.

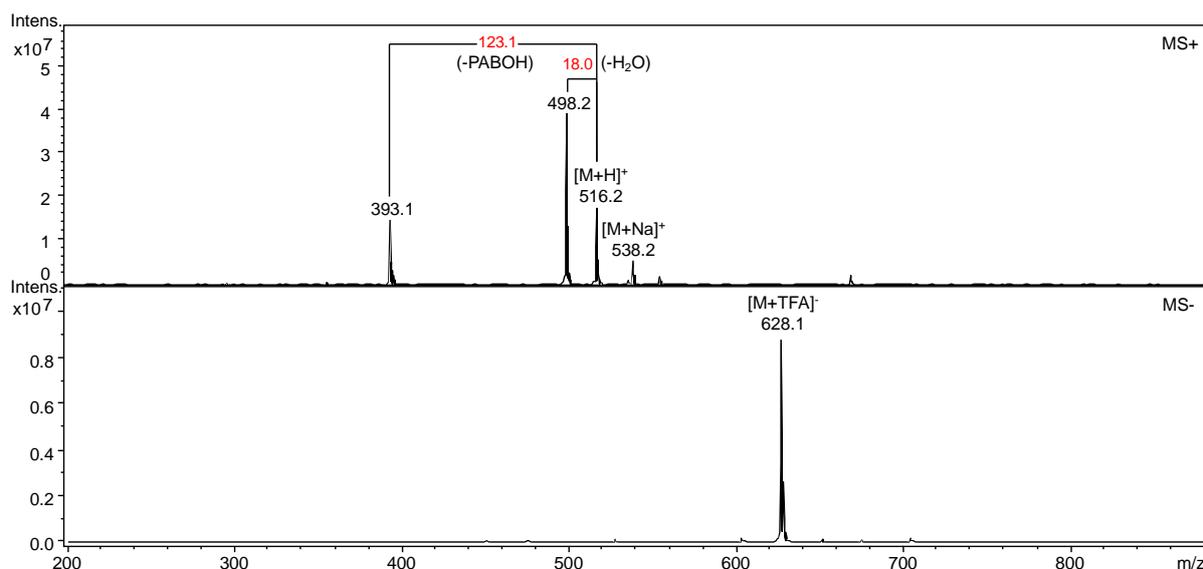
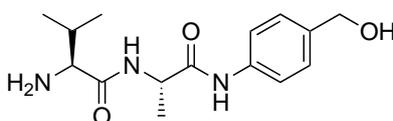


Figure 52 - Spectre de masse ESI-MS du composé **19** en mode positif et négatif.

### Composé **20** – H<sub>2</sub>N-Val-Ala-PABOH



À une solution du composé **19** (150 mg ; 290  $\mu$ mol ; 1  $\text{eq.}$ ) dans la DMF (2 mL ; 145 mM) à température ambiante a été ajoutée la piperidine (570  $\mu$ L ; 5,8 mmol ; 20  $\text{eq.}$ ). Le mélange a été agité à température ambiante pendant une heure. Les solvants ont été évaporés et le résidu huileux a ensuite été repris dans un mélange H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (3/1). La suspension obtenue a été soniquée et l'adduit du dibenzofulvène et de la piperidine insoluble a été éliminé par filtration. Le filtrat a ensuite été congelé et lyophilisé pour donner le produit **20** qui a été engagé dans la suite de la synthèse sans étape de purification.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu$ m), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 11,9 minutes.

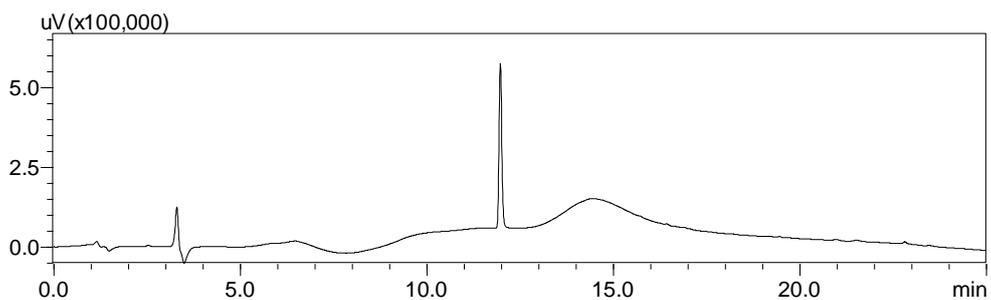


Figure 53 - Profil HPLC analytique du composé **20**.

ESI-MS (m/z) :  $[M+H]^+$  théorique pour  $C_{15}H_{23}N_3O_3$  : 294,17 ;  $[M+H]^+$  expérimentale : 294,1 ; fragmentation à la source -123,2.  $[M+TFA]^-$  théorique pour  $C_{15}H_{23}N_3O_3$  : 406,07 ;  $[M+H]^+$  expérimentale : 406,0.

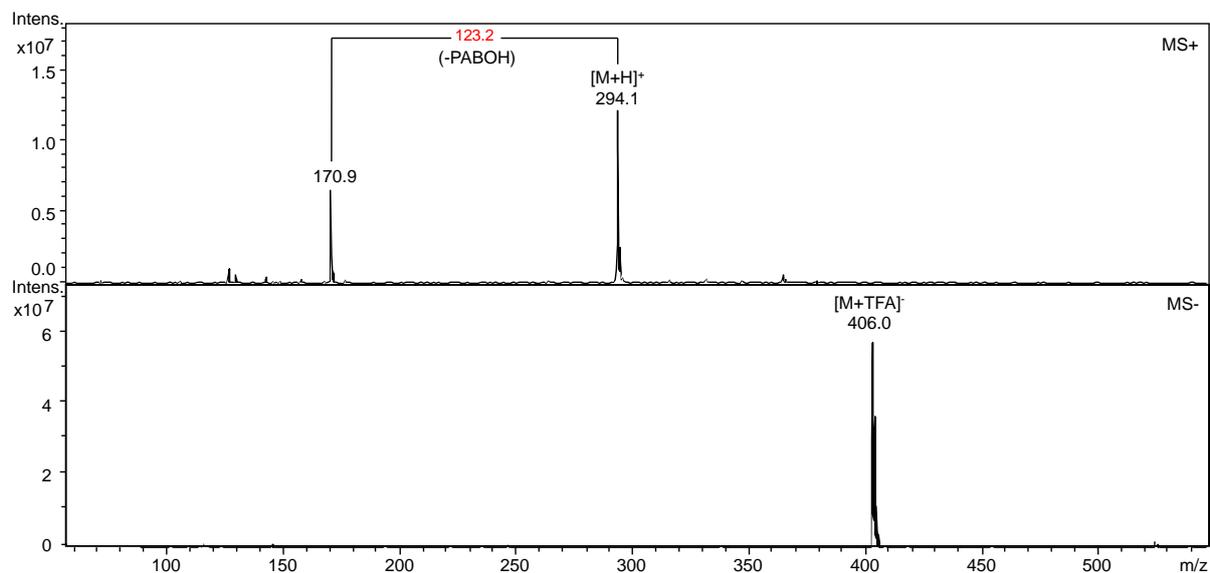


Figure 54 - Spectre de masse ESI-MS du composé **20** en mode positif et négatif.

### 3.3.2 Le linker-cytotoxique clivable maléimide

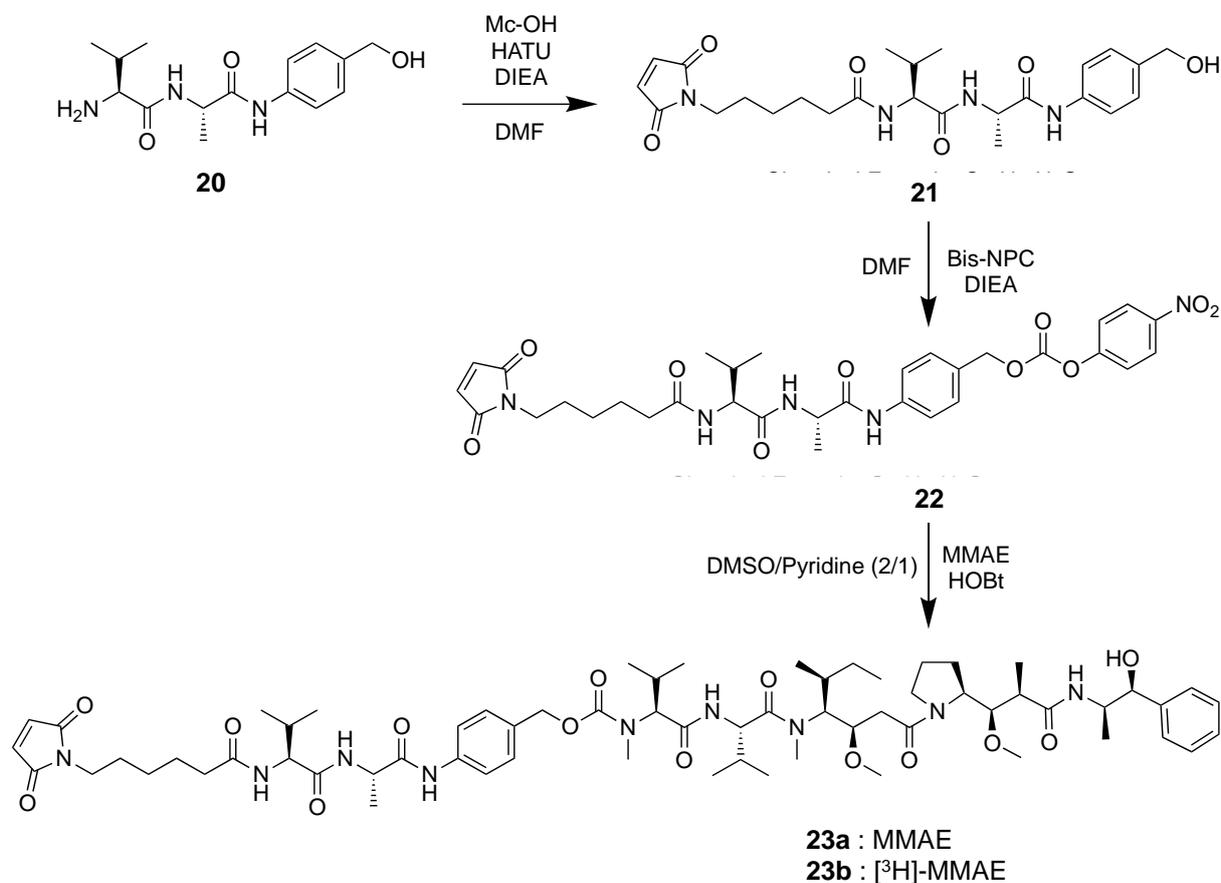
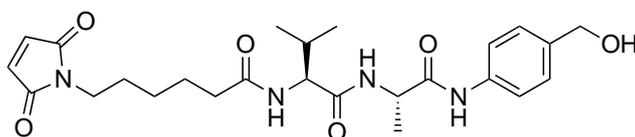


Figure 55 - Voie de synthèse de linker-cytotoxique clivable **23a/23b**.

#### Composé 21 – Mc-Val-Ala-PABOH



À une solution d'acide maléimido-caproïque (2,1 mg ; 10  $\mu\text{mol}$  ; 2 éq.) dans la DMF (50 $\mu\text{L}$ ) à température ambiante ont été ajoutés la DIEA (2,6  $\mu\text{L}$  ; 25  $\mu\text{mol}$  ; 5 éq.) et le HATU (2,8 mg ; 7,5  $\mu\text{mol}$  ; 1,5 éq.). Le mélange a été agité à température ambiante quelques instants avant d'ajouter le composé **20** (1,5 mg ; 5 $\mu\text{mol}$  ; 1 éq.) et de poursuivre l'agitation pendant deux

heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **21** (1,3 mg ; 2,7  $\mu\text{mol}$  ; 52%).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-50% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA). Temps de rétention : 15,4 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 15,6 minutes.

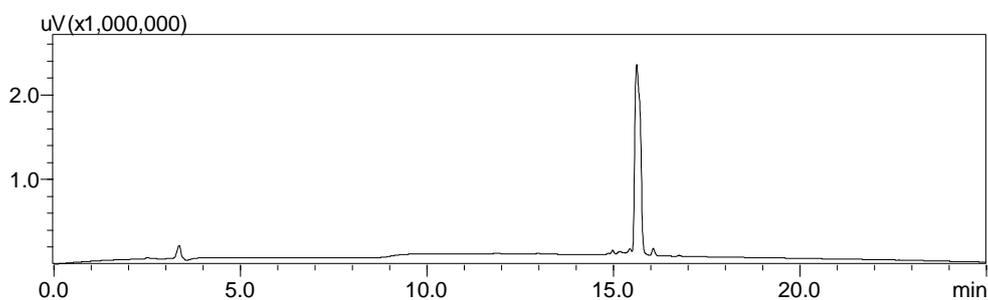


Figure 56 - Profil HPLC analytique du composé **21**.

**ESI-MS** (m/z) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  théorique pour  $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6$  : 487,25 ;  $[\text{M}+\text{H}]^+$  expérimental : 487,2 ; fragmentation à la source -18,0 et -123,1.  $[\text{M}+\text{TFA}]^-$  théorique pour  $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6$  : 599,15 ;  $[\text{M}+\text{TFA}]^-$  expérimental : 599,1.

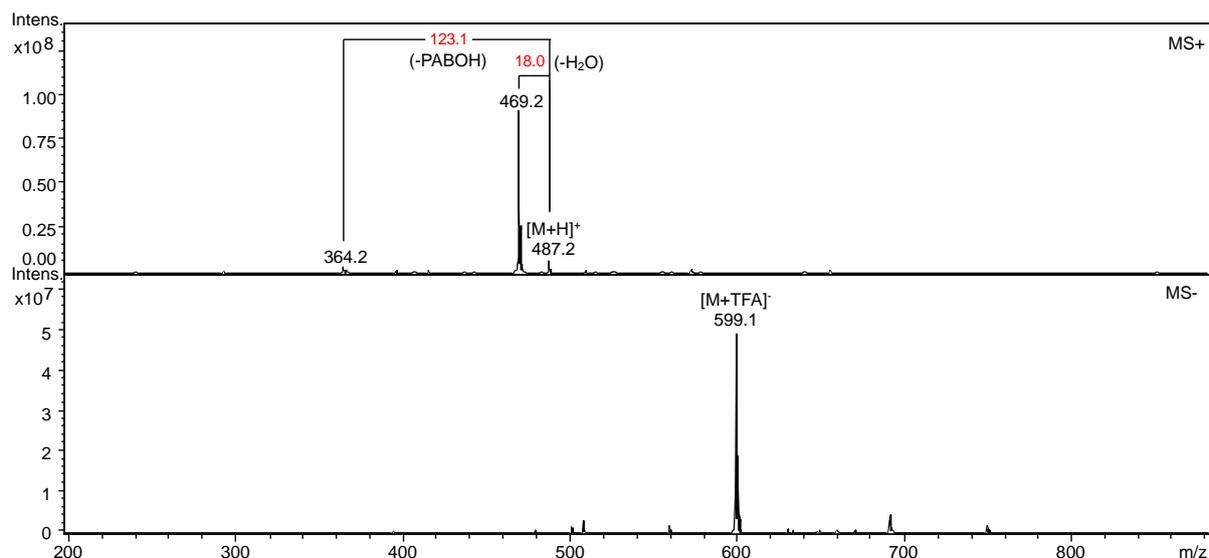
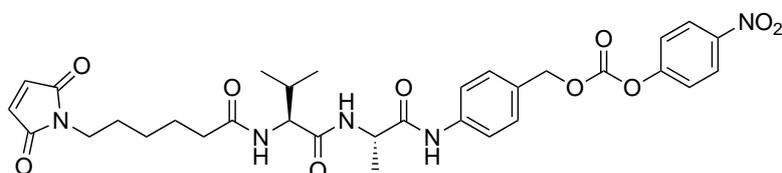


Figure 57 - Spectre de masse ESI-MS du composé **21** en mode positif et négatif.

### Composé 22 – Mc-Val-Ala-PABC-PNP



À une solution du composé **21** (7,2 mg ; 14,8  $\mu$ mol ; 1  $\text{eq.}$ ) dans la DMF (100  $\mu$ L) à température ambiante ont été ajoutés la DIEA (7,5  $\mu$ L ; 44,4  $\mu$ mol ; 3  $\text{eq.}$ ) et le bis(4-nitrophényl)carbonate (13,5 mg ; 44,4  $\mu$ mol ; 3  $\text{eq.}$ ). Le mélange a été agité à température ambiante pendant dix heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **22** (4,9 mg ; 7,5  $\mu$ mol ; 51%).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu$ m), gradient 0-60% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA). Temps de rétention : 20,1 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex® C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6 µm), gradient 20-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 17,7 minutes.

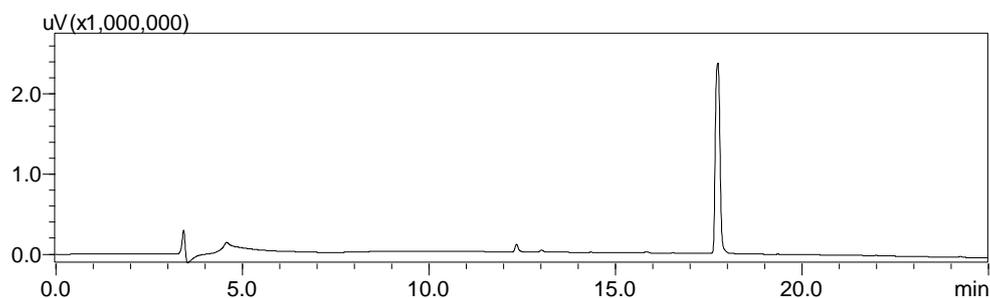


Figure 58 - Profil HPLC analytique du composé **22**.

**ESI-MS** (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub> : 652,25 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 652,3 ; fragmentation à la source -183,0. [M+TFA]<sup>-</sup> théorique pour C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub> : 764,15 ; [M+TFA]<sup>-</sup> expérimental : 764,2.

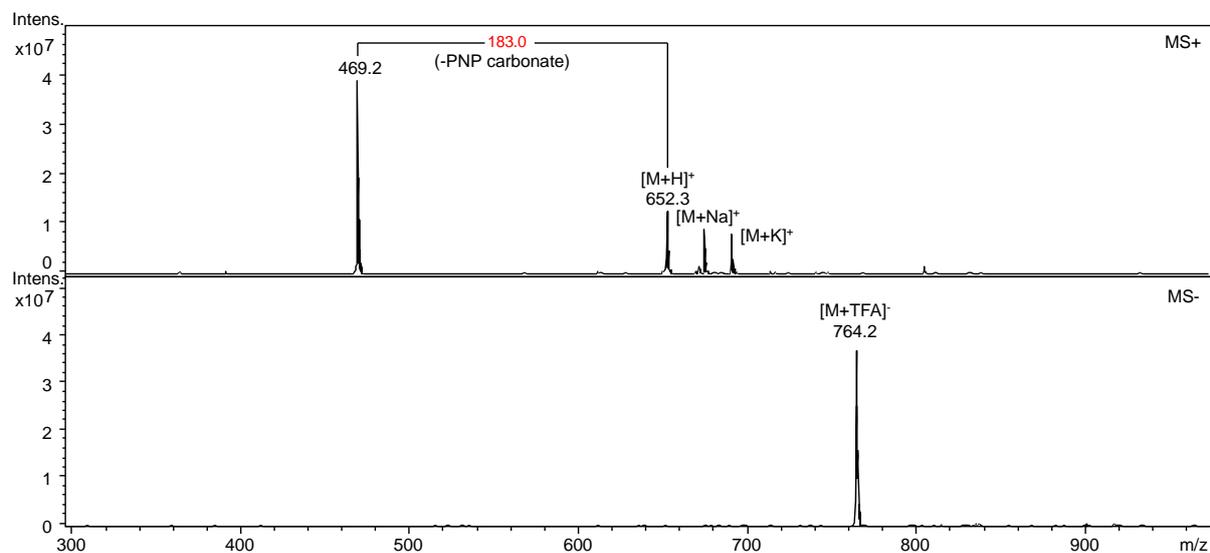
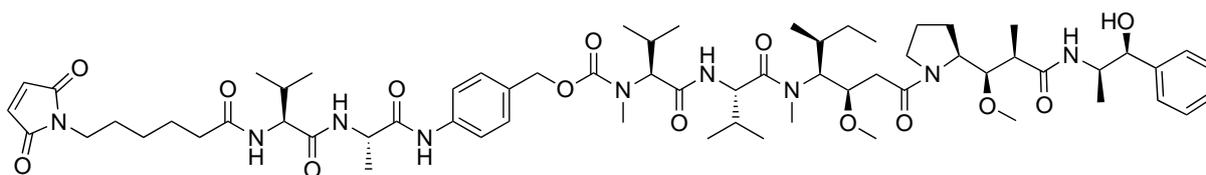


Figure 59 - Spectre de masse ESI-MS du composé **22** en mode positif et négatif.

### Composé 23a – Mc-Val-Ala-PABC-MMAE



À une solution du composé **22** (1,7 mg ; 2,6  $\mu\text{mol}$  ; 1 éq.) et de MMAE (1,9 mg ; 2,6  $\mu\text{mol}$  ; 1 éq.) dans un mélange de DMSO (40  $\mu\text{L}$ ) et de pyridine (20  $\mu\text{L}$ ) à température ambiante a été ajouté le HOBt (0,5 mg ; 3,9  $\mu\text{mol}$  ; 1,5 éq.). Le mélange a été agité à température ambiante pendant dix heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **23a** (0,8 mg ; 650 nmol ; 25%).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA). Temps de rétention : 14,8 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu\text{m}$ ), gradient 40-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 13,9 minutes.

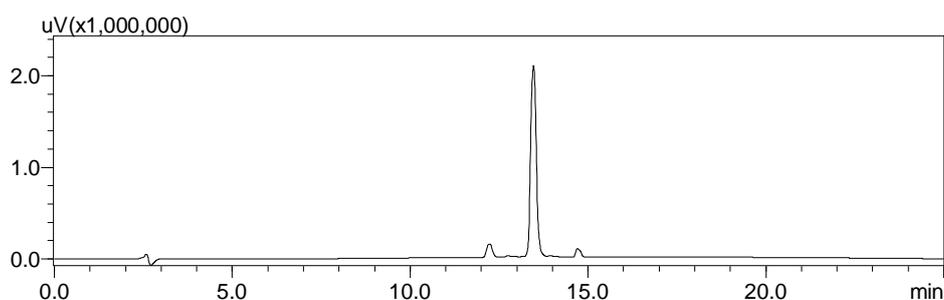


Figure 60 - Profil HPLC analytique du composé **23a**.

**ESI-MS** (m/z) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  théorique pour  $\text{C}_{65}\text{H}_{99}\text{N}_9\text{O}_{14}$  : 1230,73 ;  $[\text{M}+\text{H}]^+$  expérimentale : 1230,8.  
 $[\text{M}+\text{TFA}]^-$  théorique pour  $\text{C}_{65}\text{H}_{99}\text{N}_9\text{O}_{14}$  : 1342,63 ;  $[\text{M}+\text{TFA}]^-$  expérimentale : 1343,0.

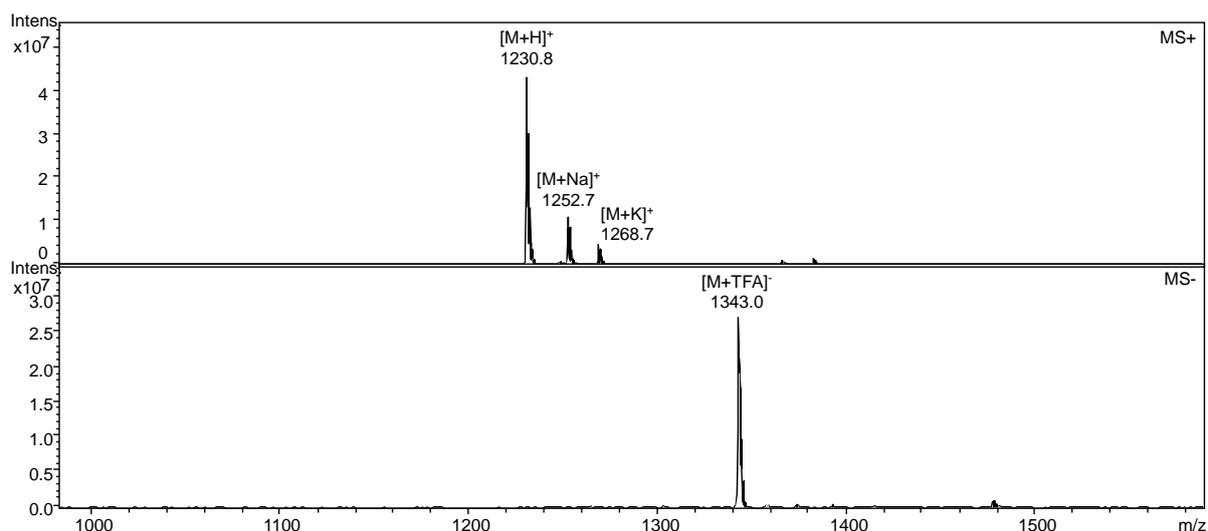


Figure 61 - Spectre de masse ESI-MS du composé **23a** en mode positif et négatif.

### Composé **23b** – Mc-Val-Ala-PABC-<sup>[3H]</sup>MMAE

À une solution du composé **22** (0,7 mg ; 1,1  $\mu\text{mol}$  ; 2  $\text{eq.}$ ), du composé **8** (2,4 mCi ; 29,5 nmol ; 0,05  $\text{eq.}$ ) et de MMAE (0,4 mg ; 561 nmol ; 0,95  $\text{eq.}$ ) dans un mélange de DMSO (20  $\mu\text{L}$ ) et de pyridine (10  $\mu\text{L}$ ) à température ambiante a été ajouté le HOBt (0,15 mg ; 1,1  $\mu\text{mol}$  ; 2  $\text{eq.}$ ). Le mélange a été agité à température ambiante pendant dix heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC analytique. Après évaporation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **23b** (527  $\mu\text{Ci}$  ; 142 nmol ; 24%).

**Purification** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF). Temps de rétention : 20,8 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF), détection radioactive par scintillation liquide. Temps de rétention : 20,8 minutes.

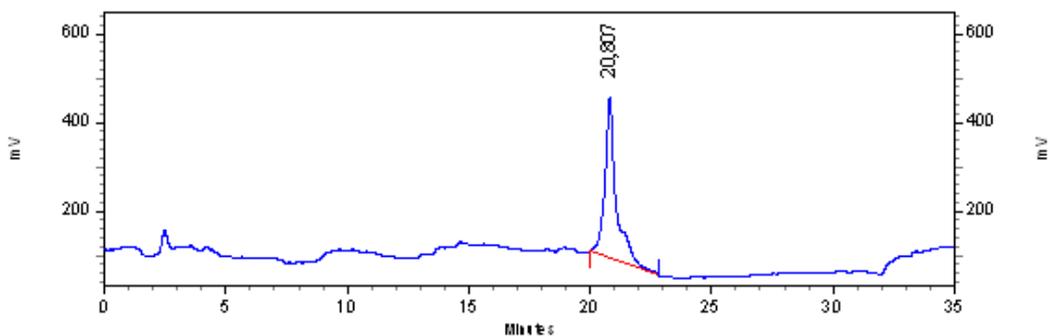


Figure 62 - Profil radio-HPLC analytique du composé **23b**.

MALDI-MS (m/z) : [M+Na]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>65</sub>H<sub>99</sub>N<sub>9</sub>O<sub>14</sub> : 1252,7209, [M+Na]<sup>+</sup> expérimental : 1252,7560. [M+K]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>65</sub>H<sub>99</sub>N<sub>9</sub>O<sub>14</sub> : 1268,6948, [M+K]<sup>+</sup> expérimental : 1268,7294.

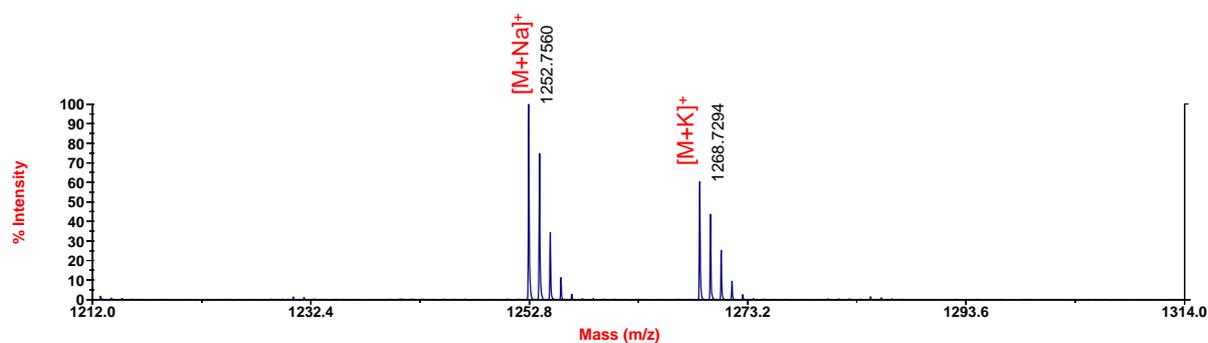


Figure 63 - Spectre de masse MALDI-TOF du composé **23b**.

**Activité spécifique** : dilution isotopique avec 95% de MMAE non marquée conduisant à une abondance isotopique moyenne 0,13 atomes de tritium par molécule de MMAE. Soit une activité spécifique de 3,7 Ci/mmol.

ISOTOPOLOGUE	M+1 (T <sub>0</sub> )	M+3 (T <sub>1</sub> )	M+5 (T <sub>2</sub> )	M+7 (T <sub>3</sub> )	M+9 (T <sub>4</sub> )	M+11 (T <sub>5</sub> )
M/Z	1230,7	1232,7	1234,7	1236,7	1238,7	1240,7
ABONDANCE	95,1%	0,5%	1,6%	2,2%	0,5%	0,1%

Tableau 7 - Abondance relative des différents isotopologues de la molécule marquée **23b**.

### 3.3.3 Le linker-cytotoxique clivable maleimide auto-hydrolysable

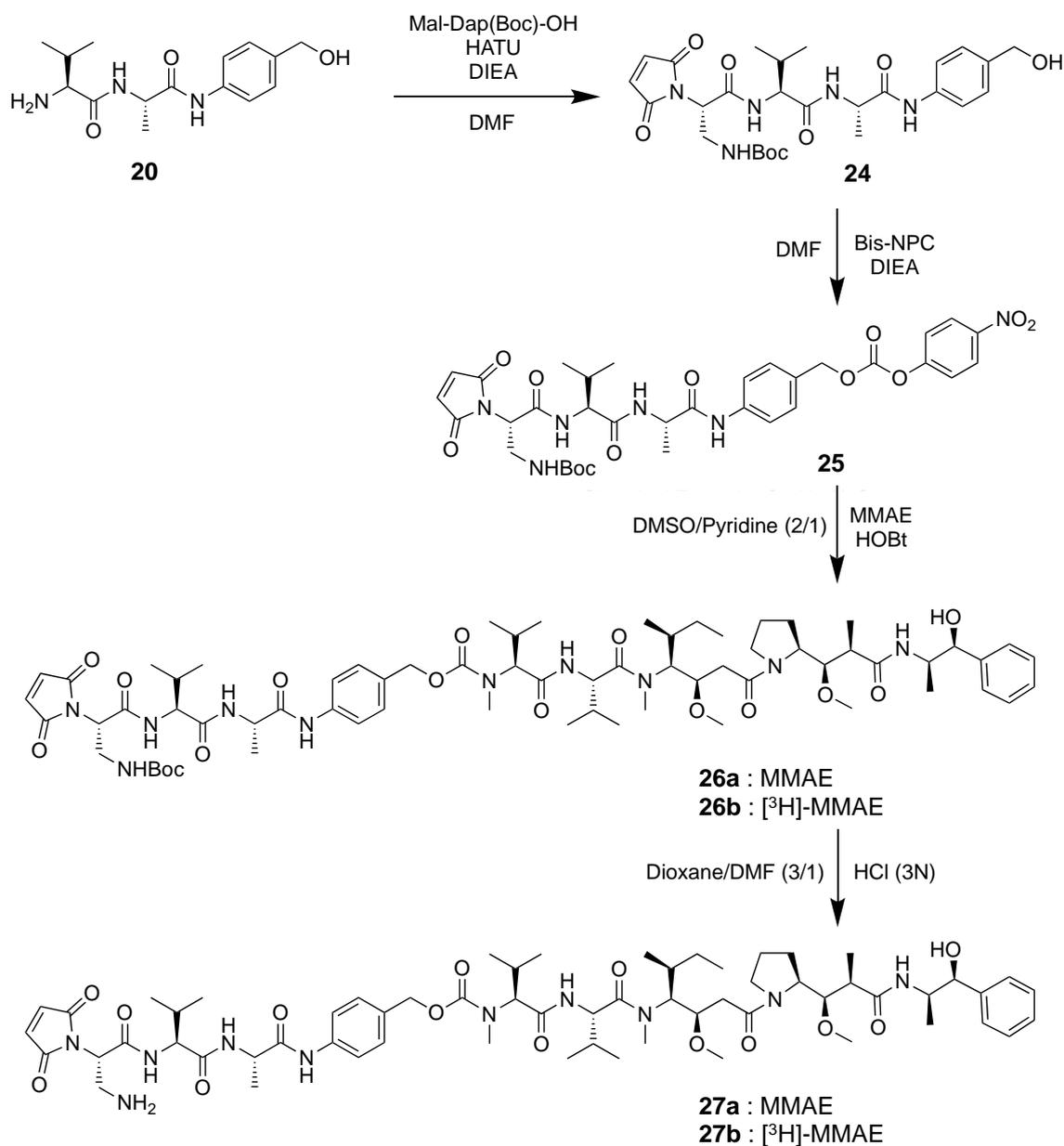
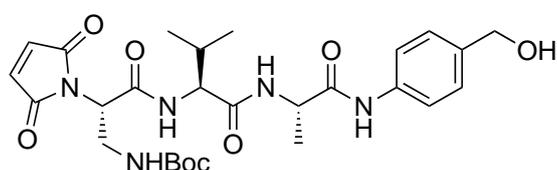


Figure 64 - Voie de synthèse du linker-cytotoxique clivable **27a/27b**.

#### Composé 24 – Mal-Dap(Boc)-Val-Ala-PABOH



À une solution de Mal-L-Dap(Boc)-OH\*DCHA (10 mg ; 21,6  $\mu\text{mol}$  ; 2  $\text{eq.}$ ) dans la DMF (100  $\mu\text{L}$ ) à température ambiante ont été ajoutés la DIEA (8,4  $\mu\text{L}$  ; 54  $\mu\text{mol}$  ; 5  $\text{eq.}$ ) et le HATU (6 mg ; 16,2  $\mu\text{mol}$  ; 1,5  $\text{eq.}$ ). Le mélange a été agité à température ambiante quelques instants avant d'ajouter le composé **20** (3,1 mg ; 10,8  $\mu\text{mol}$  ; 1  $\text{eq.}$ ) et de poursuivre l'agitation pendant deux heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **24** (2,9 mg ; 5,2  $\mu\text{mol}$  ; 48 %).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-50% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA). Temps de rétention : 16,9 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 16,2 minutes.

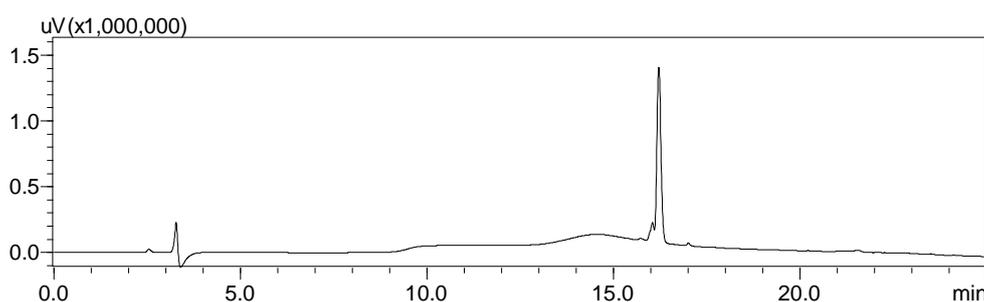
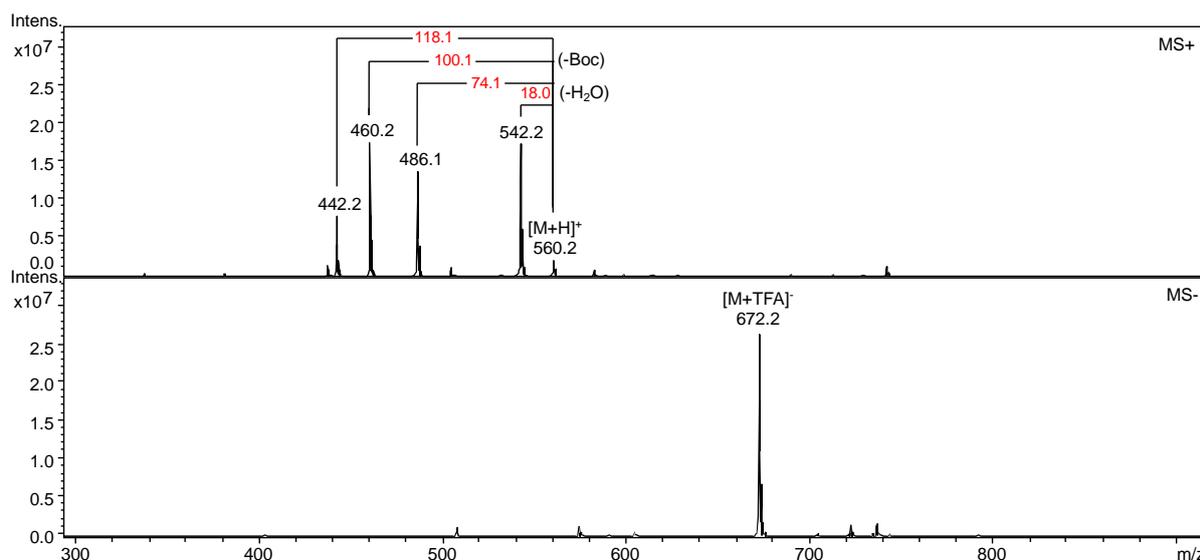
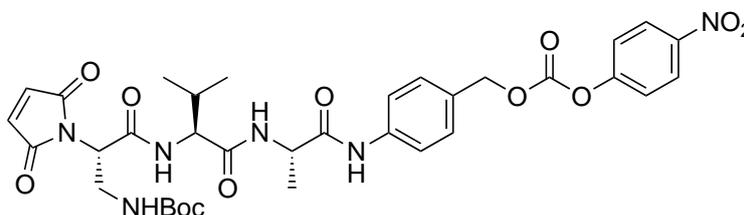


Figure 65 - Profil HPLC analytique du composé **24**.

**ESI-MS** ( $m/z$ ) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  théorique pour  $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_8$  : 560,26 ;  $[\text{M}+\text{H}]^+$  expérimental : 560,2 ; fragmentation à la source -18,0 ; -74,1 ; -100,1 et -118,1.  $[\text{M}+\text{TFA}]^-$  théorique pour  $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_8$  : 675,16 ;  $[\text{M}+\text{TFA}]^-$  expérimental : 672,2.



### Composé **25** – Mal-Dap(Boc)-Val-Ala-PABC-PNP



À une solution du composé **24** (2,9 mg ; 5,2  $\mu\text{mol}$  ; 1 éq.) dans la DMF (50 $\mu\text{L}$ ) à température ambiante ont été ajoutés la DIEA (2,8  $\mu\text{L}$  ; 15,6  $\mu\text{mol}$  ; 3 éq.) et le bis(4-nitrophényl)carbonate (4,8 mg ; 15,6  $\mu\text{mol}$  ; 3 éq.). Le mélange a été agité à température ambiante pendant dix heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **25** (1,9 mg ; 2,6  $\mu\text{mol}$  ; 50%).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA). Temps de rétention : 14,7 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu\text{m}$ ), gradient 20-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 18,3 minutes.

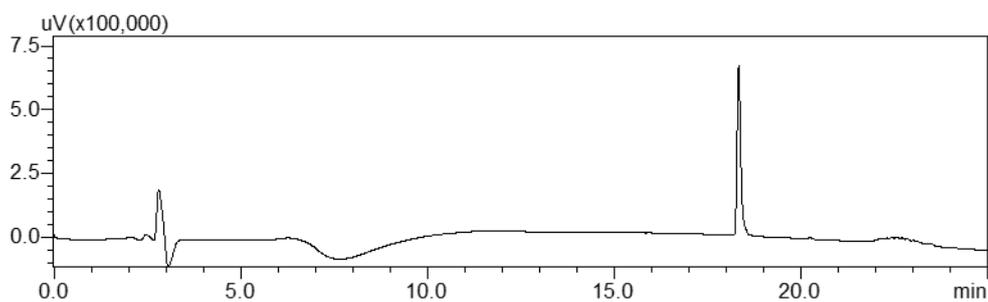


Figure 67 - Profil HPLC analytique du composé **25**.

ESI-MS (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>34</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub> : 725,27 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimentale : 725,3 ;  
 fragmentation à la source -100,1 et 183,1. [M+TFA]<sup>-</sup> théorique pour C<sub>34</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub> : 837,17 ;  
 [M+TFA]<sup>-</sup> expérimentale : 837,2.

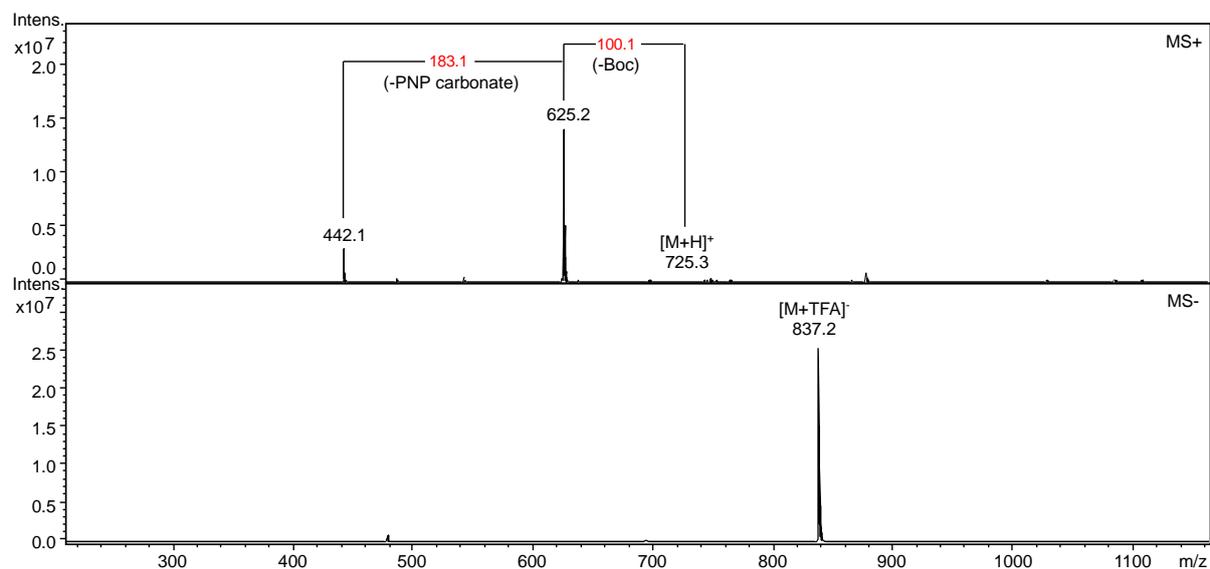
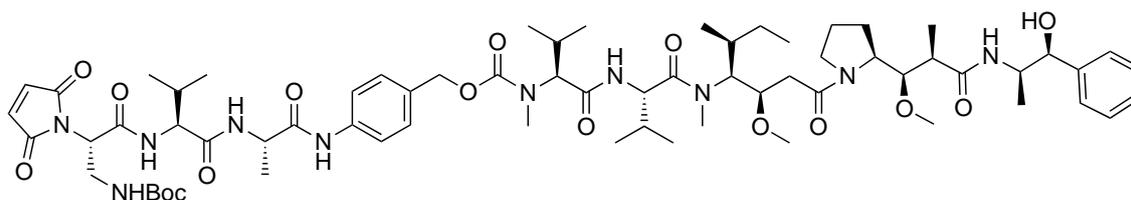


Figure 68 - Spectre de masse ESI-MS du composé **25** en mode positif et négatif.

### Composé **26a** – Mal-Dap(Boc)-Val-Ala-PABC-MMAE



À une solution du composé **25** (1 mg ; 1,4  $\mu\text{mol}$  ; 1 $\text{eq.}$ ) et de MMAE (0,9 mg ; 1,4  $\mu\text{mol}$  ; 1  $\text{eq.}$ ) dans un mélange de DMSO (20  $\mu\text{L}$ ) et de pyridine (10 $\mu\text{L}$ ) à température ambiante a été ajouté le HOBt (0,3 mg ; 2,1  $\mu\text{mol}$  ; 1,5  $\text{eq.}$ ). Le mélange a été agité à température ambiante pendant dix heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **26a** (0,5 mg ; 0,4  $\mu\text{mol}$  ; 30%).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA). Temps de rétention : 15,3 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu\text{m}$ ), gradient 40-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 14,6 minutes.

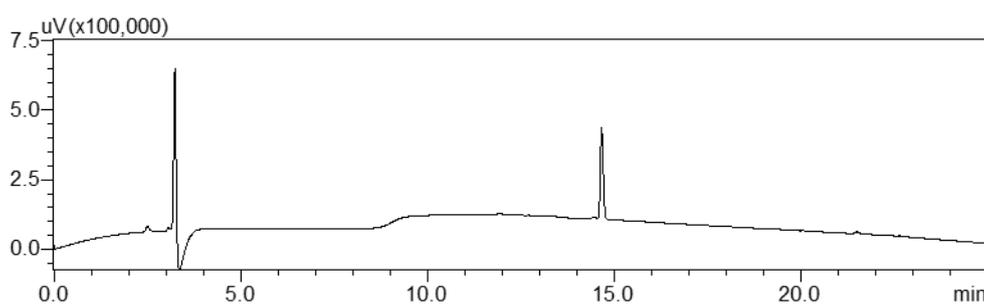


Figure 69 - Profil HPLC analytique du composé **26a**.

**ESI-MS** ( $m/z$ ) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  théorique pour  $\text{C}_{67}\text{H}_{102}\text{N}_{10}\text{O}_{16}$  : 1303,75 ;  $[\text{M}+\text{H}]^+$  expérimentale : 1303,8.  
 $[\text{M}+\text{TFA}]^-$  théorique pour  $\text{C}_{67}\text{H}_{102}\text{N}_{10}\text{O}_{16}$  : 1415,65 ;  $[\text{M}+\text{TFA}]^-$  expérimentale : 1415,7.

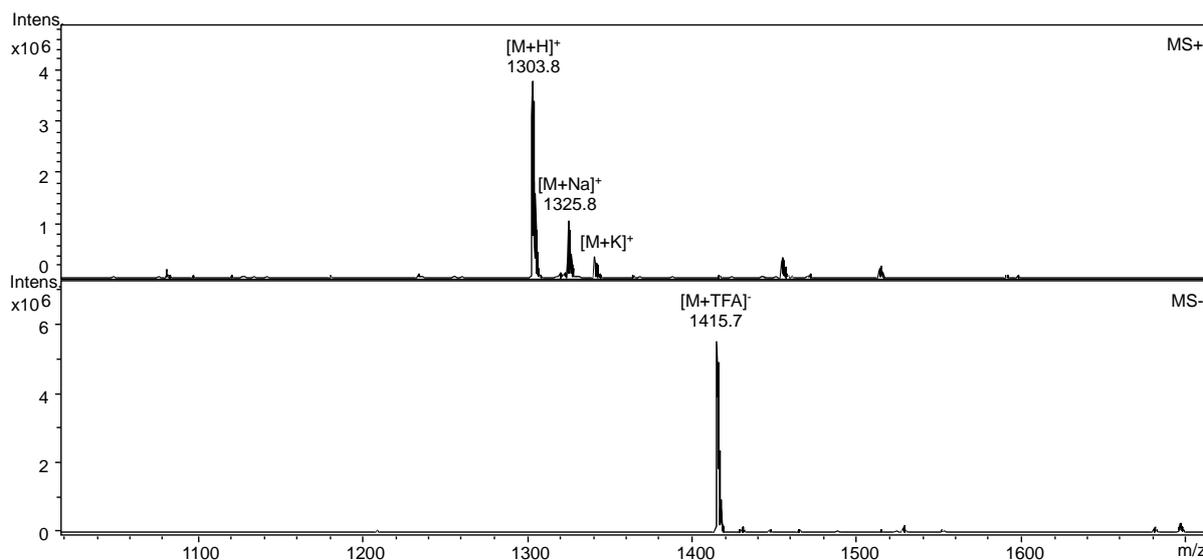


Figure 70 - Spectre de masse ESI-MS du composé **26a** en mode positif et négatif.

### Composé **26b** – Mal-Dap(Boc)-Val-Ala-PABC-[<sup>3</sup>H]MMAE

À une solution du composé **25** (0,6 mg ; 835 nmol ; 2 équ.), du composé **8** (1,7 mCi ; 20,9 nmol ; 0,05 équ.) et de MMAE (0,29 mg ; 397 nmol ; 0,95 équ.) dans un mélange de DMSO (20 µL) et de pyridine (10µL) à température ambiante a été ajouté le HOBt (0,11 mg ; 835 nmol ; 2 équ.). Le mélange a été agité à température ambiante pendant dix heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC analytique. Après évaporation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **26b** (373 µCi ; 100 nmol ; 24%).

**Purification** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3 µm), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF). Temps de rétention : 21,2 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3 µm), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF), détection radioactive par scintillation liquide. Temps de rétention : 21,2 minutes.

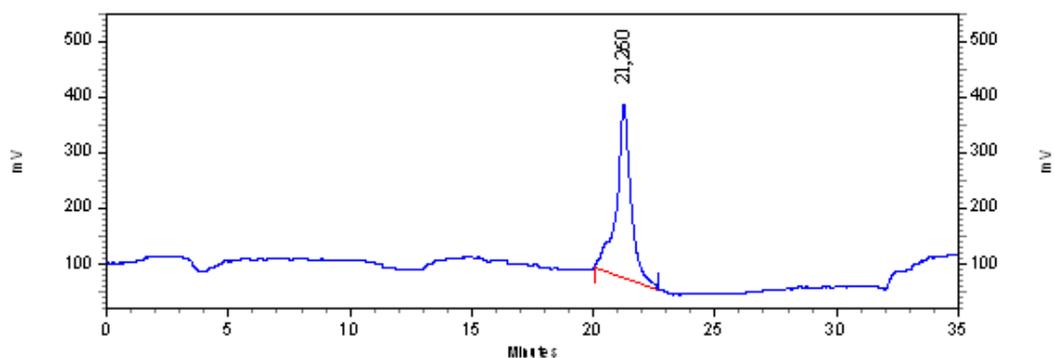


Figure 71 - Profil radio-HPLC analytique du composé **26b**.

MALDI-MS (m/z) : [M+Na]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>67</sub>H<sub>102</sub>N<sub>10</sub>O<sub>16</sub> : 1325,7373 ; [M+Na]<sup>+</sup> expérimental : 1325,7269. [M+K]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>67</sub>H<sub>102</sub>N<sub>10</sub>O<sub>16</sub> : 1341,7112 ; [M+K]<sup>+</sup> expérimental : 1341,7000.

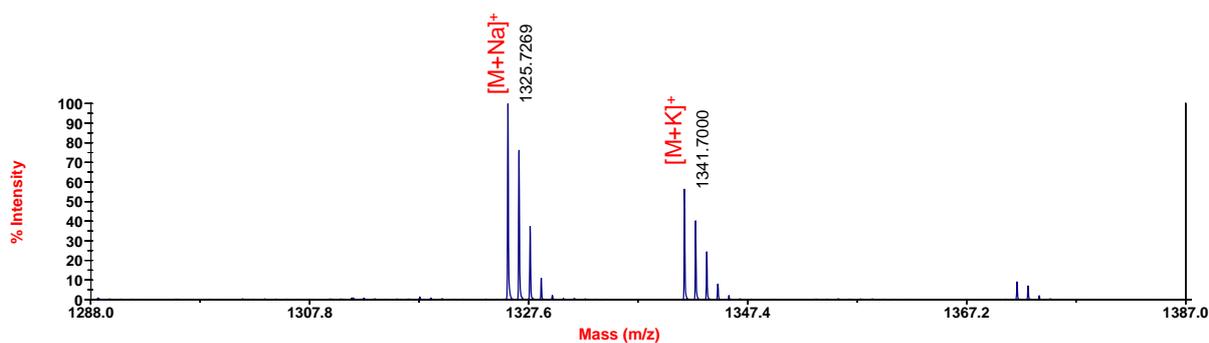


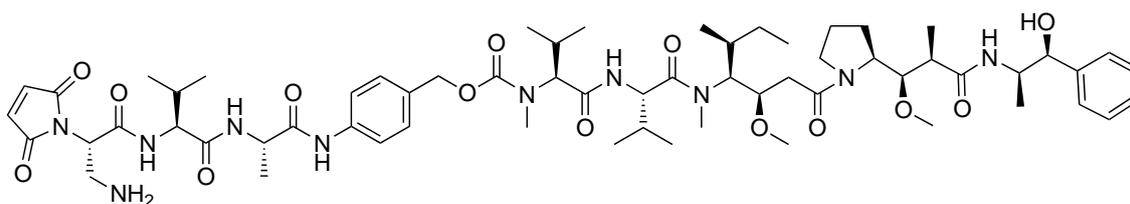
Figure 72 - Spectre de masse MALDI-TOF du composé **26b**.

**Activité spécifique** : dilution isotopique avec 95% de MMAE non marquée conduisant à une abondance isotopique moyenne 0,13 atomes de tritium par molécule de MMAE. Soit une activité spécifique de 3,7 Ci/mmol.

ISOTOPOLOGUE	M+1 (T <sub>0</sub> )	M+3 (T <sub>1</sub> )	M+5 (T <sub>2</sub> )	M+7 (T <sub>3</sub> )	M+9 (T <sub>4</sub> )	M+11 (T <sub>5</sub> )
M/Z	1325,7	1327,7	1329,7	1331,7	1333,7	1335,7
ABONDANCE	95,1%	0,5%	1,6%	2,2%	0,5%	0,1%

Tableau 8 - Abondance relative des différents isotopologues de la molécule marquée **26b**.

### Composé 27a – Mal-Dap-Val-Ala-PABC-MMAE



Le composé **26a** (1,9 mg ; 1,45  $\mu\text{mol}$ ) a été dissout dans une solution d'HCl à 3N (40  $\mu\text{L}$ ) dans un mélange dioxane/DMF (3/1) et le mélange a été agité à température ambiante pendant cinq heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **27a** (0,8 mg ; 665 nmol ; 46%).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA). Temps de rétention : 13,2 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu\text{m}$ ), gradient 20-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 15,5 minutes.

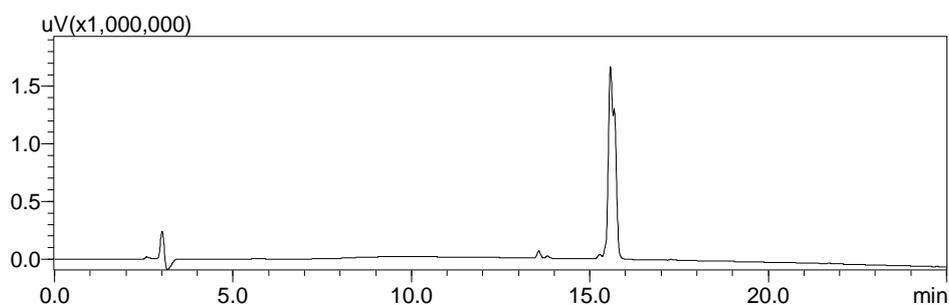


Figure 73 - Profil HPLC analytique du composé **27a**.

**ESI-MS** (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>62</sub>H<sub>94</sub>N<sub>10</sub>O<sub>14</sub> : 1203,70 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 1203,8.  
[M+TFA]<sup>-</sup> théorique pour C<sub>62</sub>H<sub>94</sub>N<sub>10</sub>O<sub>14</sub> : 1315,60 ; [M+TFA]<sup>-</sup> expérimental : 1315,7.

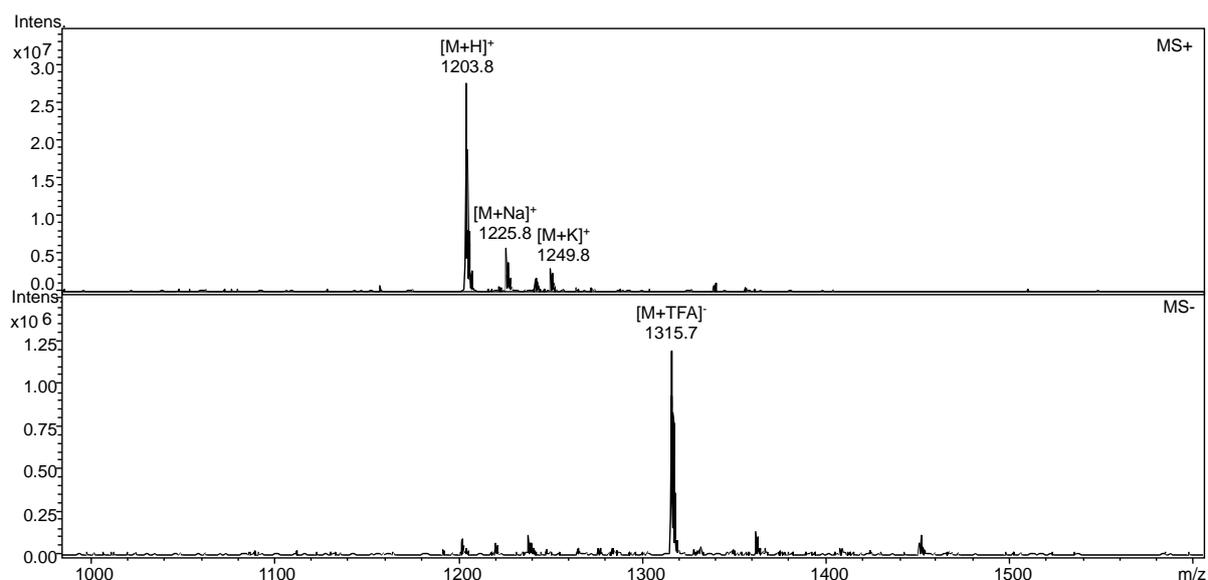


Figure 74 - Spectre de masse ESI-MS du composé **27a** en mode positif et négatif.

### Composé **27b** – Mal-Dap-Val-Ala-PABC-[<sup>3</sup>H]MMAE

Le composé **26b** (200  $\mu$ Ci ; 53 nmol) a été dissout dans une solution d'HCl à 3N (20  $\mu$ L) dans un mélange dioxane/DMF (3/1) et le mélange a été agité à température ambiante pendant cinq heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC analytique. Après évaporation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **27b** (72  $\mu$ Ci ; 19 nmol ; 36%).

**Purification** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3  $\mu$ m), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF). Temps de rétention : 16,4 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3  $\mu$ m), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF), détection radioactive par scintillation liquide. Temps de rétention : 16,4 minutes.

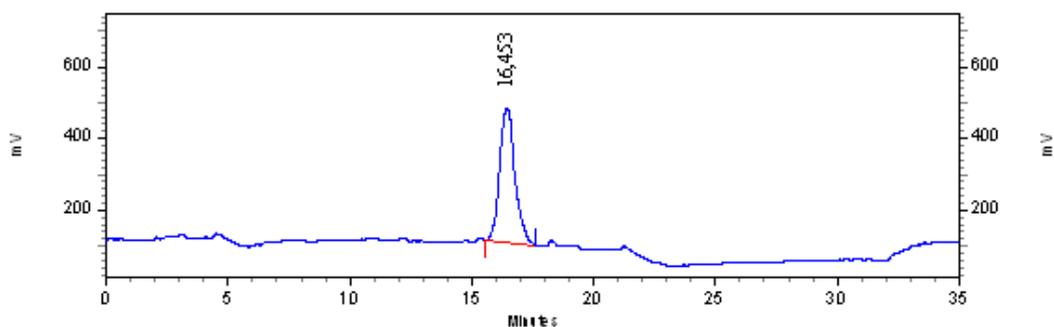


Figure 75 - Profil radio-HPLC analytique du composé **27b**.

MALDI-MS (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>62</sub>H<sub>94</sub>N<sub>10</sub>O<sub>14</sub> : 1203,7029 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 1203,6849. [M+Na]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>62</sub>H<sub>94</sub>N<sub>10</sub>O<sub>14</sub> : 1225,6848 ; [M+Na]<sup>+</sup> expérimental : 1225,6753. [M+K]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>62</sub>H<sub>94</sub>N<sub>10</sub>O<sub>14</sub> : 1241,6588 ; [M+K]<sup>+</sup> expérimental : 1241,6522.

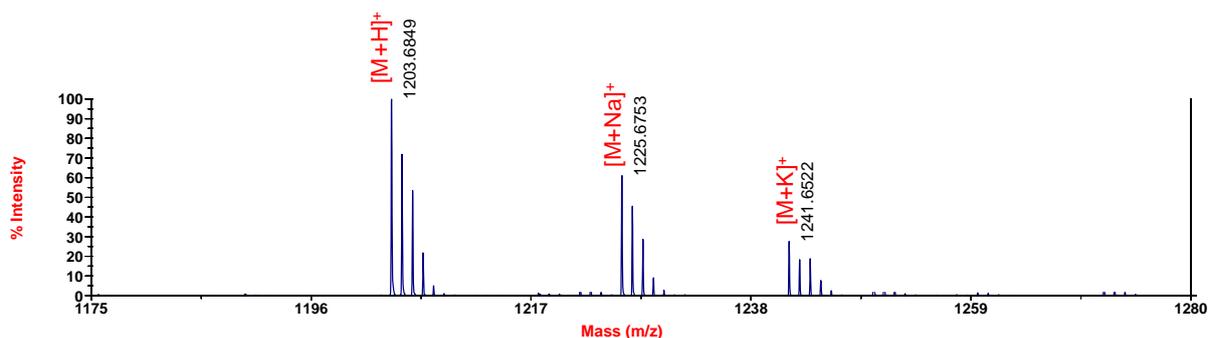


Figure 76 - Spectre de masse MALDI-TOF du composé **27b**.

**Activité spécifique** : dilution isotopique avec 95% de MMAE non marquée conduisant à une abondance isotopique moyenne 0,13 atomes de tritium par molécule de MMAE. Soit une activité spécifique de 3,7 Ci/mmol.

ISOTOPOLOGUE	M+1 (T <sub>0</sub> )	M+3 (T <sub>1</sub> )	M+5 (T <sub>2</sub> )	M+7 (T <sub>3</sub> )	M+9 (T <sub>4</sub> )	M+11 (T <sub>5</sub> )
M/Z	1203,7	1205,7	1207,7	1209,7	1211,7	1213,7
ABONDANCE	95,1%	0,5%	1,6%	2,2%	0,5%	0,1%

Tableau 13 - Abondance relative des différents isotopologues de la molécule marquée **27b**.

### 3.3.4 Le linker-cytotoxique clivable glutamine

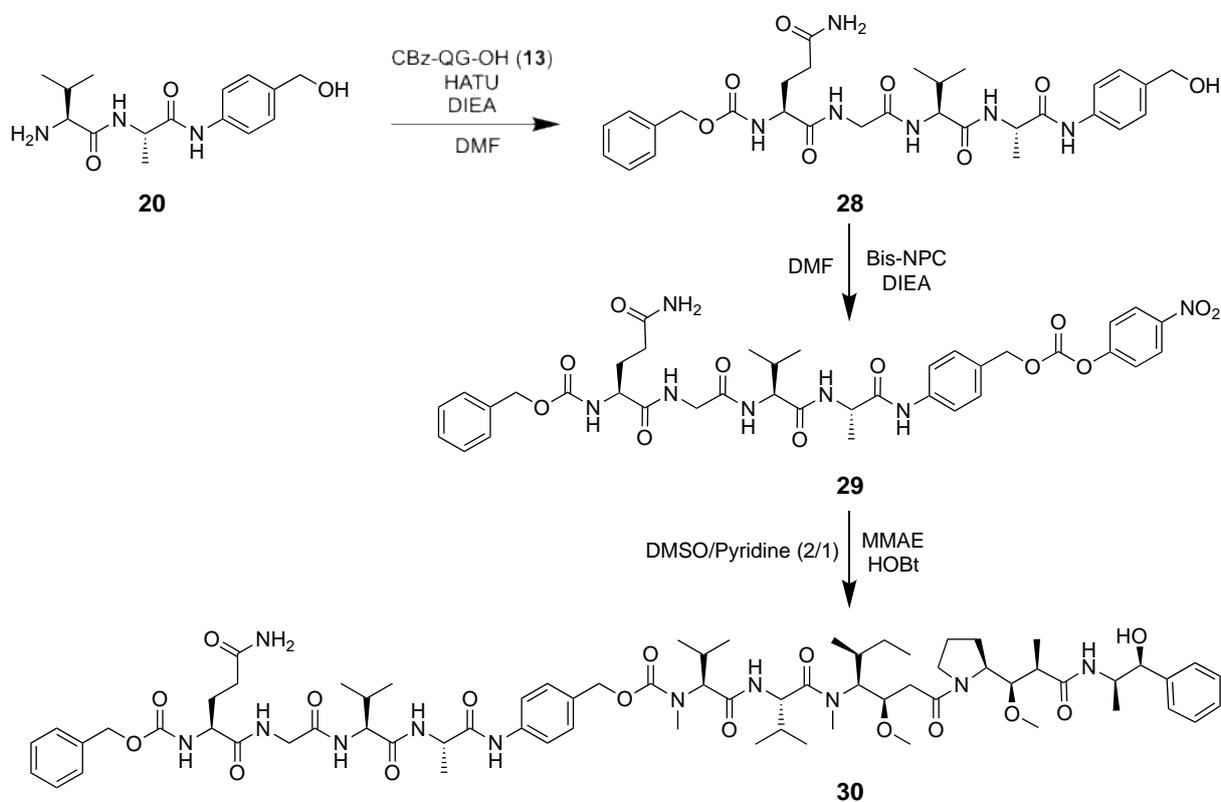
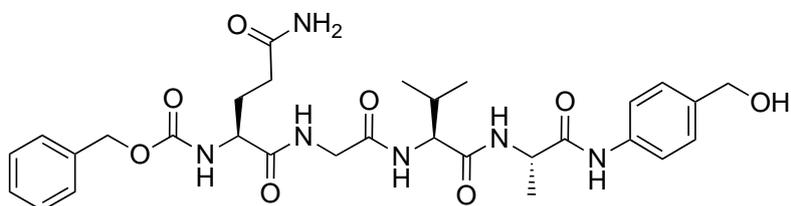


Figure 77 - Voie de synthèse du linker-cytotoxique clivable **30**.

#### Composé **28** –CBz-Gln-Gly-Val-Ala-PABOH



À une solution du composé **13** (7,7 mg ; 22,8  $\mu\text{mol}$  ; 2  $\text{eq.}$ ) dans la DMF (100  $\mu\text{L}$ ) à température ambiante ont été ajoutés la DIEA (9  $\mu\text{L}$  ; 57  $\mu\text{mol}$  ; 5  $\text{eq.}$ ) et le HATU (6,5 mg ; 17,1  $\mu\text{mol}$  ; 1,5  $\text{eq.}$ ). Le mélange a été agité à température ambiante quelques instants avant d'ajouter le composé **20** (3,3 mg ; 11,4  $\mu\text{mol}$  ; 1  $\text{eq.}$ ) et de poursuivre l'agitation pendant deux heures. Le

produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **28** (3,9 mg ; 6,4  $\mu$ mol ; 56%).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu$ m), gradient 0-50% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA). Temps de rétention : 15,5 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex® C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu$ m), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 15,3 minutes.

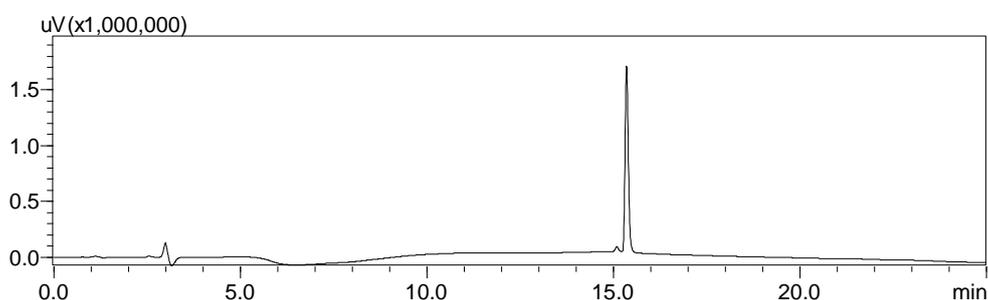


Figure 78 - Profil HPLC analytique du composé **28**.

**ESI-MS** (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>30</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub> : 613,29 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 613,3 ; fragmentation à la source -18,0. [M+TFA]<sup>-</sup> théorique pour C<sub>30</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub> : 725,19 ; [M+TFA]<sup>-</sup> expérimental : 725,2.

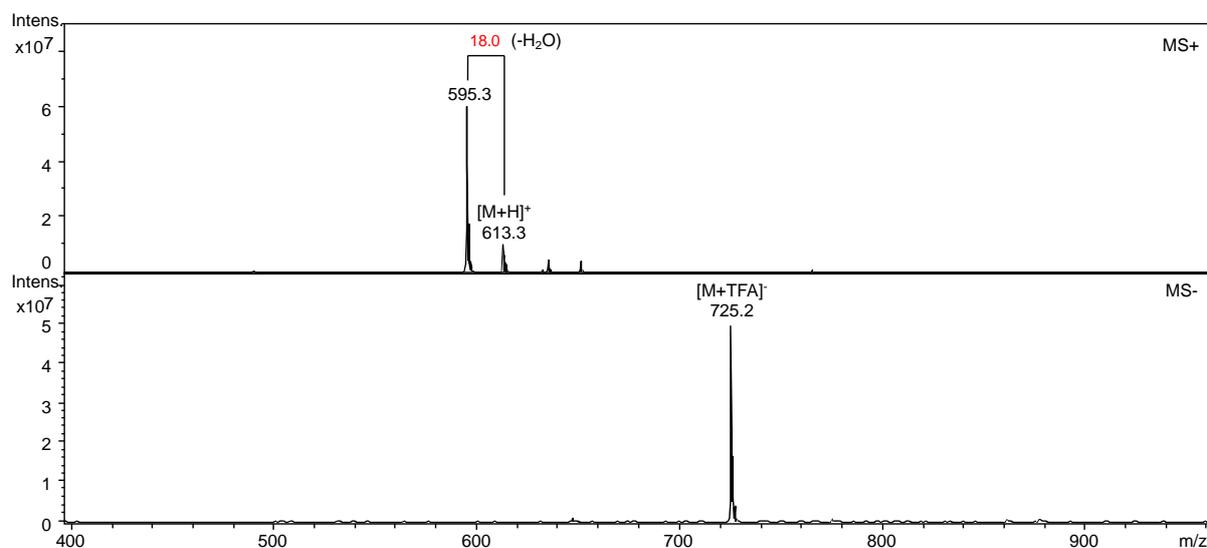
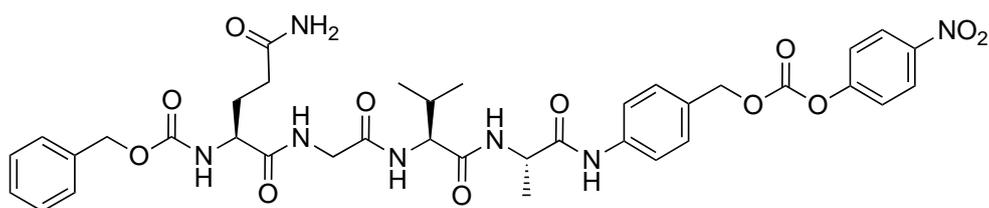


Figure 79 - Spectre de masse ESI-MS du composé **28** en mode positif et négatif.

### Composé 29 – CBz-Gln-Gly-Val-Ala-PABC-PNP



À une solution du composé **28** (1 mg ; 1,6  $\mu\text{mol}$  ; 1  $\text{eq.}$ ) dans la DMF (30  $\mu\text{L}$ ) à température ambiante ont été ajoutés la DIEA (1  $\mu\text{L}$  ; 8  $\mu\text{mol}$  ; 3  $\text{eq.}$ ) et le bis(4-nitrophényl)carbonate (1,5 mg ; 8  $\mu\text{mol}$  ; 3  $\text{eq.}$ ). Le mélange a été agité à température ambiante pendant dix heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **29** (0,7 mg ; 0,9  $\mu\text{mol}$  ; 56 %).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA). Temps de rétention : 13,9 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 19,0 minutes.

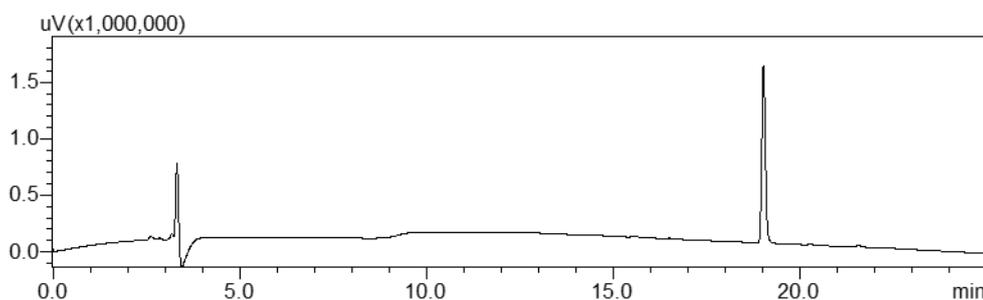


Figure 80 - Profil HPLC analytique du composé **29**.

**ESI-MS** (m/z) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  théorique pour  $\text{C}_{37}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_{12}$  : 778,30 ;  $[\text{M}+\text{H}]^+$  expérimental : 778,3 ; fragmentation à la source -183,0.  $[\text{M}+\text{TFA}]^-$  théorique pour  $\text{C}_{37}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_{12}$  : 890,20 ;  $[\text{M}+\text{H}]^+$  expérimental : 890,2.

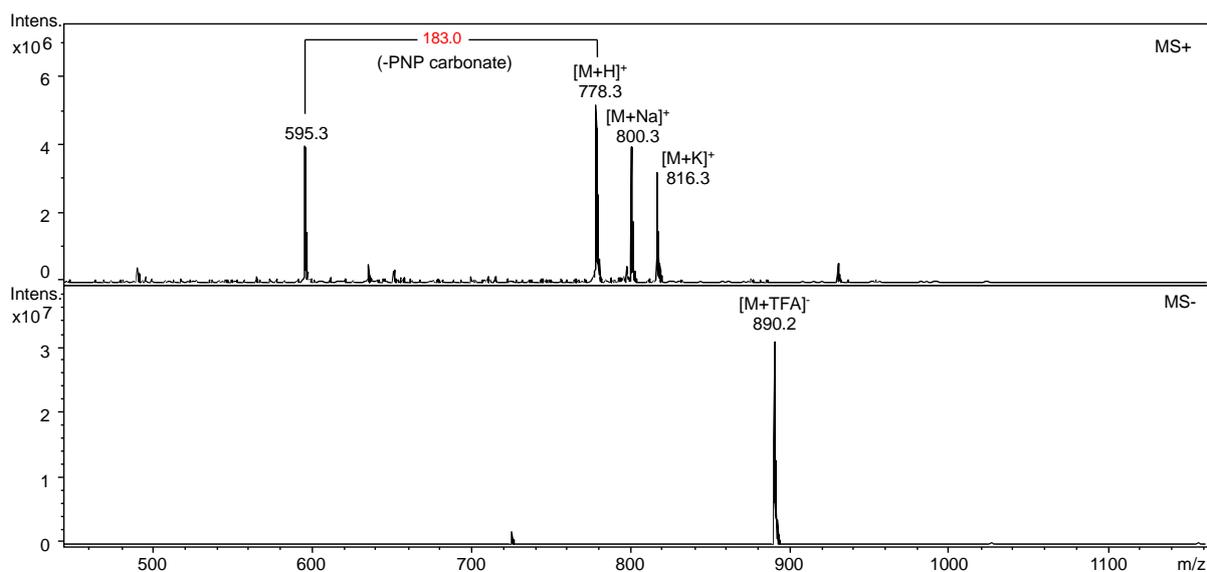
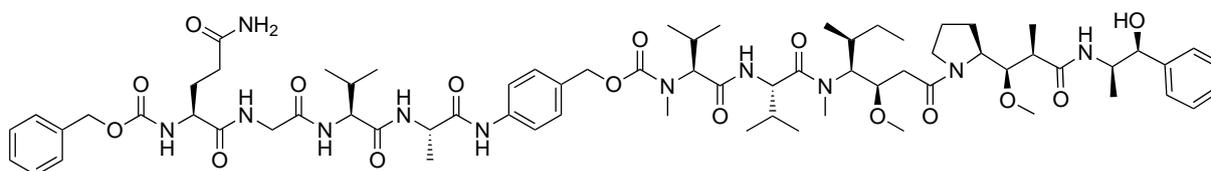


Figure 81 - Spectre de masse ESI-MS du composé **29** en mode positif et négatif.

### Composé **30** – CBz-Gln-Gly-Val-Ala-PABC-MMAE



À une solution du composé **29** (0,7 mg ; 0,9  $\mu\text{mol}$  ; 1  $\text{éq.}$ ) et de MMAE (0,6 mg ; 0,9  $\mu\text{mol}$  ; 1 $\text{éq.}$ ) dans un mélange de DMSO (20  $\mu\text{L}$ ) et de pyridine (10 $\mu\text{L}$ ) à température ambiante a été ajouté le HOBt (0,2 mg ; 1,3  $\mu\text{mol}$  ; 1,5  $\text{éq.}$ ). Le mélange a été agité à température ambiante pendant dix heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **30** (0,5 mg ; 0,36  $\mu\text{mol}$  ; 40 %).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA). Temps de rétention : 14,5 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex® C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6 µm), gradient 40-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 11,9 minutes.

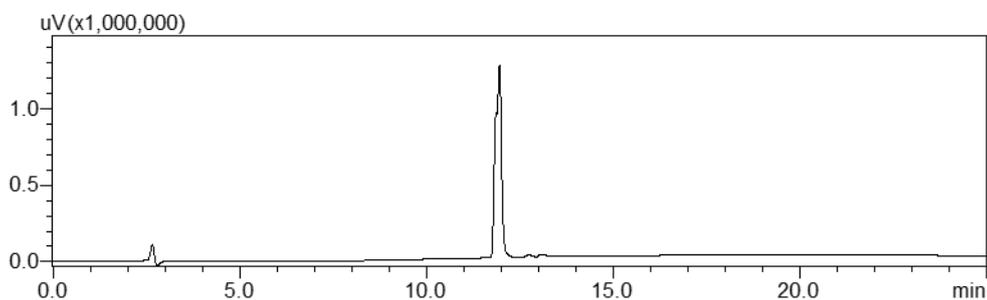


Figure 82 - Profil HPLC analytique du composé **30**.

**ESI-MS (m/z)** : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>70</sub>H<sub>105</sub>N<sub>11</sub>O<sub>16</sub> : 1356,77 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 1356,9.  
[M+TFA]<sup>-</sup> théorique pour C<sub>70</sub>H<sub>105</sub>N<sub>11</sub>O<sub>16</sub> : 1468,67 ; [M+TFA]<sup>-</sup> expérimental : 1468,9.

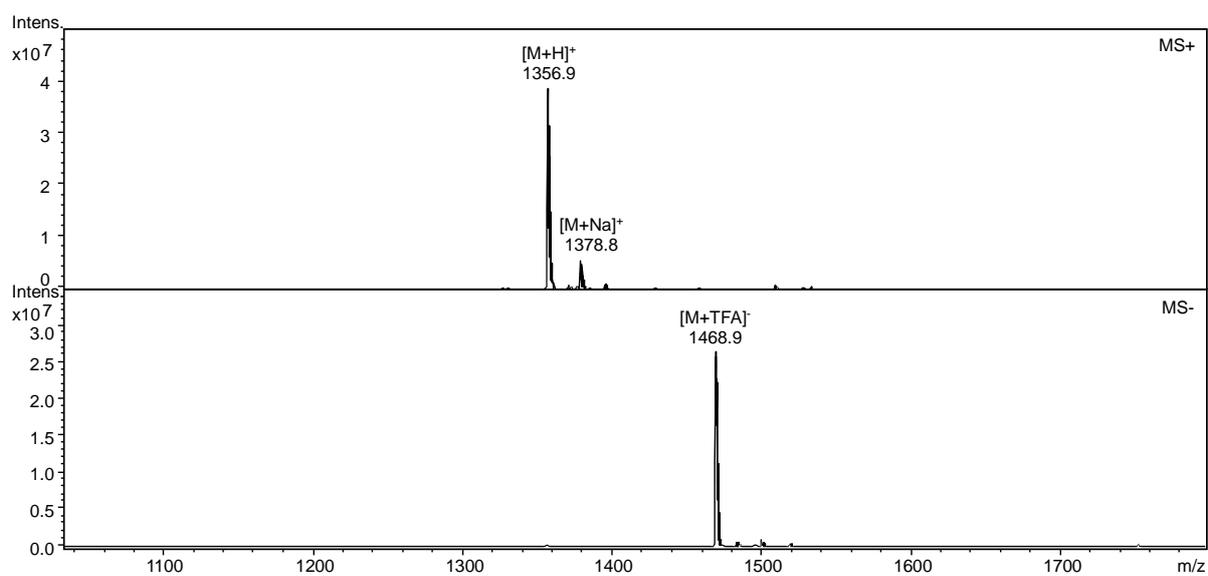


Figure 83 - Spectre de masse ESI-MS du composé **30** en mode positif et négatif.

### 3.3.5 Le linker-cytotoxique clivable amine primaire

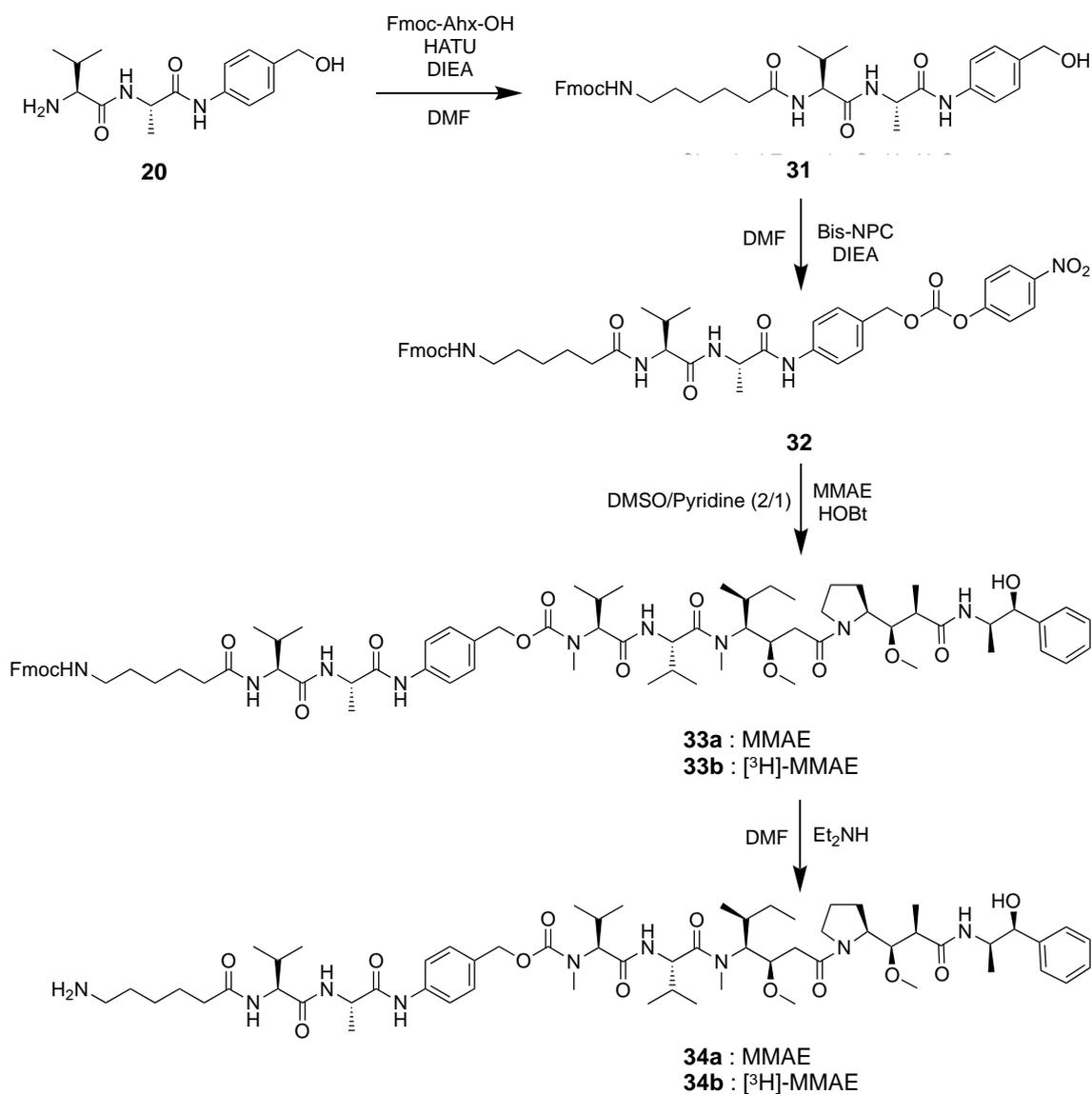
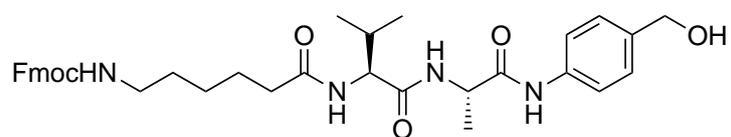


Figure 84 - Voie de synthèse du linker-cytotoxique clivable **34a/34b**.

#### Composé 31 – Fmoc-Ahx-Val-Ala-PABOH



À une solution de Fmoc-Ahx-OH (10, 5 mg ; 29,8  $\mu\text{mol}$  ; 2  $\text{eq.}$ ) dans la DMF (200  $\mu\text{L}$ ) à température ambiante ont été ajoutés la DIEA (11,7  $\mu\text{L}$  ; 74,5  $\mu\text{mol}$  ; 5  $\text{eq.}$ ) et le HATU (8,5 mg ; 22,3  $\mu\text{mol}$  ; 1,5  $\text{eq.}$ ). Le mélange a été agité à température ambiante quelques instants avant d'ajouter le composé **20** (4,3 mg ; 14,9  $\mu\text{mol}$  ; 1  $\text{eq.}$ ) et de poursuivre l'agitation pendant deux heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **31** (5 mg ; 7,9  $\mu\text{mol}$  ; 53%).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA). Temps de rétention : 14,1 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu\text{m}$ ), gradient 20-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 16,8 minutes.

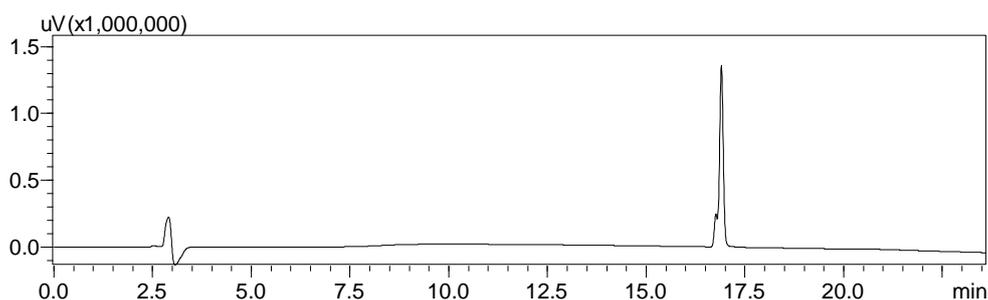


Figure 85 - Profil HPLC analytique du composé **31**.

**ESI-MS** ( $m/z$ ) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  théorique pour  $\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_6$  : 629,33 ;  $[\text{M}+\text{H}]^+$  expérimental : 629,3 ; fragmentation à la source -18,0 et -275,2.  $[\text{M}+\text{TFA}]^-$  théorique pour  $\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_6$  : 741,23 ;  $[\text{M}+\text{TFA}]^-$  expérimental : 741,2.

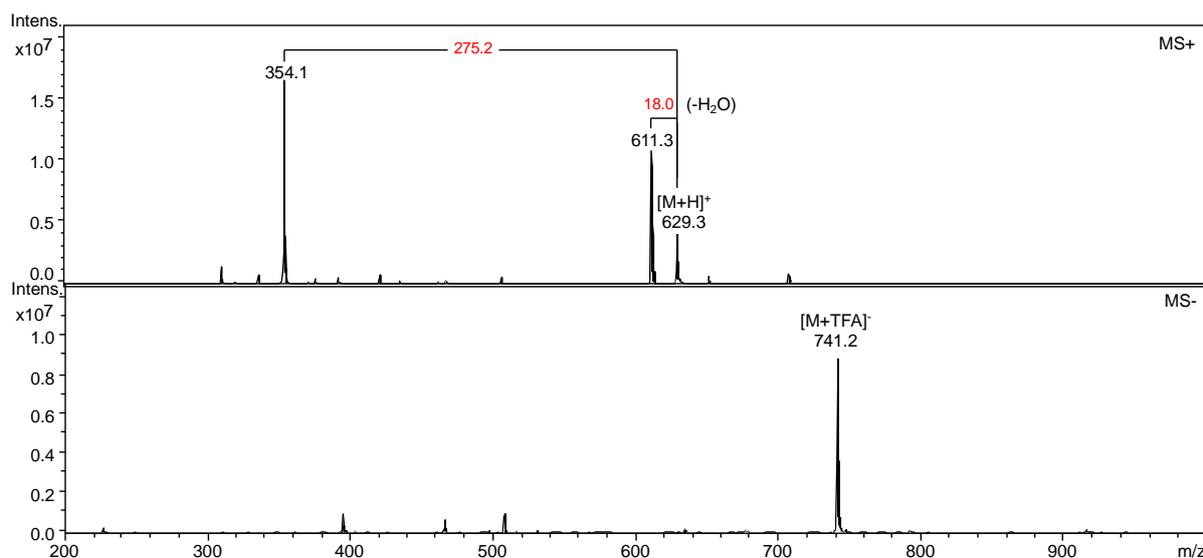
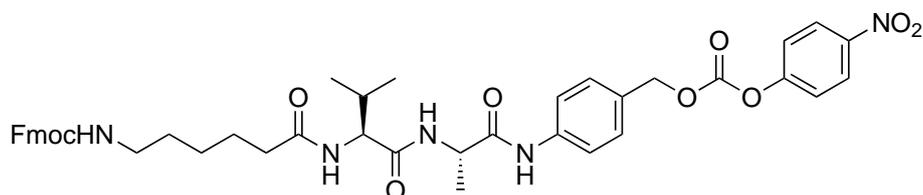


Figure 86 - Spectre de masse ESI-MS du composé **31** en mode positif et négatif.

### Composé **32** – Fmoc-Ahx-Val-Ala-PABC-PNP



À une solution du composé **31** (5 mg ; 7,9  $\mu\text{mol}$  ; 1  $\text{eq.}$ ) dans la DMF (100  $\mu\text{L}$ ) à température ambiante ont été ajoutés la DIEA (4,3  $\mu\text{L}$  ; 23,7  $\mu\text{mol}$  ; 3  $\text{eq.}$ ) et le bis(4-nitrophényl)carbonate (7,9 mg ; 23,7  $\mu\text{mol}$  ; 3  $\text{eq.}$ ). Le mélange a été agité à température ambiante pendant dix heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **32** (3,2 mg ; 4,1  $\mu\text{mol}$  ; 51%).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu\text{m}$ ), gradient 30-80% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA). Temps de rétention : 19,8 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu\text{m}$ ), gradient 40-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 16,8 minutes.

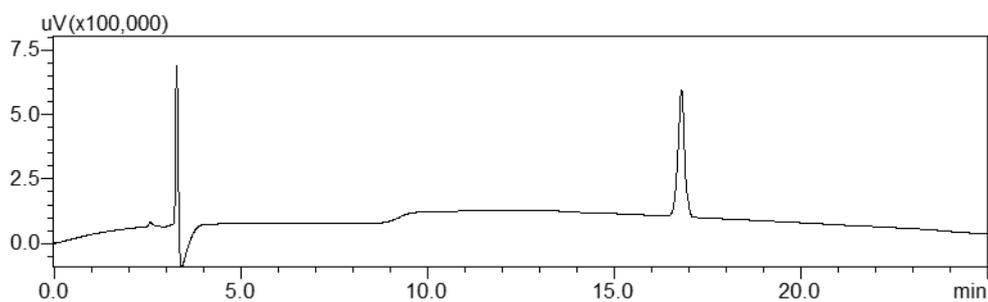


Figure 87 - Profil HPLC analytique du composé **32**.

ESI-MS (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>43</sub>H<sub>47</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub> : 794,33 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 794,3 ; fragmentation à la source -183,0. [M+TFA]<sup>-</sup> théorique pour C<sub>43</sub>H<sub>47</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub> : 906,23 ; [M+TFA]<sup>-</sup> expérimental : 906,3.

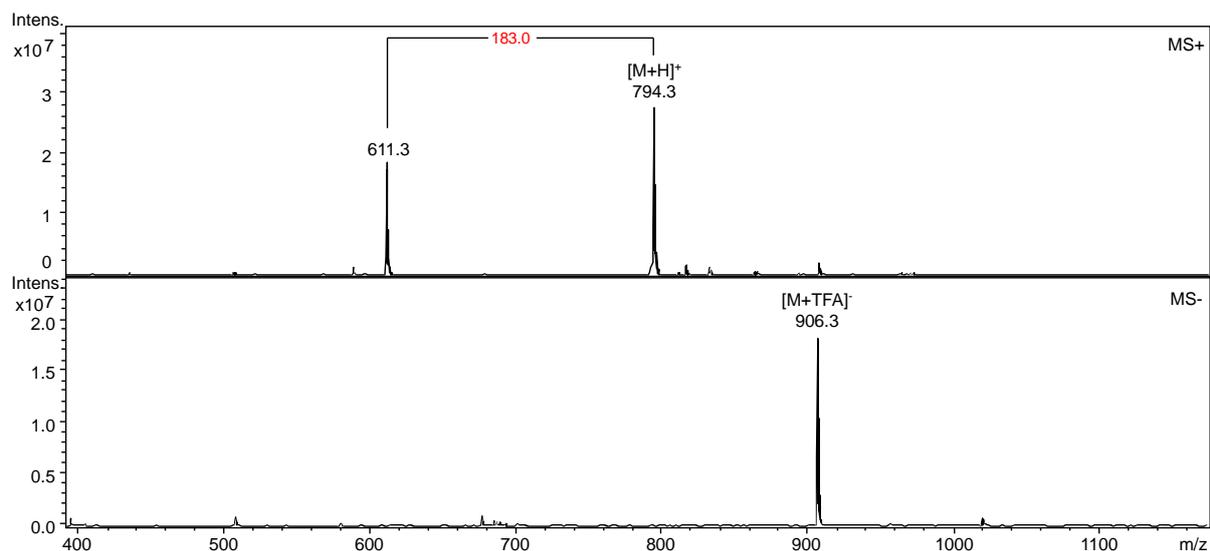
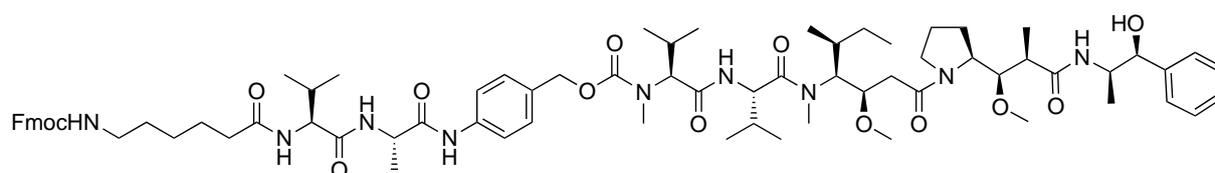


Figure 88 - Spectre de masse ESI-MS du composé **32** en mode positif et négatif.

### Composé 33a – Fmoc-Ahx-Val-Ala-PABC-MMAE



À une solution du composé **32** (1,1 mg ; 1,4  $\mu\text{mol}$  ; 1  $\text{eq.}$ ) et de MMAE (0,9 mg ; 1,4  $\mu\text{mol}$  ; 1  $\text{eq.}$ ) dans un mélange de DMSO (20  $\mu\text{L}$ ) et de pyridine (10 $\mu\text{L}$ ) à température ambiante a été ajouté le HOBt (0,3 mg ; 2,1  $\mu\text{mol}$  ; 1,5  $\text{eq.}$ ). Le mélange a été agité à température ambiante pendant dix heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **33a** (0,76 mg ; 0,56  $\mu\text{mol}$  ; 40%).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA). Temps de rétention : 16,9 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu\text{m}$ ), gradient 40-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 17,1 minutes.

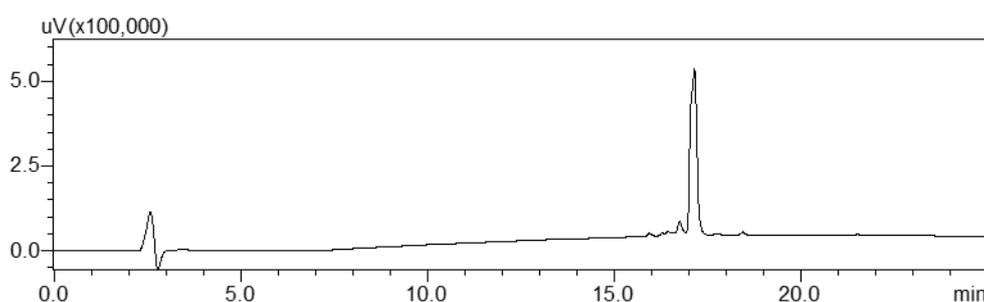


Figure 89 - Profil HPLC analytique du composé **33a**.

**ESI-MS** ( $m/z$ ) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  théorique pour  $\text{C}_{76}\text{H}_{109}\text{N}_9\text{O}_{14}$  : 1372,81 ;  $[\text{M}+\text{H}]^+$  expérimental : 1372,9.  
 $[\text{M}+\text{TFA}]^-$  théorique pour  $\text{C}_{76}\text{H}_{109}\text{N}_9\text{O}_{14}$  : 1484,71 ;  $[\text{M}+\text{TFA}]^-$  expérimental : 1485,1.

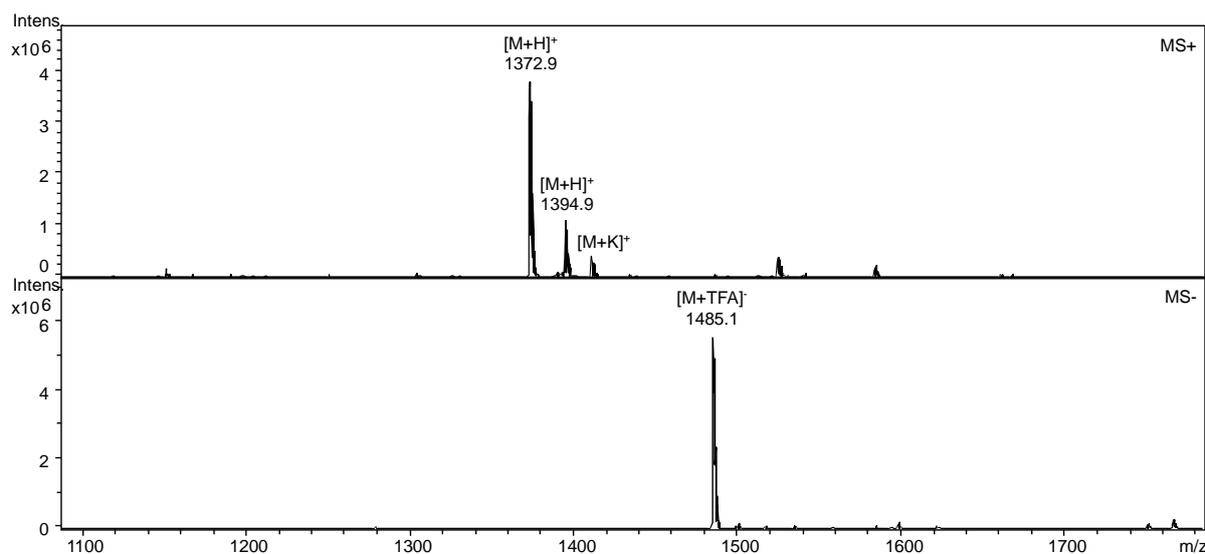


Figure 90 - Spectre de masse ESI-MS du composé **33a** en mode positif et négatif.

### Composé **33b** – Fmoc-Ahx-Val-Ala-PABC-<sup>[3H]</sup>MMAE

À une solution du composé **32** (0,9 mg ; 1,1  $\mu\text{mol}$  ; 2  $\text{eq.}$ ), du composé **8** (2,4 mCi ; 29,5 nmol ; 0,05  $\text{eq.}$ ) et de MMAE (0,4 mg ; 561 nmol ; 0,95  $\text{eq.}$ ) dans un mélange de DMSO (20  $\mu\text{L}$ ) et de pyridine (10  $\mu\text{L}$ ) à température ambiante a été ajouté le HOBT (0,15 mg ; 1,1  $\mu\text{mol}$  ; 2  $\text{eq.}$ ). Le mélange a été agité à température ambiante pendant dix heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC analytique. Après évaporation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **33b** (572  $\mu\text{Ci}$  ; 154 nmol ; 26%).

**Purification** : colonne Phenomenex Luna<sup>®</sup> Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF). Temps de rétention : 22,9 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Luna<sup>®</sup> Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF), détection radioactive par scintillation liquide. Temps de rétention : 22,9 minutes.

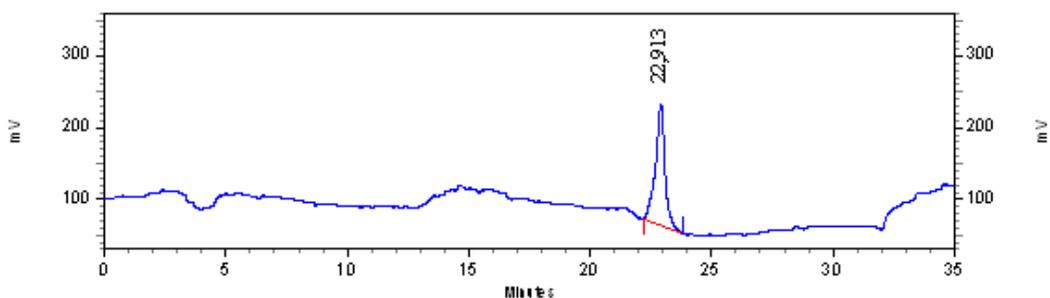


Figure 91 - Profil radio-HPLC analytique du composé **33b**.

MALDI-MS (m/z) : [M+Na]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>76</sub>H<sub>109</sub>N<sub>9</sub>O<sub>14</sub> : 1394,7991 ; [M+Na]<sup>+</sup> expérimentale : 1394,8022. [M+K]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>76</sub>H<sub>109</sub>N<sub>9</sub>O<sub>14</sub> : 1410,7731 ; [M+K]<sup>+</sup> expérimentale : 1410,7755.

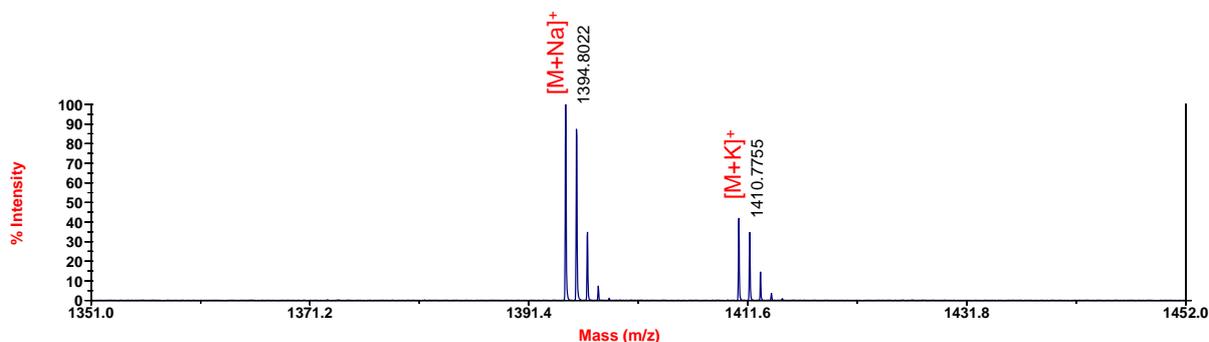


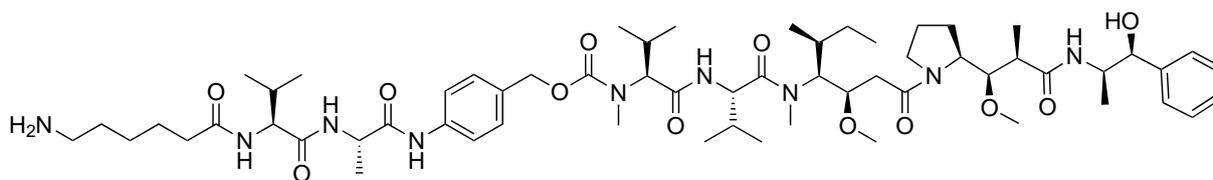
Figure 92 - Spectre de masse MALDI-TOF du composé **33b**.

**Activité spécifique** : dilution isotopique avec 95% de MMAE non marquée conduisant à une abondance isotopique moyenne 0,13 atomes de tritium par molécule de MMAE. Soit une activité spécifique de 3,7 Ci/mmol.

ISOTOPOLOGUE	M+1 (T <sub>0</sub> )	M+3 (T <sub>1</sub> )	M+5 (T <sub>2</sub> )	M+7 (T <sub>3</sub> )	M+9 (T <sub>4</sub> )	M+11 (T <sub>5</sub> )
M/Z	1394,8	1395,8	1397,8	1399,8	1401,8	1403,8
ABONDANCE	95,1%	0,5%	1,6%	2,2%	0,5%	0,1%

Tableau 10 - Abondance relative des différents isotopologues de la molécule marquée **33b**.

**Composé 34a** – H<sub>2</sub>N-Ahx-Val-Ala-PABC-MMAE



À une solution du composé **33a** (0,76 mg ; 0,56 µmol ; 1 éq.) dans la DMF (20 µL) à température ambiante a été ajoutée la piperidine (11,2 µmol ; 1,7 µL ; 20 éq.). Le mélange a été agité à température ambiante pendant une heure. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **34a** (0,5 mg ; 0,43 µmol ; 76%).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5 µm), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA). Temps de rétention : 13,6 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex® C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6 µm), gradient 20-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 15,2 minutes.

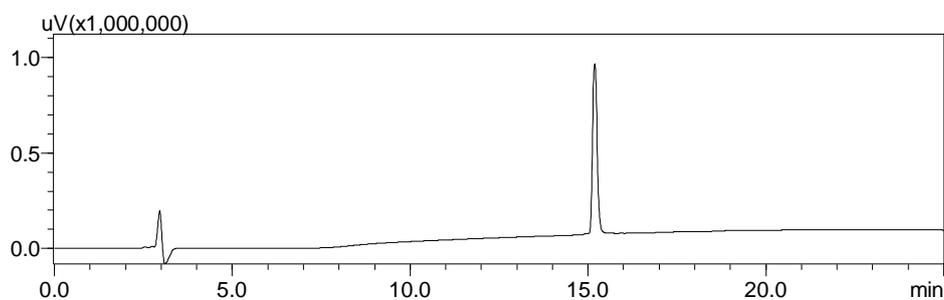


Figure 93 - Profil HPLC analytique du composé **34a**.

**ESI-MS** (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>61</sub>H<sub>99</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub> : 1150,74 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 1150,8.  
[M+TFA]<sup>-</sup> théorique pour C<sub>61</sub>H<sub>99</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub> : 1262,64 ; [M+TFA]<sup>-</sup> expérimental : 1262,8.

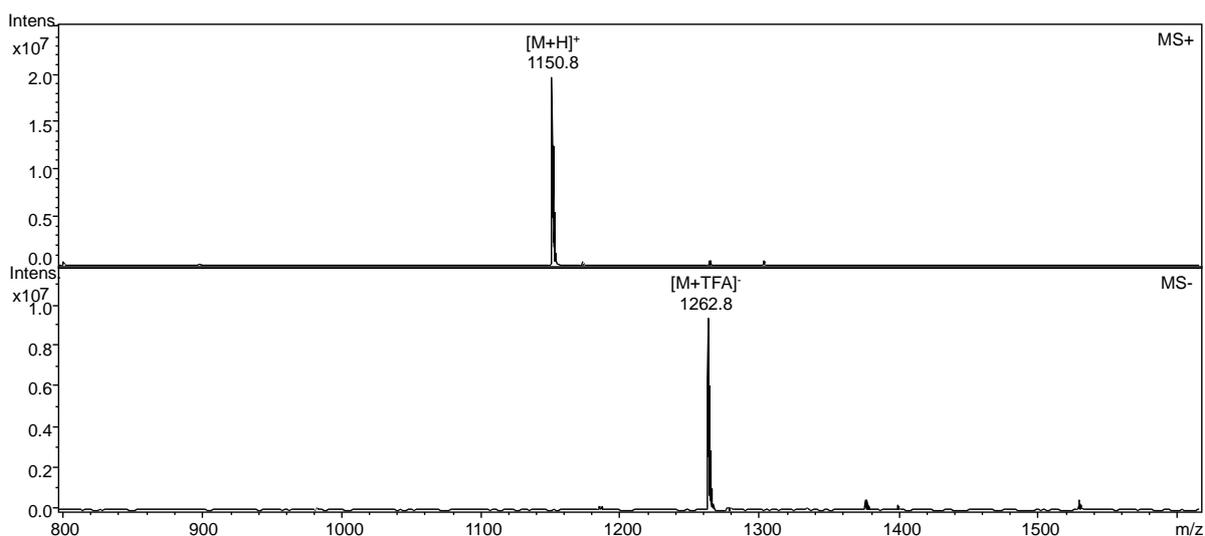


Figure 94 - Spectre de masse ESI-MS du composé **34a** en mode positif et négatif.

### Composé **34b** – H<sub>2</sub>N-Ahx-Val-Ala-PABC-[<sup>3</sup>H]MMAE

À une solution du composé **33b** (572 µCi ; 154 nmol ; 1 éq.) dans la DMF (20 µL) à température ambiante a été ajoutée la piperidine (0,5 µL ; 3 µmol ; 20 éq.). Le mélange a été agité à température ambiante pendant une heure. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC analytique. Après évaporation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **34b** (408 µCi ; 110 nmol ; 71%).

**Purification** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3 µm), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF). Temps de rétention : 16,4 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3 µm), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF), détection radioactive par scintillation liquide. Temps de rétention : 16,4 minutes.

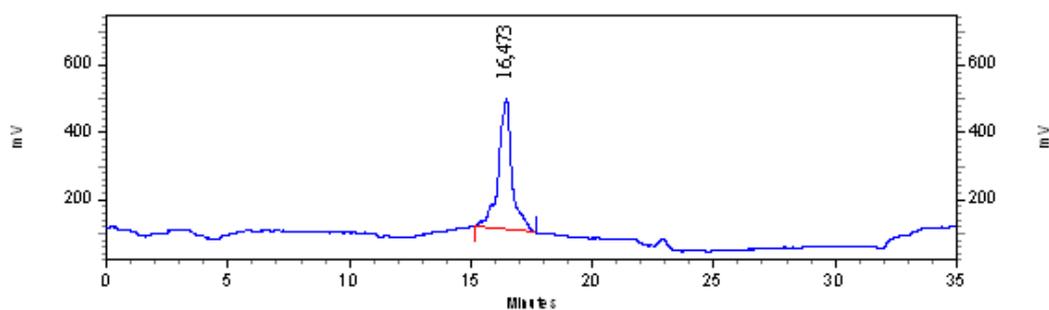


Figure 95 - Profil radio-HPLC analytique du composé **34b**.

MALDI-MS (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>61</sub>H<sub>99</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub> : 1150,7491 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 1150,7501. [M+Na]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>61</sub>H<sub>99</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub> : 1172,7311 ; [M+Na]<sup>+</sup> expérimental : 1172,7189. [M+K]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>61</sub>H<sub>99</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub> : 1188,7050 ; [M+K]<sup>+</sup> expérimental : 1188,6986.

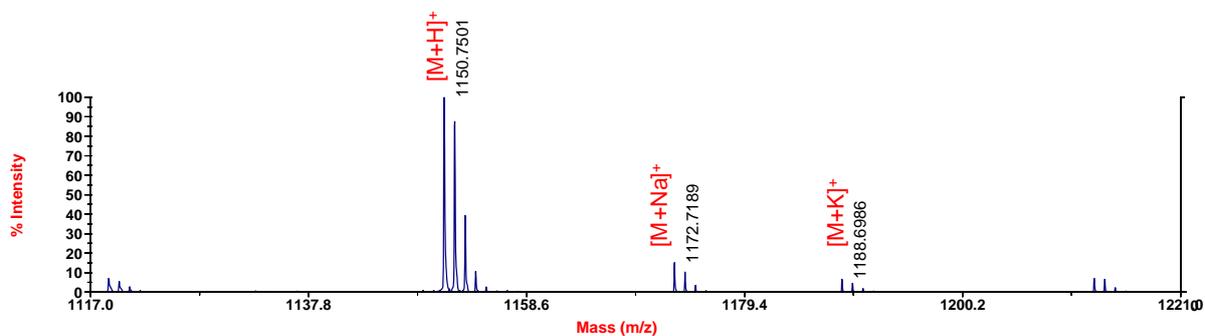


Figure 96 - Spectre de masse MALDI-TOF du composé **34b**.

**Activité spécifique** : dilution isotopique avec 95% de MMAE non marquée conduisant à une abondance isotopique moyenne 0,13 atomes de tritium par molécule de MMAE. Soit une activité spécifique de 3,7 Ci/mmol.

ISOTOPOLOGUE	M+1 (T <sub>0</sub> )	M+3 (T <sub>1</sub> )	M+5 (T <sub>2</sub> )	M+7 (T <sub>3</sub> )	M+9 (T <sub>4</sub> )	M+11 (T <sub>5</sub> )
M/Z	1150,7	1152,7	1154,7	1156,7	1158,7	1160,7
ABONDANCE	95,1%	0,5%	1,6%	2,2%	0,5%	0,1%

Tableau 11 - Abondance relative des différents isotopologues de la molécule marquée **34b**.

## 4 SYNTHÈSE D'UNE MOLÉCULE RADIOMARQUÉE AU CARBONE 14

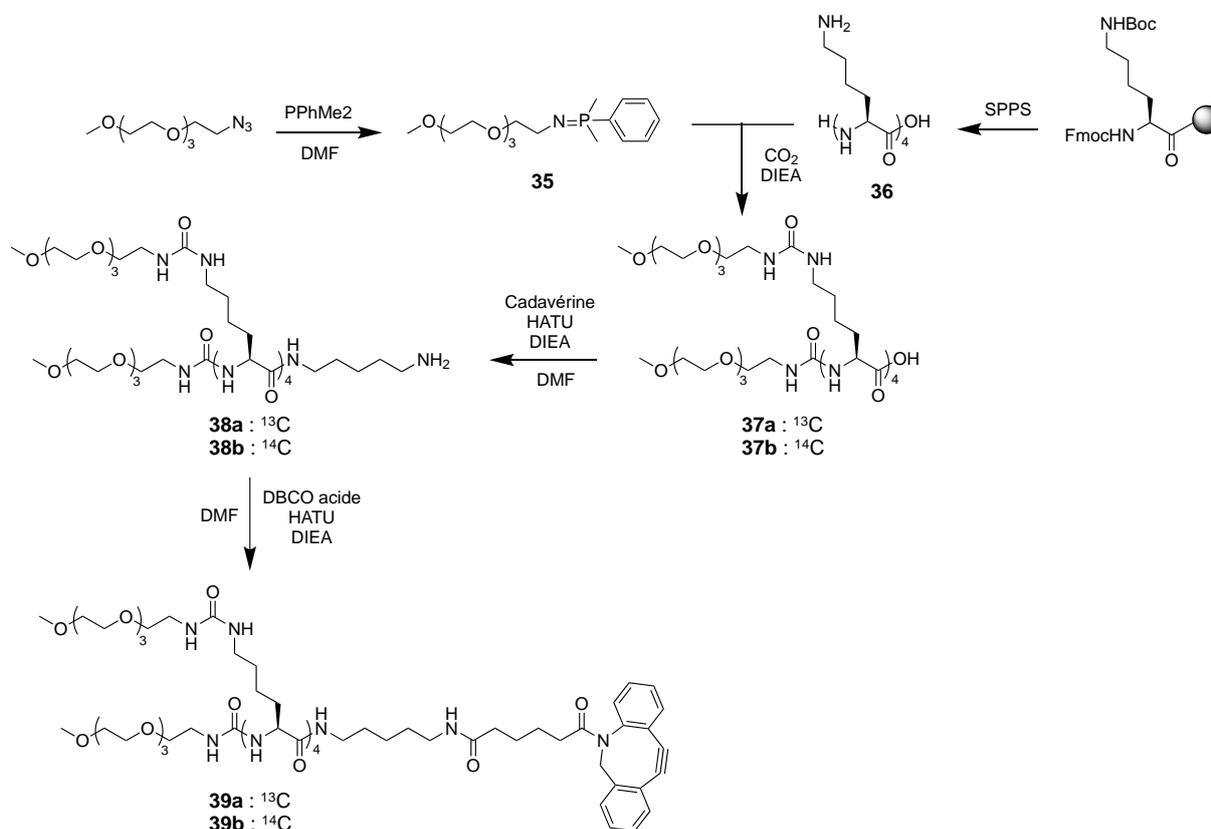
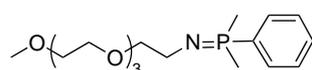


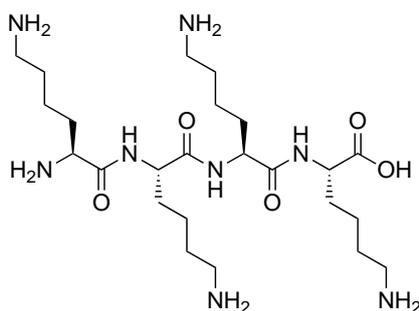
Figure 97 - Voie de synthèse de la molécule marquée **39a/39b**.

### Composé 35 – L'imino-phosphorane



En boîte à gants sous atmosphère inerte, l'azoture (35,5 mg ; 137  $\mu\text{mol}$  ; 1 éq.) a été solubilisé dans la DMF- $\text{D}_7$  (300  $\mu\text{L}$ ) avant d'ajouter la phosphine (19,7  $\mu\text{L}$  ; 137  $\mu\text{mol}$  ; 1 éq.). La réaction est laissée pendant 5 minutes à température ambiante, et un dégagement gazeux de  $\text{N}_2$  est observé. Le produit **35** a été engagé dans la suite de la synthèse sans être isolé.

### Composé 36 – H<sub>2</sub>N-K<sub>4</sub>-OH



Le tétrapeptide a été préparé par synthèse peptidique sur support solide en stratégie Fmoc à partir de la résine Fmoc-Lys(Boc)-Wang (100 mg ; 32  $\mu$ mol). Le groupement protecteur Fmoc a été déprotégé par trois traitements successifs de la résine par une solution de piperidine à 20% dans la DMF (2 mL) pendant 3 minutes au micro-onde (25 W ; 60°C). L'acide aminé protégé Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (42 mg ; 96  $\mu$ mol ; 3 éq.) a été introduit en double couplage en présence de HATU (23 mg ; 64  $\mu$ mol ; 2 éq.) et de DIEA (25  $\mu$ L ; 160  $\mu$ mol ; 5 éq.) dans la DMF (1 mL) pendant 20 minutes au micro-onde. Le peptide synthétisé a été déprotégé et clivé du support solide par un traitement avec une solution de TFA/H<sub>2</sub>O (95/5) (5 mL) pendant 2 heures à température ambiante et sous agitation. Le peptide a ensuite été précipité par dilution dans l'éther diéthylique (45 mL) à 0°C, puis récupéré par centrifugation avant d'être solubilisé dans une solution d'acide acétique à 10%. Après congélation et lyophilisation on obtient le produit **36** (14 mg ; 26  $\mu$ mol ; 81%).

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex® C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu$ m), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 3,9 minutes.

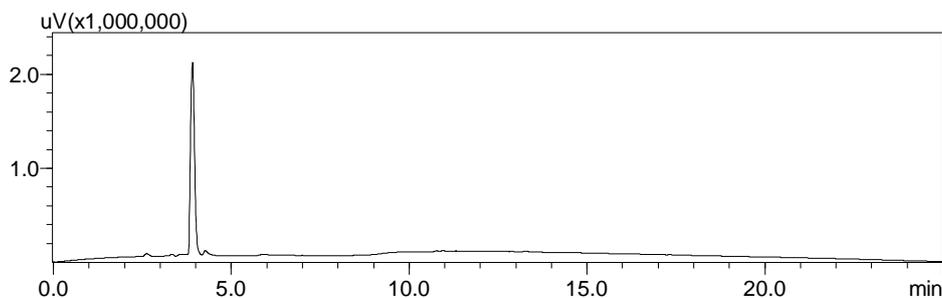
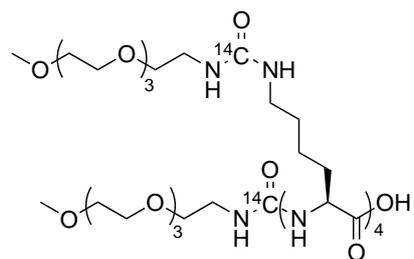


Figure 98 - Profil HPLC analytique du composé **36**.



réactionnel. Le milieu réactionnel a été décongelé puis incubé à température ambiante pendant 2 heures. La formation du produit d'intérêt est suivie par RMN  $^{13}\text{C}$ . Le produit **37a** a été engagé dans la suite de la synthèse sans être isolé.

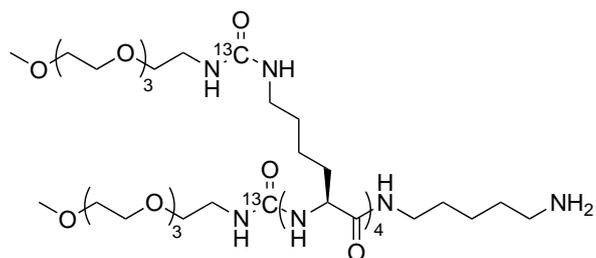
**Composé 37b** –  $[\text{}^{14}\text{C}]\text{MeO-PEG}_3\text{-NH-(K(PEG}_3\text{-OMe))}_4\text{-OH}$



À la solution du composé **35** (137  $\mu\text{mol}$  ; 10 éq.) dans la DMF (300  $\mu\text{L}$ ) a été ajoutée une solution du composé **36** (7,5 mg ; 13,7  $\mu\text{mol}$  ; 1 éq.) et de DIEA (29  $\mu\text{L}$  ; 206  $\mu\text{mol}$  ; 15 éq.) dans la DMF (500  $\mu\text{L}$ ). La solution obtenue a été transférée dans un tube RMN qui a ensuite été connecté au dispositif TRITEC. Le milieu réactionnel a été congelé dans l'azote liquide pendant 10 minutes puis le  $[\text{}^{14}\text{C}]\text{CO}_2$  (300 mbars ; 206  $\mu\text{mol}$  ; 15 éq.) a été absorbé par le milieu réactionnel. Le milieu réactionnel a été décongelé puis incubé à température ambiante pendant 2 heures. Le produit **37b** a été engagé dans la suite de la synthèse sans être isolé.

**Activité spécifique** : incorporation de 5 atomes de  $^{14}\text{C}$  par molécule sans dilution isotopique, soit une activité spécifique de 310 mCi/mmol.

**Composé 38a** –  $[\text{}^{13}\text{C}]\text{MeO-PEG}_3\text{-NH-(K(PEG}_3\text{-OMe))}_4\text{-CAD-NH}_2$



Au brut réactionnel du composé **37a** (13,7  $\mu\text{mol}$  ; 1  $\text{eq.}$ ) dans la DMF-D<sub>7</sub> (800  $\mu\text{L}$ ) à température ambiante a été ajouté le HATU (3,5 mg ; 13,7  $\mu\text{mol}$  ; 1  $\text{eq.}$ ). Le mélange a été agité à température ambiante quelques instants avant d'ajouter la cadavérine (19,7  $\mu\text{L}$  ; 137  $\mu\text{mol}$  ; 10  $\text{eq.}$ ) et de poursuivre l'agitation pendant deux heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **38a** (5,5 mg ; 3,1  $\mu\text{mol}$  ; 23%).

**Purification** : colonne AIT France Kromasil C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 30 minutes à 4 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA). Temps de rétention : 27,9 minutes.

**ESI-MS** (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>74</sub><sup>13</sup>C<sub>5</sub>H<sub>157</sub>N<sub>15</sub>O<sub>29</sub> : 1786,14 ; [M+2H]<sup>2+</sup> expérimental : 893,6 et [M+3H]<sup>3+</sup> expérimental : 596,3.

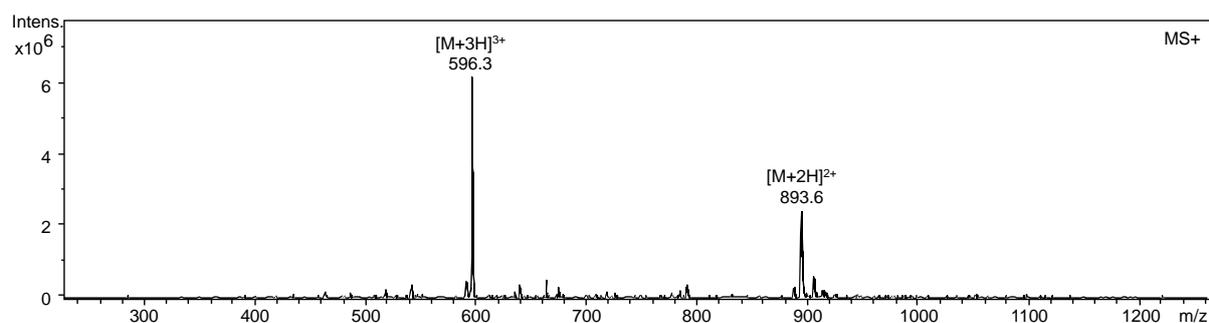
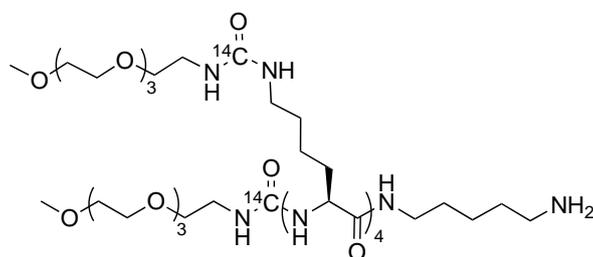


Figure 100 - Spectre de masse ESI-MS du composé **38a** en mode positif.

**Composé 38b** – [<sup>14</sup>C]MeO-PEG<sub>3</sub>-NH-(K(PEG<sub>3</sub>-OMe))<sub>4</sub>-CAD-NH<sub>2</sub>



Au brut réactionnel du composé **37b** (13,7  $\mu\text{mol}$  ; 1  $\text{eq.}$ ) dans la DMF-D<sub>7</sub> (800  $\mu\text{L}$ ) à température ambiante a été ajouté le HATU (3,5 mg ; 13,7  $\mu\text{mol}$  ; 1  $\text{eq.}$ ). Le mélange a été agité à température ambiante quelques instants avant d'ajouter la cadavérine (19,7  $\mu\text{L}$  ; 137  $\mu\text{mol}$  ; 10

éq.) et de poursuivre l'agitation pendant deux heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **38b** (750  $\mu$ Ci ; 2,5  $\mu$ mol ; 20%).

**Purification** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3  $\mu$ m), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF). Temps de rétention : 14,2 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3  $\mu$ m), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% AF et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,1% AF), détection radioactive par scintillation liquide. Temps de rétention : 14,2 minutes.

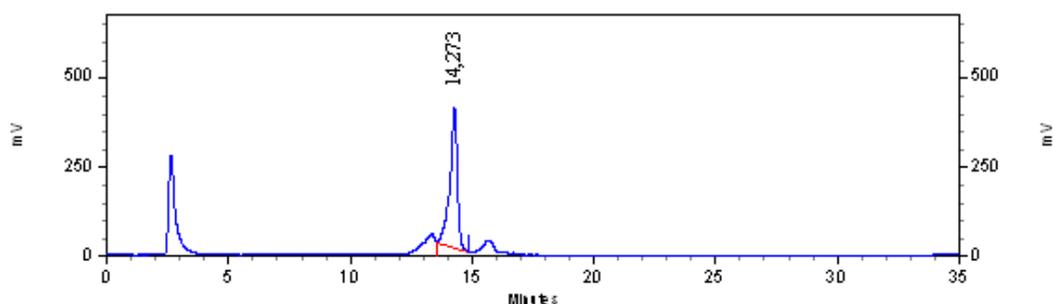


Figure 101 - Profil radio-HPLC analytique du composé **38b**.

**MALDI-MS** (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>74</sub><sup>14</sup>C<sub>5</sub>H<sub>157</sub>N<sub>15</sub>O<sub>29</sub> : 1791,3749 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 1791,3491. [M+Na]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>74</sub><sup>14</sup>C<sub>5</sub>H<sub>157</sub>N<sub>15</sub>O<sub>29</sub> : 1813,3169 ; [M+Na]<sup>+</sup> expérimental : 1813,3006.

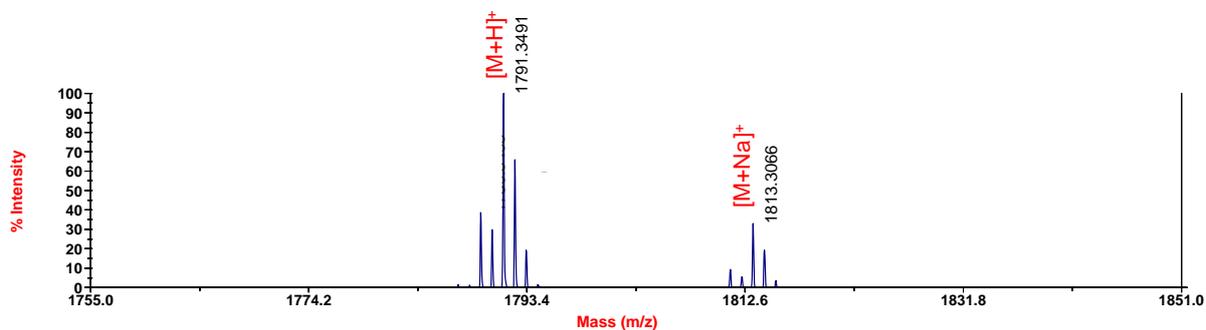
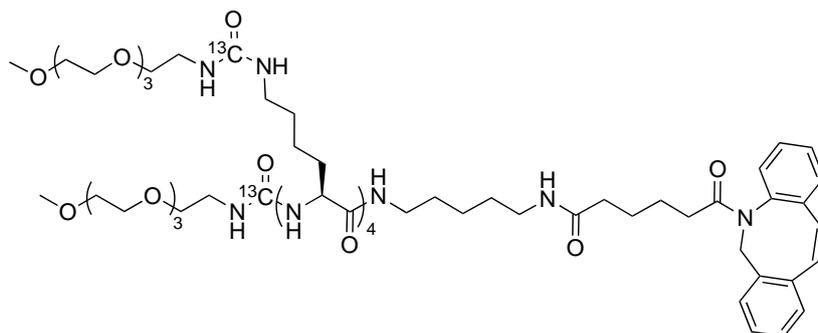


Figure 102 - Spectre de masse MALDI-TOF du composé **38b**.

**Activité spécifique** : incorporation de 5 atomes de  $^{14}\text{C}$  par molécule sans dilution isotopique, soit une activité spécifique de 310 mCi/mmol.

Composé **39a** –  $[\text{}^{13}\text{C}]$ MeO-PEG<sub>3</sub>-NH-K(PEG<sub>3</sub>-OMe)<sub>4</sub>-CAD-DBCO



À la solution de DBCO-acide (1,8 mg ; 5,6  $\mu\text{mol}$  ; 2 éq.) dans la DMF (100  $\mu\text{L}$ ) à température ambiante a été ajouté la DIEA (4,8  $\mu\text{L}$  ; 28  $\mu\text{mol}$  ; 10 éq.) et le HATU (1,4 mg ; 3,6  $\mu\text{mol}$  ; 1,5 éq.). Le mélange a été agité à température ambiante quelques instants avant d'ajouter le composé **38a** (5,5 mg ; 3,1  $\mu\text{mol}$  ; 1 éq.) et de poursuivre l'agitation pendant deux heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **39a** (3,3 mg ; 1,6  $\mu\text{mol}$  ; 52 %).

**Purification** : colonne AIT France Kromasil C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 30 minutes à 4 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA). Temps de rétention : 19,8 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% TFA et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 17,5 minutes.

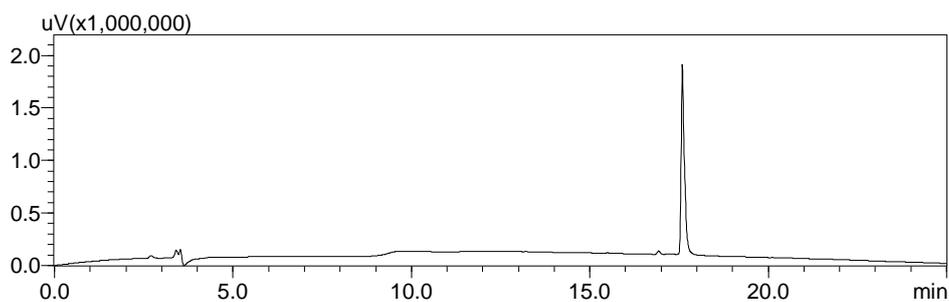


Figure 103 - Profil HPLC analytique du composé **39a**.

ESI-MS (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>95</sub><sup>13</sup>C<sub>5</sub>H<sub>174</sub>N<sub>16</sub>O<sub>31</sub> : 2101,27 ; [M+2H]<sup>2+</sup> expérimental : 1051,7 et [M+3H]<sup>3+</sup> expérimental : 701,5.

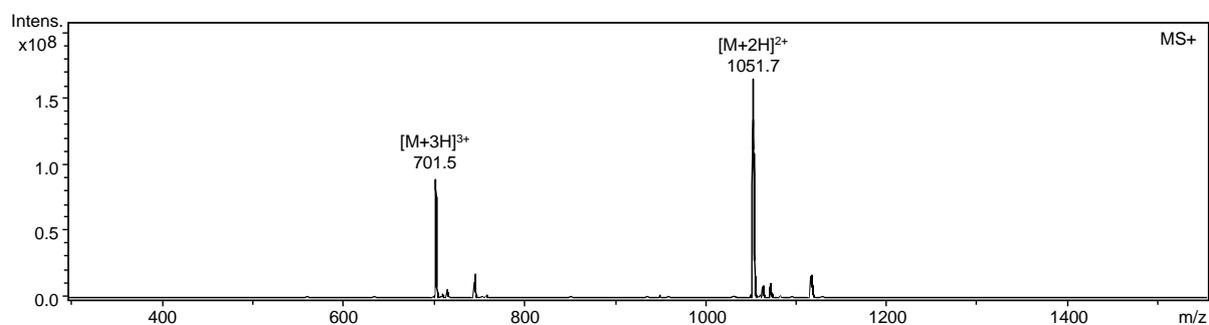
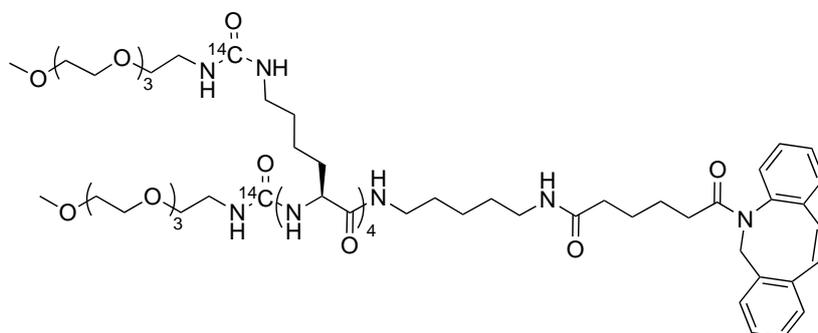


Figure 104 - Spectre de masse ESI-MS du composé **39a** en mode positif.

Composé **39b** – [<sup>14</sup>C]MeO-PEG<sub>3</sub>-NH-K(PEG<sub>3</sub>-OMe)<sub>4</sub>-CAD-DBCO



À la solution de DBCO-acide (71 µg ; 213 nmol ; 3 éq.) dans la DMF (40 µL) à température ambiante a été ajouté la DIEA (90 nL ; 710 nmol ; 10 éq.) et le HATU (67 µg ; 177 nmol ; 2,5 éq.). Le mélange a été agité à température ambiante quelques instants avant d'ajouter le composé

**38b** (22,2  $\mu\text{Ci}$  ; 71 nmol ; 1  $\text{eq.}$ ) et de poursuivre l'agitation pendant quatre heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC analytique. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **39b** (9,1  $\mu\text{Ci}$  ; 29 nmol ; 41%).

**Purification** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% AF et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,1% AF). Temps de rétention : 20,4 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Luna® Oméga C18 (150 x 4,6 mm ; 3  $\mu\text{m}$ ), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 1 mL/min (avec A :  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% AF et B :  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0,1% AF), détection radioactive par scintillation liquide. Temps de rétention : 20,4 minutes.

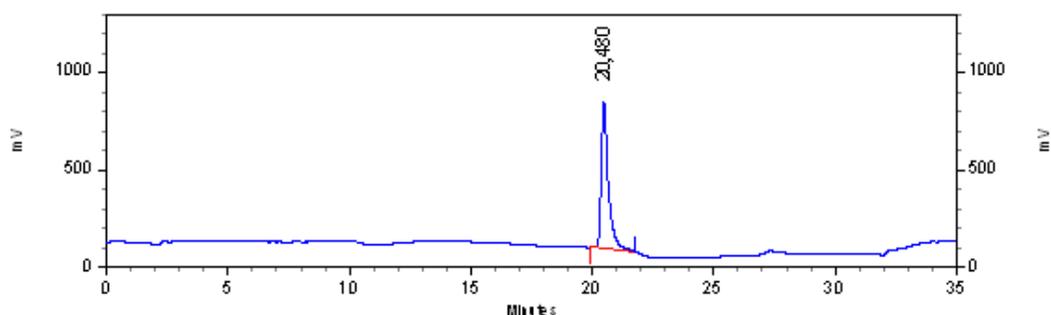


Figure 105 - Profil radio-HPLC analytique du composé **39b**.

**MALDI-MS** ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  théorique pour  $\text{C}_{95}^{14}\text{C}_5\text{H}_{174}\text{N}_{16}\text{O}_{31}$  : 2128,5609 ;  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  expérimental : 2128,5444.

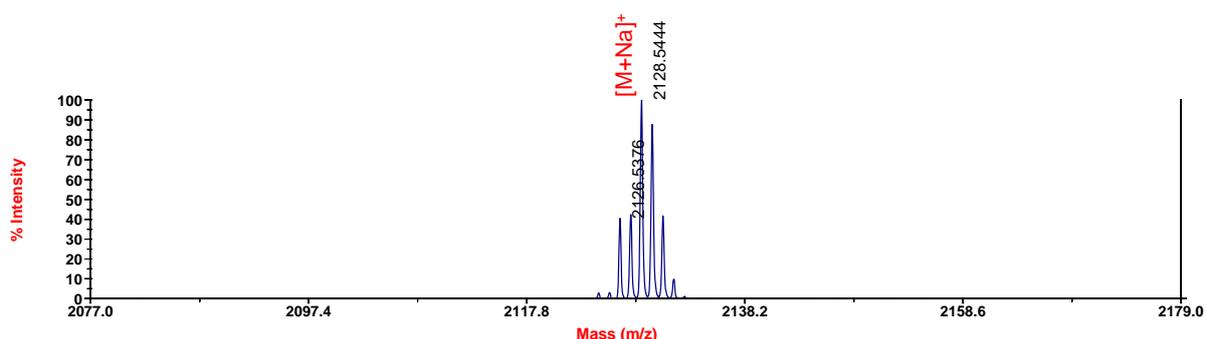
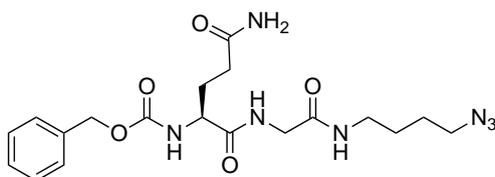


Figure 106 - Spectre de masse MALDI-TOF du composé **39b**.

**Activité spécifique** : incorporation de 5 atomes de  $^{14}\text{C}$  par molécule sans dilution isotopique, soit une activité spécifique de 310 mCi/mmol.

### Composé 40 – Cbz-Gln-Gly-N<sub>3</sub>



À une solution du composé **13** (3 mg ; 8,8  $\mu$ mol ; 1  $\text{eq.}$ ) dans la DMF (90  $\mu$ L) à température ambiante ont été ajoutés la DIEA (10 $\mu$ L ; 59  $\mu$ mol ; 7  $\text{eq.}$ ) et le HATU (5 mg ; 13  $\mu$ mol ; 1,5  $\text{eq.}$ ). Le mélange a été agité à température ambiante quelques instants avant d'ajouter le 4-azidobutan-1-amine (2 mg ; 17  $\mu$ mol ; 2  $\text{eq.}$ ) et de poursuivre l'agitation pendant deux heures. Le produit d'intérêt a été isolé par purification en HPLC semi-préparative. Après congélation et lyophilisation des fractions d'intérêts, on obtient le produit **40** (3,1 mg ; 7,1  $\mu$ mol ; 81%).

**Purification** : colonne Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 10 mm ; 5  $\mu$ m), gradient 0-60% de B en 20 minutes à 4 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA). Temps de rétention : 14,8 minutes.

**HPLC analytique** : colonne Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C8 (150 x 4,6 mm ; 2,6  $\mu$ m), gradient 0-100% de B en 20 minutes à 0,6 mL/min (avec A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA et B : CH<sub>3</sub>CN + 0,09% TFA), détection à 215 nm. Temps de rétention : 15,8 minutes.

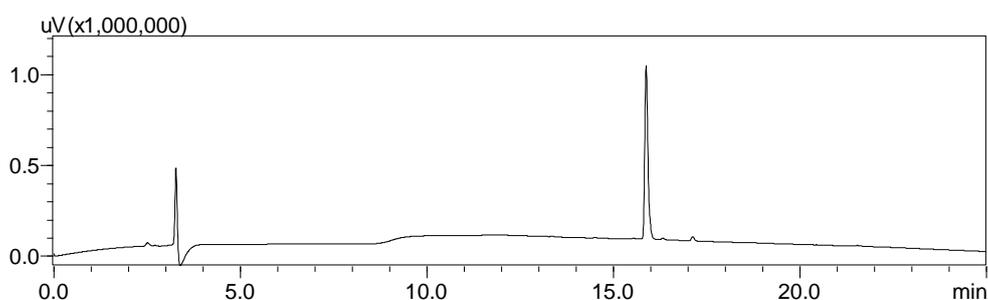


Figure 107 - Profil HPLC analytique du composé **40**.

**ESI-MS** (m/z) : [M+H]<sup>+</sup> théorique pour C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub> : 434,22 ; [M+H]<sup>+</sup> expérimental : 434,1.  
[M+TFA]<sup>-</sup> théorique pour C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub> : 546,12 ; [M+TFA]<sup>-</sup> expérimental : 546.1.

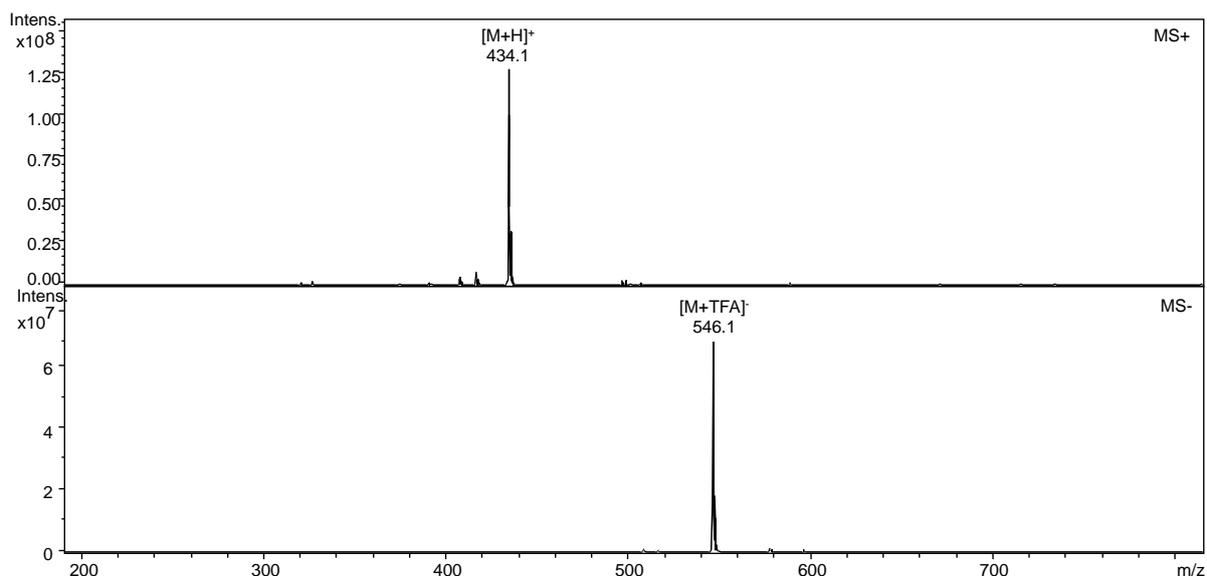


Figure 108 - Spectre de masse ESI-MS du composé **40** en mode positif et négatif.

## 5 PRODUCTION DES FRAGMENTS D'ANTICORPS

La production des fragments d'anticorps a été réalisée dans les cellules Freestyle HEK293 (Life technologies). Ces cellules eucaryotes cultivées en suspension permettent la sécrétion de la protéine exprimée dans le milieu de culture.

**Jour 0** : Le jour de la transfection, les cellules en culture ont été centrifugées pendant 5 min à 780 rpm avant d'être resuspendues dans le volume adéquat de milieu Freestyle pré-incubé à 37°C pour obtenir une concentration de  $2,5 \cdot 10^6$  cellules/mL. Pour 100 mL de culture, un mélange de 150 µg de chaque plasmide à une concentration de 0,5 µg d'ADN/µL dans du milieu Freestyle a été préparé (ratio chaîne lourde/chaîne légère : 1/1). La solution d'ADN a été ajoutée sur les cellules avant d'incuber le mélange pendant 5 min à 37°C, 180 rpm et 8% CO<sub>2</sub>. Goutte à goutte, 1,8 mL d'une solution de polyéthylèneimine (MW 25000) à 0,5 mg/mL (ratio PEI/ADN : 3/1) a été ajoutée au milieu de culture avant d'incuber le mélange à 37°C, 180 rpm et 8% CO<sub>2</sub> pendant 24 heures.

**Jour 1** : A l'issue des 24 heures d'incubation, le milieu de culture a été dilué par 2 avec du milieu Freestyle (100 mL) pré-incubé à 37°C. Les cellules ont été laissées en culture à 37°C, 180 rpm

et 8% CO<sub>2</sub> jusqu'à cinq jours post transfection sans qu'aucun renouvellement de milieu ni passage ne soit effectué.

**Jour 5** : A l'issue de la période d'incubation, la culture a été centrifugée à 3000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le surnageant qui contient la fraction soluble de la protéine d'intérêt a été récupéré et a été filtré sur 0,22 µm. Les fragments d'anticorps ont été purifiés par capture sur des billes de chélates métalliques Ni-NTA puis le tampon contenant une forte concentration en imidazole a été échangé par du PBS 1X pH=7.4 par chromatographie d'exclusion stérique.

**Mutant Fab3A2 LC-LLQGA** : Obtention de 18,9 mg de Fab à partir de 240 mL de culture, soit un rendement de production de 79 mg/L.

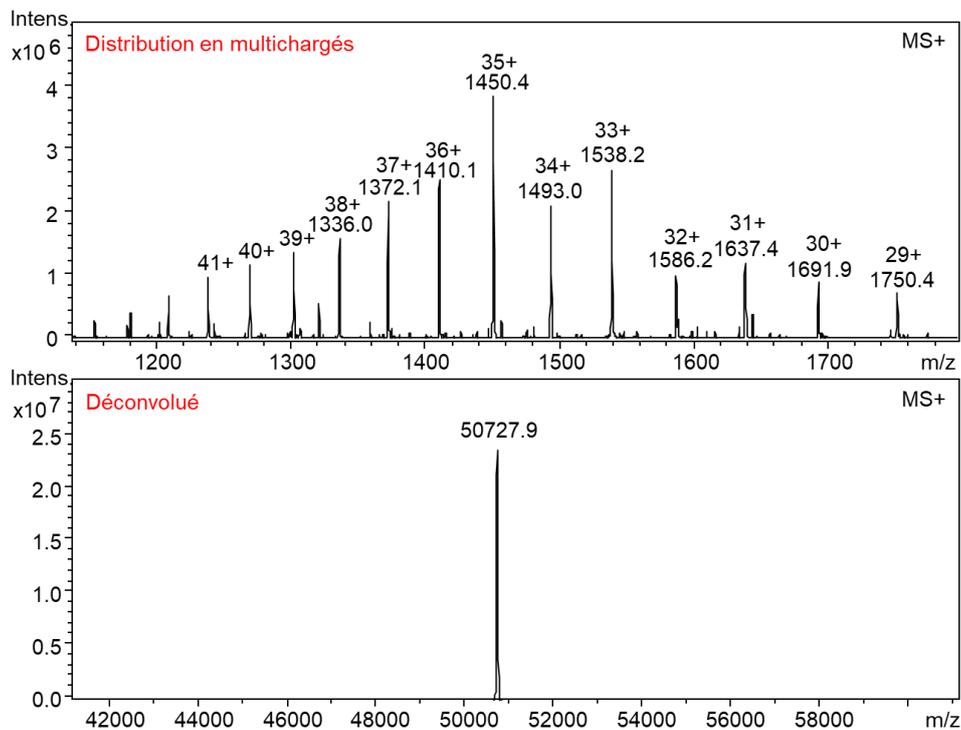


Figure 109 - Spectre de masse ESI-MS du Fab3A2 LC-LLQGA.

**Mutant Fab3A2 LC-V109C** : Obtention de 13,2 mg de Fab à partir de 240 mL de culture, soit un rendement de production de 55 mg/L.

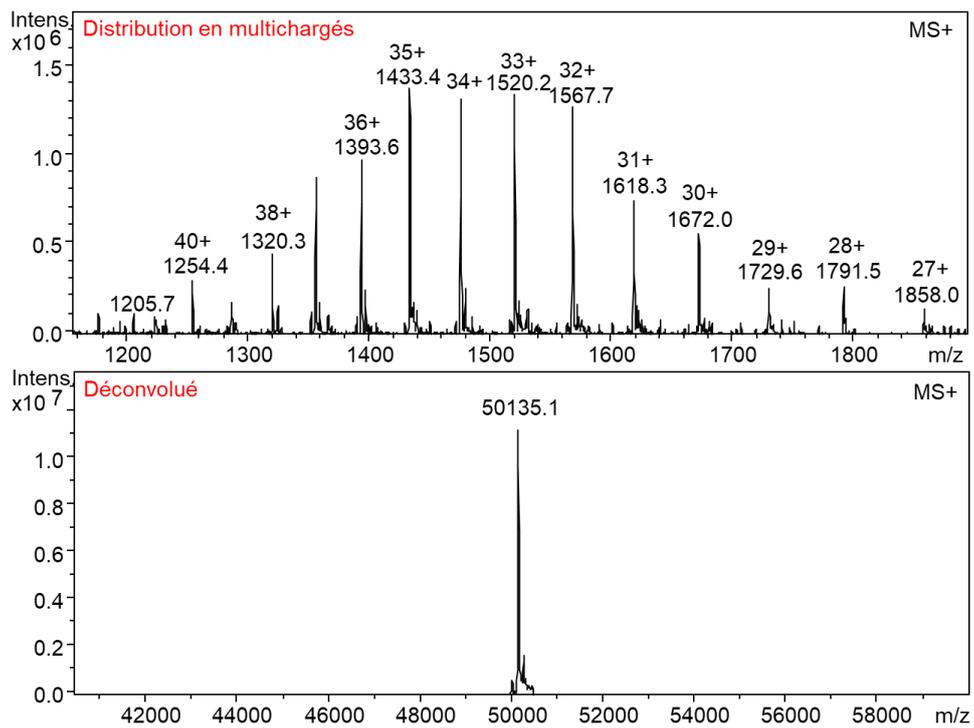


Figure 110 - Spectre de masse ESI-MS du Fab3A2 LC-V109C.

**Mutant Fab3A2 HC-Q108N** : Obtention de 8,5 mg de Fab à partir de 120 mL de culture, soit un rendement de production de 71 mg/L.

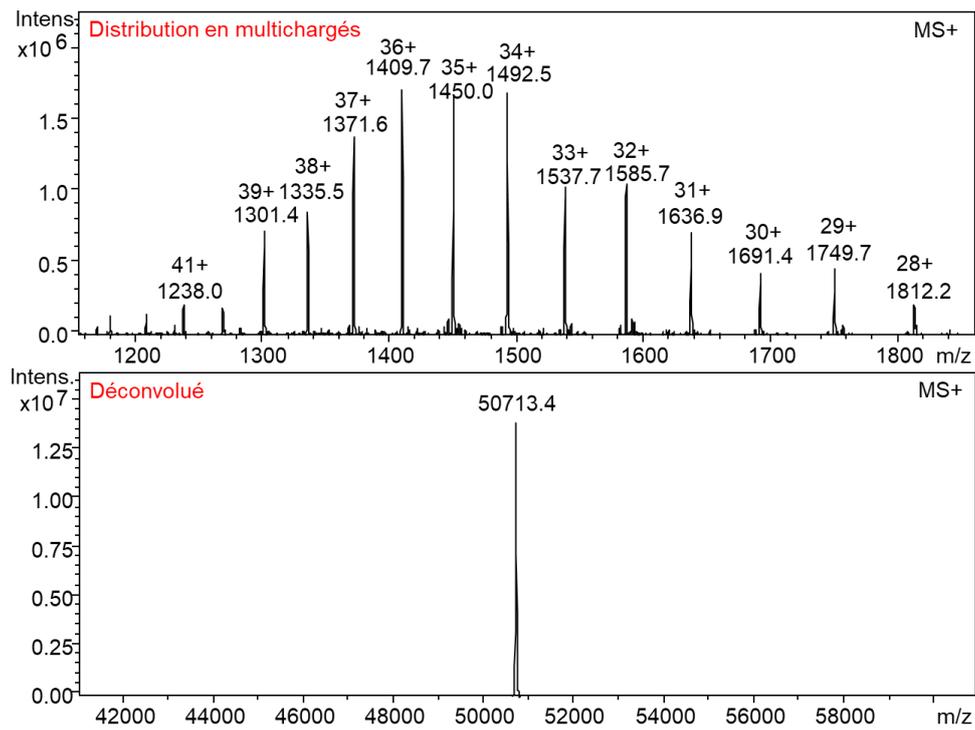


Figure 111 - Spectre de masse ESI-MS du Fab3A2 HC-Q108N.

## 6 CONJUGAISON ENZYMATIQUE ET CHIMIQUE

### 6.1 SYNTHÈSE DES MONOCONJUGUÉS

#### Conjugaison de HC-Gln108 et LC-LLQGA

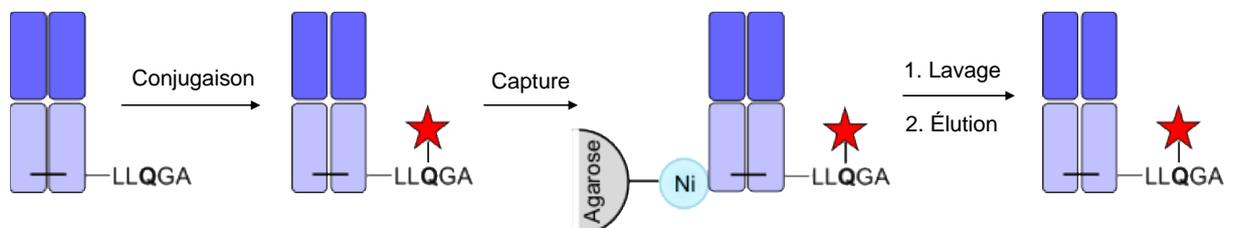


Figure 112 - Conjugaison enzymatique région-spécifique des résidus HC-Gln08 et LC-LLQGA en présence de BTG.

À une solution de la protéine d'intérêt contenant des résidus glutamine réactifs à une concentration supérieure à 10  $\mu\text{M}$  dans le PBS 1X à pH=7,4 ont été ajoutés l'amine primaire (10  $\mu\text{mol}$  / $\mu\text{mol}$  de glutamine réactive) et la BTG (10  $\mu\text{mol}$  / $\mu\text{mol}$  de protéine). Dans le cas de la conjugaison des linker-cytotoxique, jusqu'à 3% final de DMSO peut être ajouté au milieu réactionnel. Le mélange a été agité à température ambiante pendant 8 heures. La protéine d'intérêt conjuguée a été purifiée par chromatographie d'affinité sur une résine Protino<sup>®</sup> Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel).

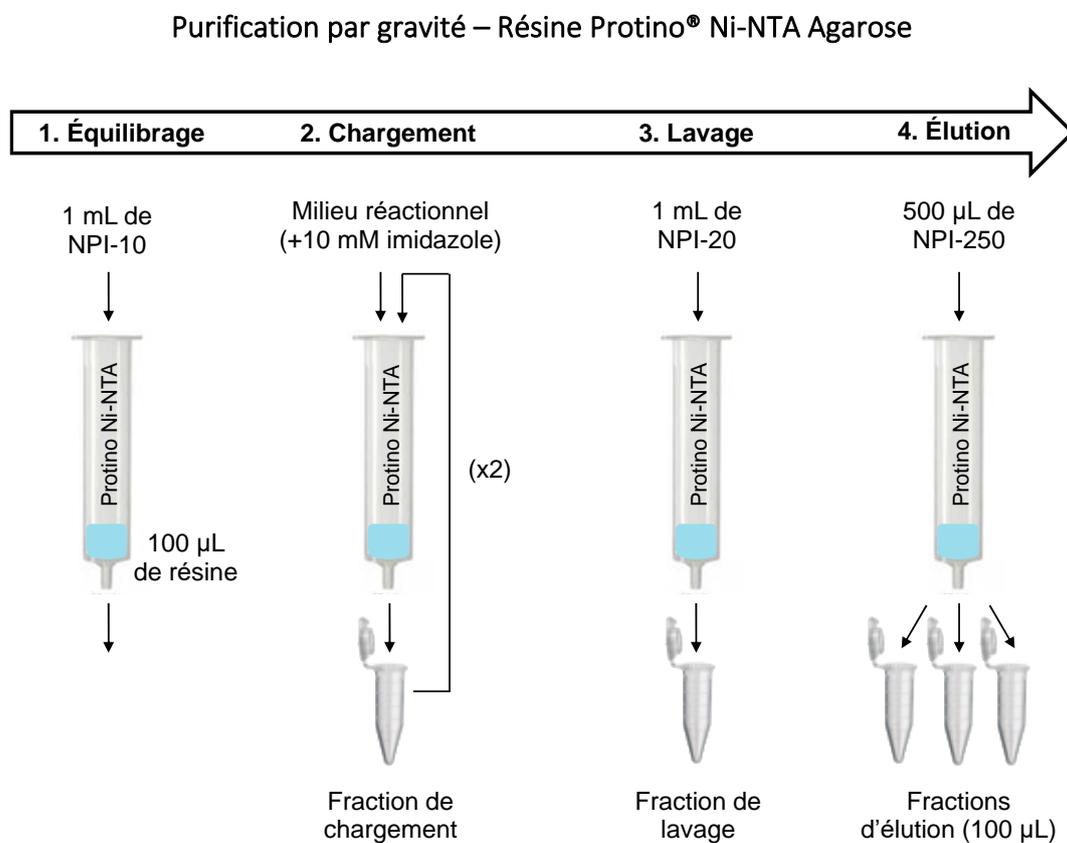


Figure 113 – Protocole de purification par gravité sur résine Ni-NTA.

Le protocole de purification par gravité est utilisé pour une quantité de protéine inférieure à 4 nmol. Dans une colonne de 1 mL munie d'un filtre, 100  $\mu\text{L}$  de suspension de résine Protino<sup>®</sup> Ni-NTA Agarose ont été déposés avant de placer un second filtre au-dessus pour maintenir le lit de résine. La colonne a été équilibrée avec 1 mL de tampon NPI-10 (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ; 300 mM

NaCl ; 10 mM imidazole à pH=8) en laissant la solution couler par gravité. À partir d'une solution concentrée (1 M), une concentration finale de 10 mM d'imidazole a été ajoutée au milieu réactionnel avant de le déposer sur la colonne. La fraction de chargement qui s'est écoulée par gravité a été récupérée et redéposée deux fois sur la colonne. La résine a été lavée de toutes les molécules liées de manière non spécifique avec 1 mL de tampon NPI-20 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 300 mM NaCl ; 20 mM imidazole à pH=8) avant d'éluer la protéine poly-His d'intérêt avec environ 500 µL de tampon NPI-250 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 300 mM NaCl ; 250 mM imidazole à pH=8) en collectant par fractions de 100 µL.

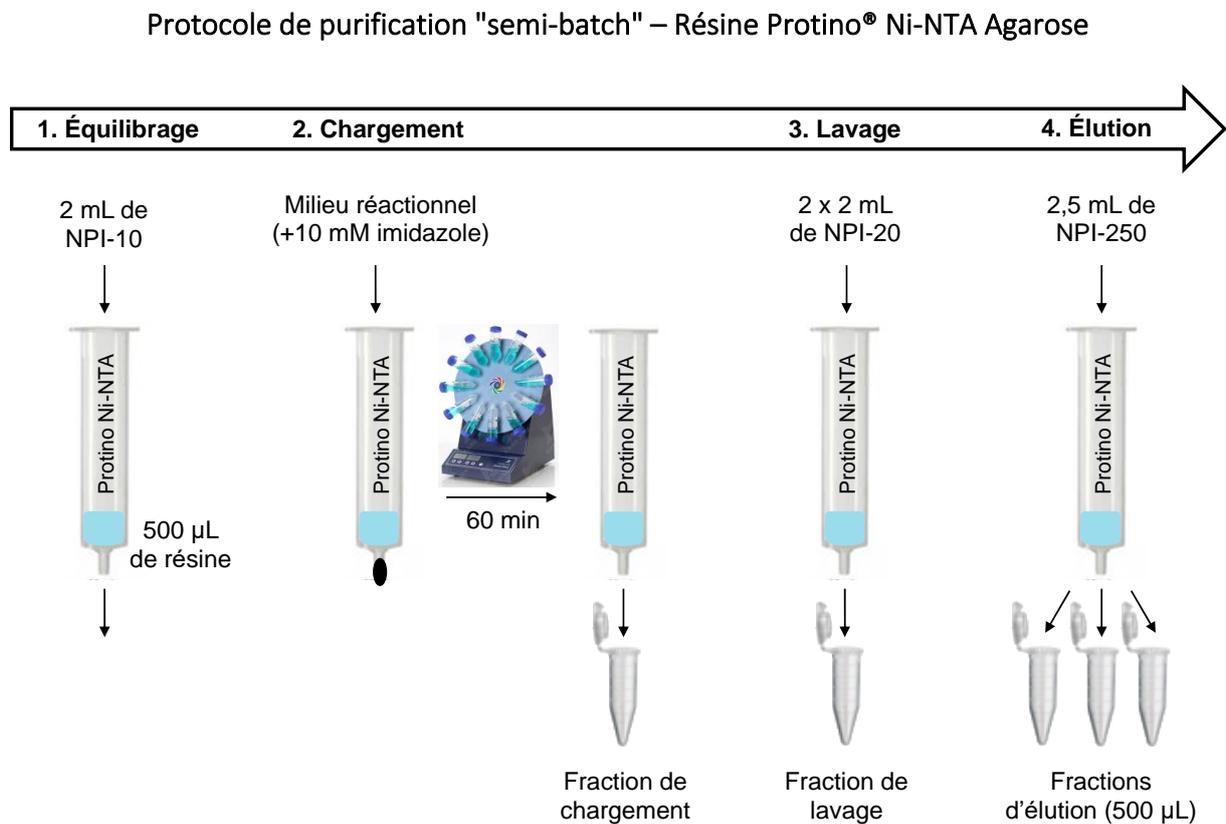


Figure 114 - Protocole de purification "semi-batch" sur résine Ni-NTA.

Le protocole de purification "semi-batch" est utilisé pour une quantité de protéine supérieure à 40 nmol. Dans une colonne de 2 mL munie d'un filtre, 500 µL de suspension de résine Protino® Ni-NTA Agarose ont été déposés. La colonne a été équilibrée avec 2 mL de tampon NPI-10 (50

mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 300 mM NaCl ; 10 mM imidazole à pH=8) en laissant la solution couler par gravité. La colonne a été bouchée par le bas avant d'y déposer l'échantillon protéique contenant une concentration de 10 mM en imidazole. La colonne a été bouchée puis gentiment agitée durant 60 minutes sur une roue de manière à l'inverser. La colonne a été replacée en position verticale et la fraction de chargement qui est récupérée par gravité. Les molécules liées de manière non spécifique sont éluées de la colonne par deux étapes de lavages successifs avec 2 mL de tampon NPI-20 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 300 mM NaCl ; 20 mM imidazole à pH=8). La protéine poly-His d'intérêt est ensuite éluée avec environ 2,5 mL de tampon NPI-250 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 300 mM NaCl ; 250 mM imidazole à pH=8) en collectant par fractions de 500 µL.

### Conjugaison sur support de HC-Lys105

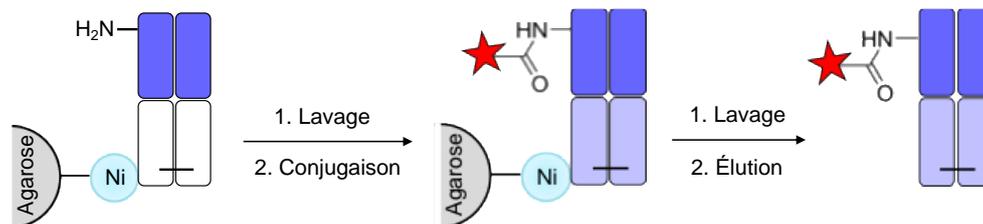


Figure 115 - Conjugaison enzymatique régio-spécifique du résidu HC-Lys105 en présence de BTG.

La protéine d'intérêt contenant des résidus lysine réactifs a été immobilisée sur une résine Protino® Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel) préalablement équilibrée dans le tampon NPI-10 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 300 mM NaCl ; 10 mM imidazole à pH=8) en suivant le protocole de purification par gravité ou "semi batch". La résine a été équilibrée dans le tampon PBS 1X à pH = 7,4, puis le substrat glutamine (10 éq./lysine réactive) et la BTG (1U/20 nmol de protéine) en solution dans le PBS 1X à pH=7,4 ont été déposés sur la résine, et le mélange a été incubé à température ambiante pendant 8 heures. Dans le cas de la conjugaison des linker-cytotoxique, jusqu'à 3% final de DMSO peut être ajouté au milieu. La protéine d'intérêt conjuguée a ensuite été éluée de la résine en suivant le protocole de purification par gravité ou "semi batch".

## Conjugaison sur support de LC-Cys109

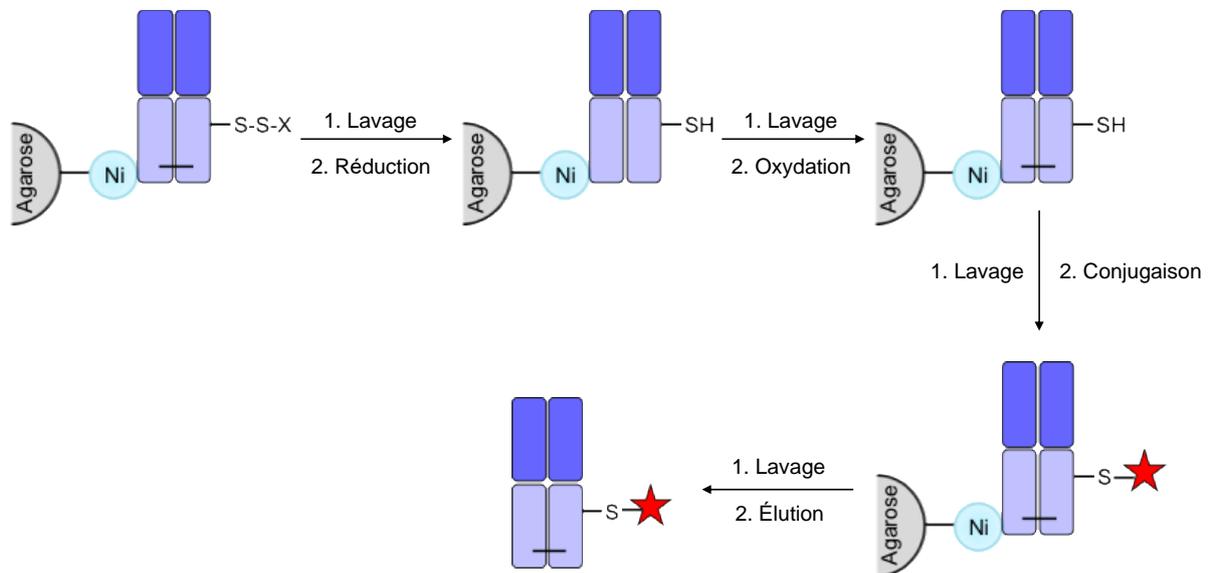


Figure 116 - Conjugaison chimique régio-spécifique du résidu LC-Cys109.

La protéine d'intérêt contenant un résidu cystéine a été immobilisée sur une résine Protino® Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel) préalablement équilibrée dans le tampon NPI-10 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 300 mM NaCl ; 10 mM imidazole pH=8) en suivant le protocole de purification par gravité ou "semi batch". La résine a été équilibrée dans le PBS 1X pH = 6,5 puis une solution de TCEP (100 éq./cystéine) dans le PBS 1X à pH=6,5 a été ajoutée sur la résine avant d'être incubée pendant une heure à température ambiante pour réduire les ponts disulfures. La solution de TCEP est filtrée et la résine est lavée avec 10 volumes de PBS 1X à pH=6,5 avant d'ajouter une solution de DHA (40 éq./cystéine) dans le PBS 1X à pH=6,5 et d'incuber une heure supplémentaire à température ambiante pour reformer les ponts disulfures structuraux de la protéine. La solution de DHA est filtrée et la résine est lavée avec 10 volumes de PBS 1X à pH=6,5 avant d'ajouter une solution du réactif maléimide (10 éq./cystéine) dans le PBS 1X à pH=6,5 + 3% de DMSO et d'incuber pendant 8 heures à température ambiante. La protéine d'intérêt conjuguée a ensuite été éluée de la résine en suivant le protocole de purification par gravité ou "semi batch".

## Conjugaison chémo-enzymatique de HC-Lys105

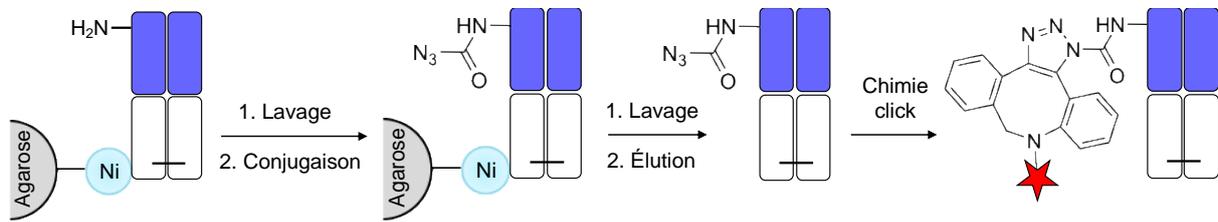


Figure 117 - Conjugaison chémo-enzymatique régio-spécifique du résidu LC-Lys105.

La protéine d'intérêt contenant des résidus lysine réactifs a été immobilisée sur une résine Protino® Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel) préalablement équilibrée dans le tampon NPI-10 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 300 mM NaCl ; 10 mM imidazole à pH=8) en suivant le protocole de purification par gravité ou "semi batch". La résine a été équilibrée dans le tampon PBS 1X à pH = 7,4, puis le composé **40** (10 éq./lysine réactive) et la BTG (1U/20 nmol de protéine) en solution dans le PBS 1X à pH=7,4 ont été déposés sur la résine, et le mélange a été incubé à température ambiante pendant 8 heures. La protéine d'intérêt conjuguée a ensuite été éluée de la résine en suivant le protocole de purification par gravité ou "semi batch". En solution dans un tube Eppendorf Protein Lobind, le réactif DBCO **39** (1,5 éq./fonction azido) a été ajouté en présence de 3% de DMSO et le mélange a été incubé à température ambiante pendant 2 heures.

## 6.2 SYNTHÈSE DES CONJUGUÉS DOUBLEMENT MARQUÉS

### Double conjugaison de LC-LLQGA et HC-Lys105

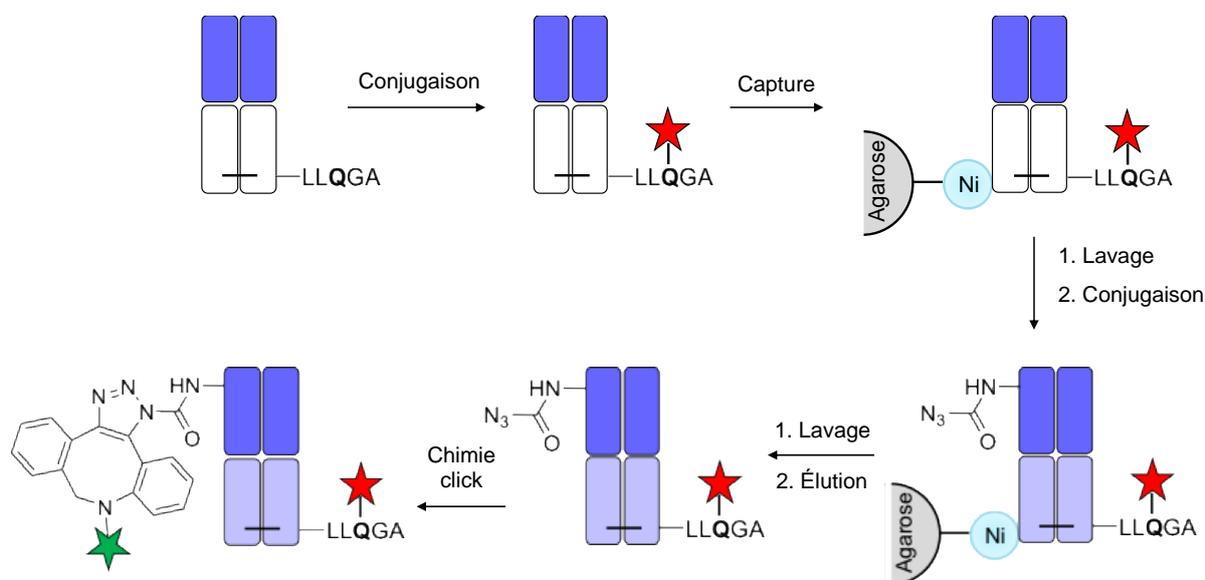


Figure 118 - Double conjugaison enzymatique régio-spécifique des résidus HC-Lys105 et LC-LLQGA.

À une solution de la protéine d'intérêt contenant des résidus glutamine réactifs à une concentration supérieure à 10  $\mu\text{M}$  dans le PBS 1X à pH=7,4 ont été ajoutés l'amine primaire (10  $\text{eq.}/\text{glutamine}$  réactive) et la BTG (1U/10 nmol de protéine). Dans le cas de la conjugaison des linker-cytotoxique, jusqu'à 3% final de DMSO peut être ajouté au milieu réactionnel. Le mélange a été agité à température ambiante pendant 8 heures. Le conjugué a ensuite été immobilisée sur une résine Protino<sup>®</sup> Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel) préalablement équilibrée dans le tampon NPI-10 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 300 mM NaCl ; 10 mM imidazole à pH=8) en suivant le protocole de purification par gravité ou "semi batch". La résine a été équilibrée dans le tampon PBS 1X à pH = 7,4, puis le composé **40** (10  $\text{eq.}/\text{lysine}$  réactive) et la BTG (1U/20 nmol de protéine) en solution dans le PBS 1X à pH=7,4 ont été déposés sur la résine, et le mélange a été incubé à température ambiante pendant 8 heures. La protéine d'intérêt conjuguée a ensuite été éluée de la résine en suivant le protocole de purification par gravité ou "semi batch". En solution dans un tube Eppendorf Protein Lobind, le réactif DBCO **39** (1,5

éq./fonction azido) a été ajouté en présence de 3% de DMSO et le mélange a été incubé à température ambiante pendant 2 heures.

### Double conjugaison LC-Cys109 et HC-Lys105

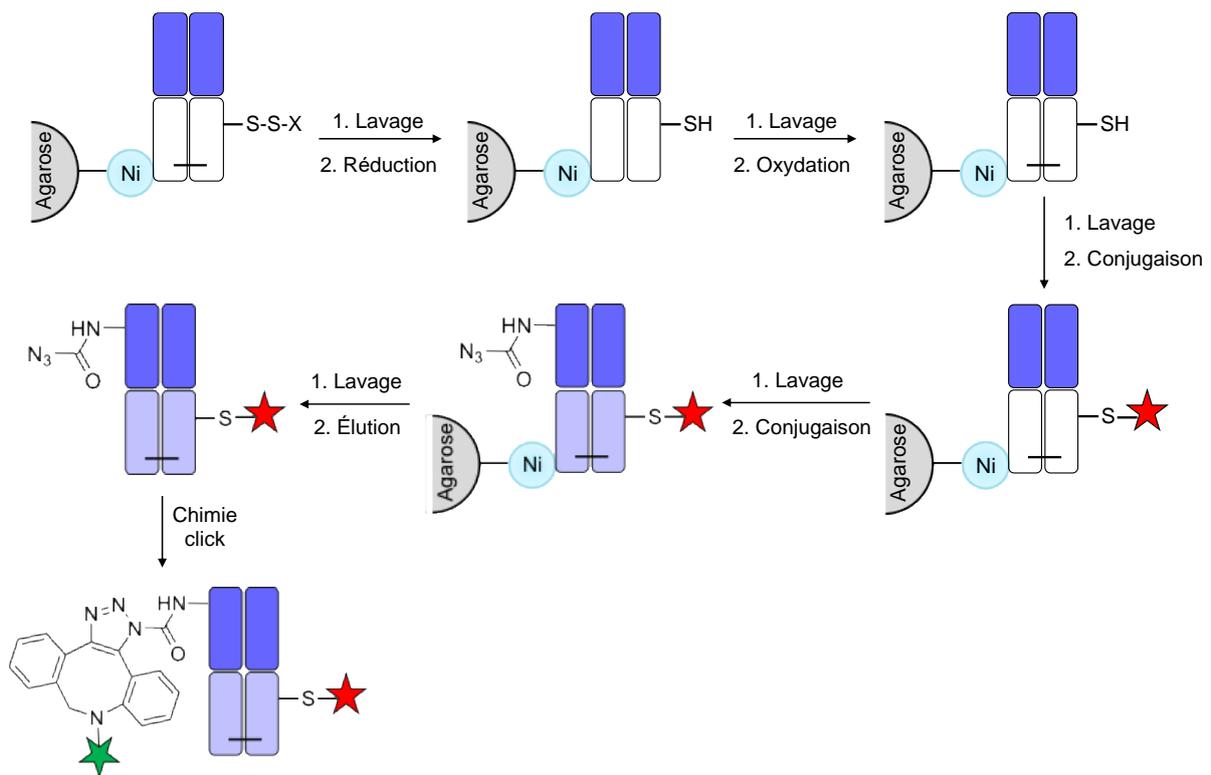


Figure 119 - Double conjugaison enzymatique et chimique régio-spécifique des résidus HC-Lys105 et LC-Cys109.

La protéine d'intérêt contenant un résidu cystéine a été immobilisée sur une résine Protino® Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel) préalablement équilibrée dans le tampon NPI-10 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 300 mM NaCl ; 10 mM imidazole pH=8) en suivant le protocole de purification par gravité ou "semi batch". La résine a été équilibrée dans le PBS 1X pH = 6,5 puis une solution de TCEP (100 éq./cystéine) dans le PBS 1X à pH=6,5 a été ajoutée sur la résine avant d'être incubée pendant une heure à température ambiante pour réduire les ponts disulfures. La solution de TCEP est filtrée et la résine est lavée avec 10 volumes de PBS 1X à pH=6,5 avant d'ajouter une

solution de DHA (40 éq./cystéine) dans le PBS 1X à pH=6,5 et d'incuber une heure supplémentaire à température ambiante pour reformer les ponts disulfures structurels de la protéine. La solution de DHA est filtrée et la résine est lavée avec 10 volumes de PBS 1X à pH=6,5 avant d'ajouter une solution du réactif maléimide (10 éq./cystéine) dans le PBS 1X à pH=6,5 + 3% de DMSO et d'incuber pendant 8 heures à température ambiante. La résine est ensuite lavée avec 10 volumes de PBS 1X à pH=7,4 avant d'ajouter le composé **40** (10 éq./lysine réactive) et la BTG (1U/20 nmol de protéine) en solution dans le PBS 1X à pH=7,4 ont été déposés sur la résine, et le mélange a été incubé à température ambiante pendant 8 heures. La protéine d'intérêt conjuguée a ensuite été éluée de la résine en suivant le protocole de purification par gravité ou "semi batch". En solution dans un tube Eppendorf Protein Lobind, le réactif DBCO **39** (1,5 éq./fonction azido) a été ajouté en présence de 3% de DMSO et le mélange a été incubé à température ambiante pendant 2 heures.

## 7 TESTS D'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

---

Les tests d'activité enzymatique qui ont été utilisés sont des tests d'inhibition compétitive en présence d'un substrat peptidique fonctionnalisé par un groupement émetteur de fluorescence (MCA) et un quencheur (DNP). Sous excitation à une longueur d'onde donnée, le groupement fluorescent émet de la lumière à une autre longueur d'onde. Le quencheur est quant à lui capable de réabsorber cette lumière d'émission avec une efficacité inversement proportionnelle à la distance entre les deux groupements.

Le principe de fonctionnement du test est le suivant. En l'absence d'enzyme, la proximité du quencheur au sein de la structure du peptide masque le signal émis par la molécule fluorescente. En présence d'enzyme, cette dernière catalyse la protéolyse du substrat peptidique entre le quencheur et le fluorophore, ce qui entraîne une dissociation des deux molécules. Cette dissociation se caractérise par un éloignement du fluorophore et de son quencheur, ce qui s'accompagne d'une augmentation de la fluorescence émise. En choisissant attentivement les concentrations d'enzyme et de substrat, on observe une dégradation linéaire sur une période donnée, et la pente de la courbe reflète l'activité de l'enzyme.

Trois substrats ont été utilisés pour l'étude de l'ensemble du panel de MMP : le MCA-MAT (MCA-Pro-Leu-Gly-Leu-DNP-Ala-Arg-NH<sub>2</sub>), le MCA-Lys-MAT (MCA-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-DNP-Ala-Arg-NH<sub>2</sub>) et le MCA-MMP-3 (MCA-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Lys(DNP) -NH<sub>2</sub>).

## 7.1 INHIBITION DE LA MMP-14

### Détermination de la constante de Michaelis (Km)

Dans une plaque 96 puits noire (NBS 3650, Corning Costar), un volume de 200 µL de tampon d'activité (50 mM Tris ; 150 mM NaCl ; 5 mM CaCl<sub>2</sub> ; 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> à pH=7,5) a été placé par puit. Le substrat MCA-Lys-MAT (MCA-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-DNP-Ala-Arg-NH<sub>2</sub>) a été introduit dans un volume de 2 µL à partir de solutions concentrées dans le DMSO, pour obtenir des concentrations finales de 25 µM ; 10 µM ; 5 µM ; 2 µM ; 1 µM et 0,5 µM dans le tampon d'activité + 1% DMSO. Chaque concentration a été préparée en triplicat. La plaque a été couverte d'un film autocollant avant d'être incubée pendant 10 minutes à 37°C. La MMP-14 a ensuite été ajoutée sous agitation dans un volume de 0,5 µL pour atteindre une concentration finale de 0,2 nM d'enzyme par puit. La plaque a ensuite été immédiatement analysée dans un fluorimètre préalablement équilibré à 37°C : 1 mesure toutes les 30 secondes pendant 30 minutes avec les longueurs d'onde d'excitation et d'émission à 340 nm et à 405 nm respectivement.

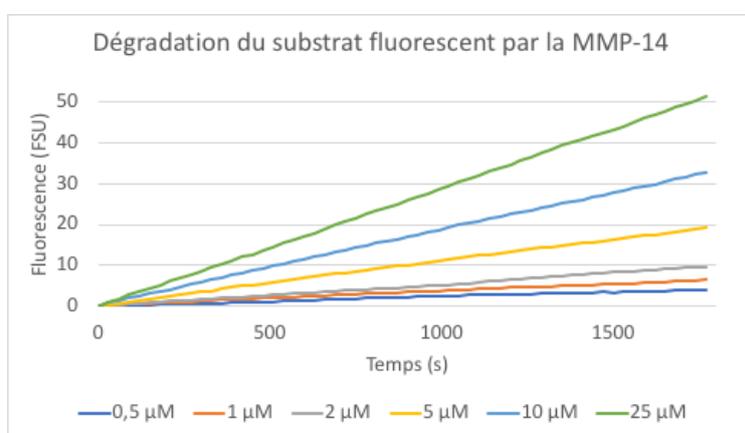


Figure 120 - Dégradation du substrat fluorescent MC-Lys-MAT par la MMP-14.

Pour chaque concentration en substrat la vitesse initiale moyenne de la réaction (en FSU/s) a été calculée sur les trois puits. La constante de Michaelis  $K_m$  a été déterminée mathématiquement par les méthodes de Lineweaver et Burk (14,6  $\mu\text{M}$ ) et de Eadie-Hofstee (16,1  $\mu\text{M}$ ), soit une valeur moyenne de 15,4  $\mu\text{M}$ .

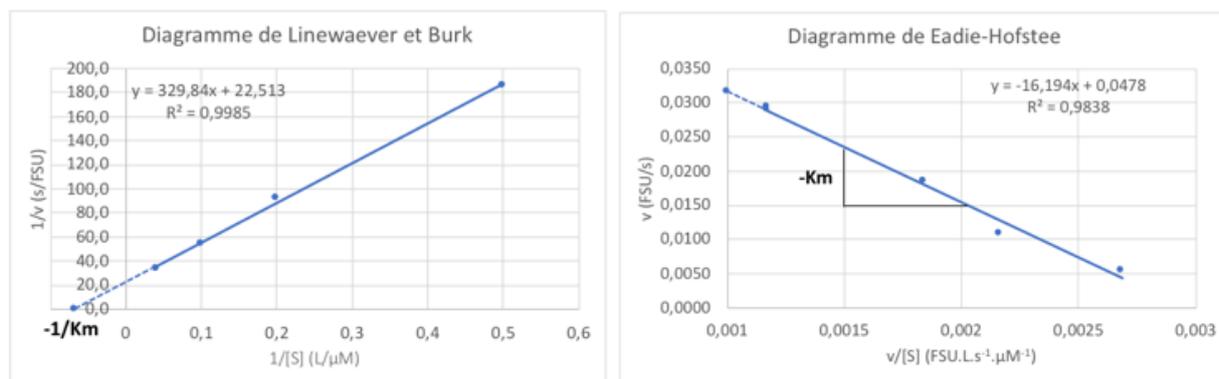


Figure 121 - Détermination de la constante d'affinité ( $K_m$ ) du substrat MCA-Lys-MAT pour la MMP-14 par la méthode de Lineweaver et Burk et de Eadie-Hofstee.

### Détermination de la constante d'inhibition des inhibiteurs ( $K_i$ )

Dans une plaque 96 puits noire (NBS 3650, Corning Costar), un volume de 200  $\mu\text{L}$  de tampon d'activité (50 mM Tris ; 150 mM NaCl ; 5 mM  $\text{CaCl}_2$  ; 0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$  à pH=7,5) a été placé par puit. Le Fab3A2 a été introduit dans un volume de 2  $\mu\text{L}$  à partir de solutions concentrées pour obtenir des concentrations finales de 1 nM ; 10 nM et 100 nM par puit. Chaque concentration a été préparée en duplicat. La MMP-14 a ensuite été ajoutée dans un volume de 0,5  $\mu\text{L}$  pour atteindre une concentration finale de 0,2 nM d'enzyme par puit. La plaque a été couverte d'un film autocollant avant d'être incubée pendant 30 minutes à 37°C. Le substrat MCA-Lys-MAT ( $\text{MCA-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-DNP-Ala-Arg-NH}_2$ ) a été introduit sous agitation dans un volume de 0,5  $\mu\text{L}$  à partir d'une solution à 1,8 mM dans le DMSO, pour obtenir une concentration finale de 4,5  $\mu\text{M}$  par puit. La plaque a ensuite été immédiatement analysée dans un fluorimètre préalablement équilibré à 37°C : 1 mesure toutes les 30 secondes pendant 30 minutes avec les longueurs d'onde d'excitation et d'émission à 340 nm et à 405 nm respectivement. Pour chaque concentration en inhibiteur, la vitesse initiale de la réaction (en FSU/s) a été calculée. Le pourcentage d'inhibition a été calculé pour chaque concentration par rapport à la vitesse

initiale de la réaction en l'absence d'inhibiteur. Le tracé du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en échelle logarithmique sur l'axe des abscisses donne une courbe sigmoïde. L'utilisation d'une régression non-linéaire basée sur l'équation de Horovitz et Levitzki<sup>358</sup> qui tient compte de la concentration d'enzyme, d'inhibiteur, de substrat et de l'affinité de celui-ci pour l'enzyme ( $K_m$ ) permet de déterminer la constante d'inhibition ( $K_i$ ).

## 7.2 INHIBITION DES AUTRES MMP

Le profil de sélectivité du fragment d'anticorps inhibiteur de la MMP-14 a été évalué sur les autres protéases de la famille des MMP en utilisant le même protocole expérimental. La nature du substrat ainsi que les concentrations à utiliser pour chaque enzyme sont données dans le tableau suivant.

Enzyme		Substrat	
Nom	Concentration (nM)	Nom	Concentration ( $\mu$ M)
MMP-1	0,38	MCA-MAT	4,5
MMP-2	0,01	MCA-MAT	4,5
MMP-3	0,73	MCA-MMP-3	4,5
MMP-7	0,63	MCA-MAT	4,5
MMP-8	0,18	MCA-MAT	9
MMP-9	0,05	MCA-MAT	4,5
MMP-10	2,43	MCA-MAT	4,5
MMP-12	0,52	MCA-MAT	4,5
MMP-13	0,12	MCA-MAT	4,5

Tableau 12 - Conditions expérimentales des tests d'inhibitions des MMP.

<sup>358</sup> Horovitz, A., Levitzki, A. & Kh, H. I. An accurate method for determination of receptor-ligand and enzyme-inhibitor dissociation constants from displacement curves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 6654–6658 (1987).

## 8 EXPÉRIMENTATION ANIMALE

---

### 8.1 LE MODÈLE DE CARCINOME MAMMAIRE 4T1

Sous anesthésie gazeuse contenant 1 à 2% d'isoflurane (Iso-Vet), 300 000 cellules 4T1 en suspension dans 100 µL d'une solution de NaCl à 0,9% ont été injectées en sous cutanée dans la quatrième glande mammaire au niveau de la région pelvienne. Une période de 15 jours a été laissée aux tumeurs pour se développer avant que les animaux soient injectés ou que la tumeur soit prélevée.

### 8.2 INJECTION DES CONJUGUÉS ET SUIVI PHARMACOCINÉTIQUE

Les conjugués en solution dans le tampon NaCl 0,9% dans un volume de 100 µL ont été injectés à une dose de 10 mg/kg en intraveineuse par la veine de la queue. A chaque temps de pharmacocinétique, un prélèvement sanguin d'environ 10 µL a été fait et a été mélangé à 5 µL d'héparine pour empêcher sa coagulation. Un volume de 5 µL de chaque échantillon a été mélangé à 5 mL de liquide scintillant pour compter la quantité de radioactivité par scintillation liquide. A l'issue de l'étude pharmacocinétique, les animaux ont été sacrifiés.

### 8.3 PERFUSION ET CONGÉLATION DES ORGANES

Après avoir été sacrifiés, les souris ont été perfusés avec une solution de NaCl à 0,9%. Pour cela, la perfusion a été placée directement dans le cœur en piquant à l'apex de celui-ci au niveau du ventricule gauche, et l'oreillette droite a été coupée pour laisser le sang se déverser. Un volume allant de 10 à 15 mL de solution a été injectée à un débit de 200 mL/h par la perfusion. Lorsque la perfusion est suffisante, le foie et les reins se sont éclaircis tandis que les poumons doivent rester très légèrement rose.

A l'issue de la perfusion, les différents organes d'intérêt ont été prélevés puis pesés avant d'être plongés quelques secondes dans de l'hexane placé dans un bain froid de carboglace et

d'acétone. Les organes ont ensuite été transportés sur carboglace puis stockés à -80°C jusqu'à l'utilisation.

#### **8.4 OBTENTION DES EXTRAITS TUMORAUX**

La tumeur prélevée sur l'animal (environ 300 mg) a été coupée en trois puis les morceaux ont été placés dans un tube Bertin de 2 mL avec 6 billes en céramique de 2,8 mm par tube. La tumeur a ensuite été immergée dans le tampon de broyage (10 mM Tris ; 150 mM NaCl ; 1% Triton X-100 et 0,01% Brij à pH=7,5) à la concentration de 800 mg de tumeur/mL. Le broyage est réalisé à 7°C avec le Precellys® Evolution de Bertin Technologies en 8 cycles de 30 secondes de broyage à 6 000 rpm suivies de 30 secondes de pause. Le broyat tumoral obtenu a ensuite été centrifugé pendant 5 minutes à 15 000 rpm pour éliminer les débris tissulaires. On obtient un extrait tumoral limpide à une concentration d'environ 2 mg/mL en protéines (dosage Bradford).

#### **8.5 COUPES DES ORGANES AU CRYOSTAT**

Les coupes de tissus biologiques ont été réalisées à l'aide de l'appareil Leica CM3050 S. Une fois la chambre de l'appareil refroidie à -20°C, l'organe a été congelé dans la matrice d'enrobage dans l'enceinte de la chambre. Les coupes d'organes de l'épaisseur choisie ont ensuite été récupérées sur des lames SuperFrost (VWR). Les lames ont ensuite été placées pendant une nuit en boîte dessiccation pour sécher les coupes avant d'être analysées par radio-imagerie.

# ANNEXES

Review

# Analytical Methods for the Detection and Quantification of ADCs in Biological Matrices

Héloïse Cahuzac and Laurent Devel \*

Département Médicaments et Technologies pour la Santé (MTS), CEA, INRAE, SIMoS, Université Paris-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France; heloise.cahuzac@cea.fr

\* Correspondence: laurent.devel@cea.fr; Tel.: +33-1-69-08-95-65

Received: 8 October 2020; Accepted: 11 December 2020; Published: 14 December 2020



**Abstract:** Understanding pharmacokinetics and biodistribution of antibody–drug conjugates (ADCs) is one of the critical steps enabling their successful development and optimization. Their complex structure combining large and small molecule characteristics brought out multiple bioanalytical methods to decipher the behavior and fate of both components in vivo. In this respect, these methods must provide insights into different key elements including half-life and blood stability of the construct, premature release of the drug, whole-body biodistribution, and amount of the drug accumulated within the targeted pathological tissues, all of them being directly related to efficacy and safety of the ADC. In this review, we will focus on the main strategies enabling to quantify and characterize ADCs in biological matrices and discuss their associated technical challenges and current limitations.

**Keywords:** antibody–drug conjugates; pharmacokinetics and biodistribution; liquid chromatography coupled to mass spectrometry; ligand-binding assays; in vivo imaging; ex vivo autoradiography

## 1. Introduction

Antibody–drug conjugates (ADCs) consist of a small-molecule drug (payload) covalently bound to a monoclonal antibody via a chemical linker. By merging the specific binding properties of antibodies to the potency of small molecules, ADCs are designed to selectively deliver cell-killing agents to targeted pathogenic tissues, while limiting systemic toxicity. Most of the ADCs developed so far are potential anticancer agents and nine of them were approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of various types of cancer (Table 1). Many other ADCs are currently in advanced clinical trials not only for anticancer applications [1–5] but also to treat intracellular *Staphylococcus aureus* bacterial infection [6], for the targeted delivery of kinase inhibitors [7], as well as ADCs with anti-inflammatory properties [8,9].

In most approved and clinical-stage ADCs, the toxic payloads are microtubule disruptors or DNA-damaging agents [10,11]. In the first and second generations of ADCs, those payloads were conjugated to antibody component in a stochastic manner, leading to heterogeneous mixtures of chemically distinct molecules varying in both drug-to-antibody ratio (DAR) and conjugation sites [1]. This last decade, with the aim to better control the position and the number of drug loads, new conjugation strategies were developed to access a new generation of ADCs with improved homogeneity [1,2,12,13]. Those site-specific reactions rely on the insertion of engineered cysteine residues [14] or unnatural amino acids within the antibodies core [15,16], enzymatic conjugation [17–19], cross-link of the reduced interchain disulfides with rebridging chemical reagents [20], and glycan-mediated conjugation [21]. The conjugating linkers between payload and antibody are generally classified into cleavable and noncleavable ones, which can behave quite differently in a biological system [22]. There are several linker types comprising hydrazone [23,24], disulfide [25], dipeptide [26,27], tetrapeptide [28], glucuronide [29], phosphate-ester [30], or noncleavable linker [31], which are sensitive to different triggers such as

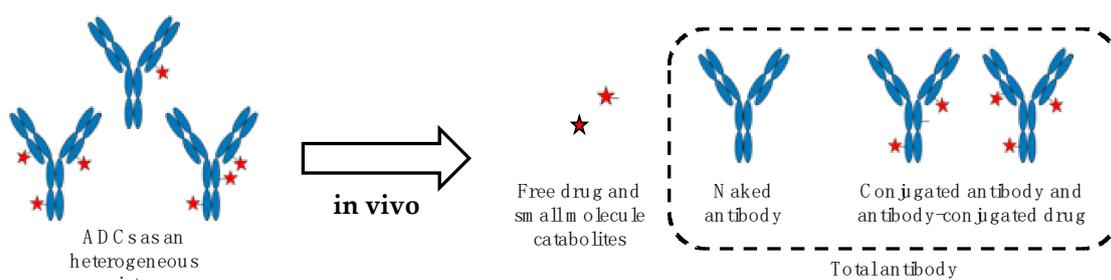
pH variation, modification of the reducing environment, or local presence of enzymes. Noteworthy, enzymatically cleavable peptide-base linkers have been designed both to be highly stable in circulation and to exhibit a more specific drug release mechanism within the targeted tissues [32]. It was also demonstrated that the in vivo stability of the linker during circulation depends considerably on the location and solvent accessibility to the conjugation site [14].

**Table 1.** Antibody–drug conjugates (ADCs) approved by the Food and Drug Administration (FDA).

ADC	FDA Approval	Indication	Target Antigen	Antibody	Linker	Payload	Conjugation	Average DAR
Mylotarg®	2000, withdrawn in 2010 and reapproved in 2017	Relapsed or refractory acute myeloid leukemia	CD33	IgG4 humanized	Hydrazone (cleavable)	Calicheamicine	Lysine	2.5
Adcetris®	2011	Cutaneous anaplastic large cell lymphoma	CD30	IgG1 chimeric	Val-Cit (cleavable)	MMAE	Cysteine	4
Kadcyla®	2013	HER2-positive metastatic breast cancer	HER2	IgG1 humanized	SMCC * (noncleavable)	DM1	Lysine	3.5
Besponsa®	2017	Acute lymphoblastic leukemia	CD22	IgG4 humanized	Hydrazone (cleavable)	Calicheamicine	Lysine	6
Polivy®	2019	Diffuse large B-cell lymphoma	CD79b	IgG1 humanized	Val-Cit (cleavable)	MMAE	Cysteine	4
Enhertu®	2019	HER2-positive metastatic breast cancer	HER2	IgG1 humanized	Gly-Gly-Phe-Gly (cleavable)	DXd	Cysteine	7.5
Padcev®	2019	Locally advanced or metastatic urothelial cancer	Nectin-4	IgG1 fully human	Val-Cit (cleavable)	MMAE	Cysteine	3.8
Trodelyv®	2020	Triple negative breast cancer	Trop-2	IgG1 humanized	Carbonate (cleavable)	SN-38	Cysteine	7.6
Blenrep®	2020	Relapsed or refractory multiple myeloma	BCMA	IgG1 humanized	MC * (noncleavable)	MMAF	Cysteine	4

\* SMCC: Succinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate; MC: Maleimido-caproyl.

Like for other therapeutics, the understanding of ADCs fate in vivo is critical for their development, optimization, and successful transfer to human. The pharmacology of ADCs is complex and several factors potentially impacting their pharmacokinetics, toxicity, and biodistribution have to be carefully considered. This notably includes their physical characteristics (e.g., composition and size, surface engineering, DAR, conjugation site, and net charge at physiological pH) and their propensity to generate antidrug antibodies (ADAs), the latter correlating with ADCs immunogenicity. All those factors have been recently reviewed [33,34] and are not covered by the present review. In any event and due to their multicomponent nature, ADCs must be considered as a complex and dynamically changing mixture in vivo, driven by undesirable drug release [35], catabolism [36], and variable clearance rate according to DAR [37]. Therefore, in such a scenario, multiple ADCs-derived analytes have to be measured to properly describe the stability and biodistribution of ADCs as well as the amount of drug accumulated within the targeted tissues. The main ADCs-derived analytes comprise the naked antibody, the conjugated antibody, and antibody-conjugated drug, all the three corresponding to total antibody, and the released small molecule drug as well as its metabolites [36,38–40] (Figure 1).



**Figure 1.** The catabolic fate of ADCs increases the complexity of the mixture in vivo giving rise to multiple analytes to be measured. The antibody is colored in blue, the free drug and its metabolites are represented as red stars.

To determine systemic (e.g., in plasma) and local (e.g., in tissues) levels of ADCs-derived analytes, two main types of bioanalytical methods can be distinguished. The analytical methods that do not imply any prelabeling of the ADCs components and those requiring to label the antibody part, the payload or both of them. The label-free methods mainly rely on ligand-binding assays (LBAs), liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS), or a combination of both methods. Most of the time in the case of labeled ADCs, a fluorescent reporter or a radioactive isotope are incorporated within the structure of the antibody or/and the drug. In this case, the pharmacokinetics, biodistribution and tissues uptake of ADCs are determined either by noninvasive imaging approaches (e.g., positron emission tomography (PET) or fluorescence molecular tomography (FMT)) or by liquid scintillation counting and ex vivo radio-imaging after animal sacrifice, the latter being obviously restricted to preclinical studies. The present review proposes to outline those different bioanalytical methods and discuss their associated technical challenges aiming at characterizing and accurately quantifying the different ADCs-derived analytes in various biological matrices, with a particular focus on preclinical studies.

## 2. Label-Free Bioanalytical Methods

### 2.1. Ligand-Binding Assays (LBAs)

Out of all the LBA formats, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) relying on an immunoaffinity detection of the protein of interest, is the gold standard of LBA for the analysis of large molecules in complex biological samples. This bioanalytical method offers unique advantages for the quantification of proteins, such as a high sensitivity and a broad range of quantification in a small biological volume without any sample extraction steps. However, the complex multicomponent structure of ADCs and their heterogeneous and dynamically changing nature in vivo present several analytical challenges for LBAs [36,41]. In this respect, the quantification of total antibody requires the use of detection reagents that bind selectively and efficiently to the antibody component. This includes generic anti-human antibody, protein A, G or L, or more specific detection reagent such as anti-idiotypic antibody. This approach has been successfully applied to the quantification of several ADCs in various biological matrices, including anti-CD33-Calicheamicin ADC [42], T-DM1 [43], and mAb-MMAE conjugates [14,44–46]. LBAs can also utilize antidrug-specific antibody as a capture antibody to quantify conjugated antibody [47–50] or antidrug antibody as detection reagents [51–54]. Regarding the choice of primary antibody as capture agent and to avoid any potential interferences from endogenous IgGs, it is essential to evaluate its nonspecific cross-reactivity. For instance, it is recommended to choose antibodies with minimum reactivity to mouse and rat for preclinical studies. Both monoclonal and polyclonal antibodies are suitable as capture and detection agents. Monoclonal antibodies provide mono specificity toward a single epitope, which allows fine detection and quantitation of small differences in antigen. Polyclonal antibodies are used to capture as much antigen as possible, while monoclonal ones are used to detect ADCs with improved specificity. Polyclonal antibodies

are much less expensive to produce than monoclonal antibodies. Therefore, an appropriate balance between cost and required specificity has to be systematically considered.

Importantly, conjugated antibody ELISA is very sensitive to the choice of the antidrug antibody, and therefore the key aspect in such assay development is to identify an antidrug antibody that is minimally influenced by the drug load. Indeed, it has been reported that the small molecule drug can indirectly influence the reagents binding to the antibody, resulting in species varying in DAR that are not detected with the same efficiency and accuracy. For instance, purified DAR fractions with high MMAE drug load were under-recovered (around 70% and 55% of recovery for DAR 6 and DAR 8, respectively) in a total antibody ELISA assay using various reagents [55]. As a consequence, the development of such an assay requires the screening of multiple formats and reagents in relevant biological matrices including plasma or serum [47]. Compared to conventional ELISA where reagents are added sequentially, the semihomogeneous assay (SHA), relying on premixing of capture and detection reagents with the sample solution, turns out more effective to accurately detect the whole set of ADCs regardless of their drug loading [55]. Finally, LBAs can also be suitable for the quantification of the drug moiety. Thus, both an anti-MMAE antibody and a HRP-MMAE were used to quantitate free MMAE released from ADC after an *in vitro* incubation with Cathepsin B [54].

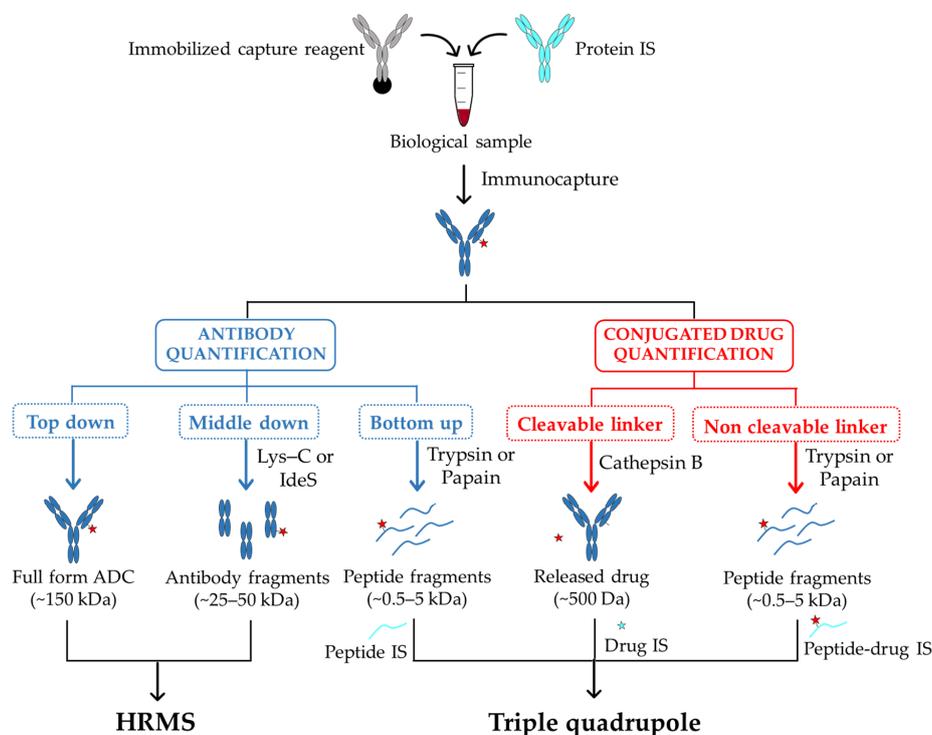
However, LBAs with excellent specificity and accuracy remain difficult to achieve and require the use of efficient and selective capture antibodies. The development of such agents may turn out difficult and time-consuming, making those immunoassays sometimes unpractical in the early phase of ADCs development. Furthermore, their quantitative accuracy, specificity, and reproducibility can be compromised by interferences from endogenous IgGs and degradation of the antibody component. ELISA is very commonly used in quantification of ADCs in plasma but is often matrix- and species-dependent, rendering its transfer across different biological matrices (e.g., from plasma to tissues) sometimes challenging [36,41]. Nevertheless, these limitations can be overcome when the capture and the detection antibodies are finely selected. Thus, by using a total antibody anti-human IgG antibody (Fc-specific), trastuzumab-vc-MMAE can be sensitively and accurately dosed in both plasma and tissue homogenates, with a detection limit down to 1 ng/mL [56].

## 2.2. Hybrid Ligand-Binding Immuno-Affinity Capture Followed by Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (LB-LC-MS)

The ligand-binding and LC-MS (LB-LC-MS) hybrid method that combines the strength of both technologies is becoming a gold standard approach in ADC bioanalysis [57–59]. In this respect, the ligand-binding affinity enrichment step allows to spare interfering abundant proteins while the LC-MS based method offers quantitative bioanalysis with multiple analytes detection with high specificity within a single sample. In preclinical samples, an immobilized anti-human Fc antibody is commonly used to isolate ADCs from animal plasma whereas a specific anti-idiotypic antibody is required in human samples [60]. After washing steps and proteolytic digestion, the target antibodies are unambiguously identified through their MS/MS fragmentation pattern [61].

The quantitative analysis is mostly carried out using the “bottom-up” strategy. In this case, a digestion of the captured ADC is followed by a LC-MS/MS analysis to detect and identify their selected signature peptides (Figure 2). The choice of the signature peptides within the antibody core mainly relies on the biological matrix in which ADCs have to be detected and quantified. In this respect, peptides from the constant region of antibody part will be considered as signature peptides for ADCs characterization in animal models. In human samples and to limit interferences with endogenous human IgGs, signature peptides from antibody variable regions will be preferred. Regarding the quantification, it is performed by comparing signature peptides of target antibody to standard peptides present at defined amounts. Such internal standards must be identical in chemical and physical properties to the peptides of interest, with small differences in mass that enables their discrimination by mass spectrometry. To this purpose, peptides labeled with stable isotopes  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  are commonly used [62]. In order to compensate potential variations during sample preparation,

a stable-isotope-labeled antibody as internal standard can be also incorporated from the beginning of the enrichment process [63]. Although this workflow offers a very good sensitivity of quantification, the signature peptides only provide limited information about potential structural changes of the entire ADC and may therefore lead to a misestimation of their concentration in sample solutions.



**Figure 2.** A typical workflow for the bioanalysis of ADCs in biological sample using LB-LC-MS/MS methods. The antibody and the peptide fragments are colored in blue, the free drug and its metabolites are represented as red stars. The internal standards, Peptide IS and Peptide-drug IS, are colored in cyan. The Drug IS is represented as a cyan star. IS: internal standard

To overcome these limitations, the “top-down” strategy that allows assessing qualitative and quantitative changes simultaneously, has come out as a complementary analysis to the “bottom-up” approach. In this case, the whole target protein is analyzed using high-resolution mass spectrometry (HRMS) with no further digestion step required [64] (Figure 2). This approach has been used to efficiently quantify intact antibodies in biological samples [65,66], and variations resulting from proteolytic digestion step remain limited. Nevertheless, compared to peptide level quantification, LC-MS quantification of intact ADCs presents many other challenges. Indeed, due to their larger size and heterogeneity, their mass signal can be dispersed among multiple charge states, resulting in a loss of detection sensitivity [67]. Further, antibody internal standards are almost systematically required for the absolute quantification of ADCs [65]. In some cases, this turns out problematic when the internal standard coelutes with the target specie, thus contributing in complicating the spectra deconvolution [67]. However, by applying a narrow-window of extracted-ion chromatogram (EIC) and a deconvolution method with no internal standard, an accurate quantification with an acceptable detection threshold (5 µg/mL) can be achieved [67]. When a high-resolution accurate-mass (HR/AM) mass spectrometry is used, this “top-down” strategy enables to characterize the *in vivo* biotransformations of trastuzumab emtansine (T-DM1 or Kadcyla) in circulation in tumor-bearing mice [68]. In this case, by combining an affinity capture with a biotinylated HER2 extracellular domain (EDC) and mass analyses on total antibody using a HR/AM orbitrap, the authors provided new data on T-DM1 catabolism, including maleimide exchange, loss of payload, and linker-drug hydrolysis.

A good compromise between high sensitivity and the access to dynamic changes of ADCs in biological matrixes can be obtained with a “middle-down” approach implying ADCs digestion into smaller subunits (subfragments) before LC–MS analysis (Figure 2). In this case, a partial digestion with Lys-C of a protein A bound IgG allows the direct characterization of the released Fab fragment (50 kDa), and its accurate quantification [69]. An additional step of disulfide bridges reduction after digestion using the endopeptidase IdeS has also been reported to generate three approximately 25 kDa fragments (Lc, Fc/2, Fd) that can be directly analyzed by LC–MS [70]. In all cases, the reduced size of analytes results in an improved sensitivity and resolution of mass spectra compared to the intact ADC.

In a comparable manner to LBAs, one of the main limitations of affinity capture combined with LC–MS is that it requires specific capture reagents capable of selectively bind the targeted ADCs, as well as its derived analytes. In addition, the majority of LB–LC–MS focus on Fab-conjugated ADCs and are not readily applicable to Fc-conjugated ones. In such a context, a generic and universal affinity capture LC–MS assay has been recently developed to evaluate biotransformation of ADCs in preclinical studies, independently of the antibody type, conjugation site (Fab, Fc), or conjugation technologies [71]. In this case, the ADCs are captured from mouse serum with generic antihuman F(ab')<sub>2</sub> coated beads and, depending on the site of conjugation, either directly eluted or digested “on-bead” with IdeS enzyme before elution. The resulting ADC sub fragments are finally analyzed by LC–HRMS. The advantages of this method are that it can be performed using commercially available generic reagents and requires sample preparation time of less than 7 h.

The hybrid immuno-affinity capture LC–MS is also suitable for the quantification of the conjugated payload [72]. The characteristic of the linker moiety mainly determines the sample processing strategy for the conjugated payload analysis. In the case of ADC incorporating an enzyme-sensitive dipeptide Val-Cit linker (e.g., brentuximab vedotin), the release of payload is performed by digestion with proteases such as cathepsin B or papain [54,72–75]. For noncleavable linkers, the whole antibody is first digested by a protease and the resulting drug-conjugated peptide is the surrogate analyte to monitor by LC–MS [76].

Interestingly, this LB–LC–MS/MS method has also been reported for the quantitative assessment of albumin linker-payload adduct. This mainly encompasses thiol-maleimide based ADCs that can undergo deconjugation through a thiol exchange with the Cys34 from the serum albumin in circulation [52]. In this case, the capture reagents are antipayload [77] or an antialbumin antibodies [78].

### 2.3. Nano-Surface and Molecular-Orientation Limited (nSMOL) Proteolysis

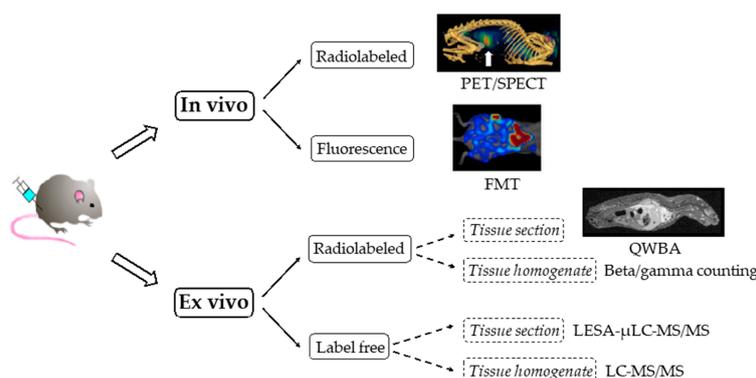
Shotgun proteomics enables quantification of fully digested peptides by trypsin using liquid chromatography MS (LC/MS). With the aim to apply a comparable technology to monoclonal antibodies and ADCs quantitation in biological matrices, Shimada and coworkers recently developed an elegant approach consisting in limiting protease access to a specific region of antibody substrate, thus enabling the generation of a restricted array of peptides fragments (signature peptides) subsequently analyzed by mass spectrometry [79,80]. This method, named nano-surface and molecular orientation limited (nSMOL) proteolysis, allows the selective and orientational proteolysis of the antibodies Fab region and relies on three distinct critical steps: (i) the miniaturization of the reaction field while increasing the surface area of the protease reaction through the use of nanoparticles, (ii) the antibody immobilization onto resin via protein A/G affinity binding, and (iii) the Fab region-selective proteolysis by limiting protease access to the substrate by tuning the particle size (protease) and the pore diameter of the resin immobilizing the antibodies. This approach has notably permitted to quantify Trastuzumab emtansine (T-DM1) in human plasma [80]. In the same study, by using nSMOL for the antibody and polarity-selective liquid–liquid partition for the cytotoxic drugs, it was possible to obtain an overall picture of antibody–drug conjugate T-DM1 pharmacokinetics and released payloads in samples from patients with breast cancer. Noteworthy, nSMOL proteolysis also enables to accurately quantify antibody drug in coexistence with antidrug antibodies (ADAs) [81].

#### 2.4. MS Methods to Assess Pharmacokinetics and Biodistribution of Payload

Conventional small-molecule LC–MS/MS assay is designed to measure drug that is no longer bound to the antibody. This includes the portion released during circulation phase as well as that liberated during ADC catabolism. A step of protein precipitation or solid phase extraction (SPE) is systematically performed to remove all the plasma proteins prior to LC analysis. Molecular and fragments masses are used to determine the structure of the major metabolites and UV absorption at characteristic wavelength enables the quantification of different entities. The sensitivity of the assay is one of the major challenges associated with the free drug quantification since the unconjugated drug can be present at a very low concentration in biological samples. For instance, it has been reported that the quantification of the free DM1 payload in clinical samples of patients treated every 3 weeks was not possible as the signal was below the lower limit of quantification (LLOQ) of the method (0.20 ng/mL) [82]. In another study, the quantification of the unconjugated DM4 has only been performed during the first 24 h of a 3-week study using a LC–MS/MS method with a LLOQ of 0.50 ng/mL [83]. However, the method sensitivity remains difficult to predict since it depends both on the payload considered and the performances of mass spectrometry device used.

Matrix assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry (MALDI–IMS) can be also used to directly detect the distribution of payload within tumor tissues [84]. In this study, the authors conducted quantitative and semiquantitative analyses of MMAE in subcutaneous tumors by using LC–MS/MS and MALDI–IMS, respectively. Interestingly, by exploiting MALDI–IMS conditions dedicated to low-molecular weight substances, they visualized only free MMAE without interference from conjugated MMAE. Further, by relying on a specific MS pattern of the MMAE payload, the latter can be observed with high reliability and accuracy in tumor tissues.

A label-free method has also been described for the quantification of the Cys-Mc-MMAF metabolite in homogenates of tumor, liver, lung, kidney, and heart (Figure 3). This has been achieved by a LC–MS/MS analysis using the amino acid linker-drug Cys-Mc-MMAD as an internal standard [85]. The direct quantification of the released payload Lys-MCC-DM1 on tumor and liver sections has also been achieved by liquid extraction surface analysis micro-liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LESA– $\mu$ LC–MS/MS, Figure 3) [86].



**Figure 3.** Overview of the different in vivo and ex vivo methods used to study the biodistribution of ADCs in preclinical model. PET: positron emission tomography. SPECT: single-photon emission computed tomography. FMT: fluorescence molecular tomography. QWBA: quantitative whole-body autoradiography. LC–MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometry. LESA– $\mu$ LC–MS/MS: liquid extraction surface analysis coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry. PET/SPECT, FMT, and QWBA images were extracted from doi:10.18632/oncotarget.27263; doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-1012 and doi:10.1124/dmd.115.069021, respectively.

### 3. Analytical Methods Requiring a Prelabeling of ADCs

#### 3.1. Noninvasive Molecular Imaging Approaches

Imaging of radiolabeled ADCs by positron emission tomography (PET), or immuno-PET, has been employed for the noninvasive quantification of ADCs uptake in normal and tumor tissues (Figure 3) [87]. For immuno-PET agents, different radioactive isotopes can be used, including  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ , and  $^{124}\text{I}$ . This approach has been notably exploited to challenge the stability of an original bifunctional platinum (II) linker incorporated within the core of  $^{89}\text{Zr}$ -labeled Trastuzumab, and conjugated to two different payloads (Desferal or auristatin) in a preclinical model [88] or to assess the targeting capacity of novel mAb806-antibody–drug conjugates in malignant mesothelioma [89]. Noninvasive in vivo imaging technologies such as single-photon emission computed tomography (SPECT) have been also used to determine the whole-body biodistribution of ADCs using a  $^{89}\text{Zr}$  or a  $^{111}\text{In}$  radiolabeling on the antibody component [90–93]. An alternative method based on fluorescence molecular tomography (FMT) has been also reported to assess the whole-body distribution of an antibody labeled with a near-infrared fluorophore [94] (Figure 3).

#### 3.2. Ex Vivo “Cut and Count” Techniques

The evaluation of ADCs pharmacokinetics and biodistribution in preclinical models can also be performed by either labeling the antibodies component with  $^{125}\text{I}$  [48,95–97],  $^{123}\text{I}$  [98], or  $^{111}\text{In}$  [91,97,99,100] or the drug with  $^3\text{H}$  [48,86,101]. In this case, the pharmacokinetics can be obtained by collecting blood samples, within which the content in radioactivity is assessed by liquid scintillation counting (Figure 3). The biodistribution is examined after animal sacrifice at different time points, tissues harvesting and ex vivo “cut and count” techniques enabling to quantify the radioactivity levels in different organs using beta [101,102] or gamma counters [91,92,99,103]. Of note, two examples of quantitative whole-body autoradiography (QWBA) have been recently reported to study the tissue distribution in depth of  $^{125}\text{I}$  labeled antibody [96], and a  $^3\text{H}$ -labeled DM1 payload [86]. Regarding the latter and beyond the possibility to accurately quantify the amount of payload accumulated within the tumor, the use of liquid extraction surface analysis coupled to micro-liquid chromatography–tandem mass spectrometry allowed to identify a unique catabolite distributed in the tumor and liver tissue.

#### 3.3. Dual Radiolabeling

Surprisingly, though the dual radiolabeling of both ADCs components should provide the most comprehensive understanding of ADCs in vivo performances, only a very few examples have been reported to date [102–105]. The biodistribution of the antibody component and the payload-related species in different organs has been thus described in a case of a  $^3\text{H}$  antibody and  $^{14}\text{C}$ -labeled MMAF [102], and a  $^{89}\text{Zr}$  antibody and  $^{131}\text{I}$ -labeled tubulysin analogue [103]. Digital autoradiography systems can acquire data from multiple radioisotopes and accurately discriminate them based on their difference in emission energies. Thus, the use of cryo-imaging quantitative autoradiography (CIQA) has been described to study the distribution to the tumor of a  $^{111}\text{In}$  antibody and  $^3\text{H}$ -labeled MMAE, where the  $^3\text{H}$  signal has been acquired after a delay of more than 10  $^{111}\text{In}$  half-lives (2.8 days) [104]. More recently, a dual labeling strategy has been used to challenge the stability of the Pt(II)-based linker mentioned above [105]. Of note, dual imaging is not achievable by noninvasive PET imaging since the use of two radioelements at the same time remains challenging mainly due to energy interference.

#### 3.4. Limitations of Analytical Methods Involving Radiolabeling

Although allowing a high sensitivity of detection, quantitative radio imaging studies provide no information on the identity of ADC-related species and drug metabolites present in the tissues. To this purpose, these imaging methods must be associated to qualitative bioanalytical methods. In this respect, tissues extraction followed by a SEC-HPLC or standard HPLC analyses coupled to a radioactivity detector can partly circumvent these issues [86,101]. Further, a single labeling on

antibody component or payload does not allow to monitor the whole set of ADCs-derived analytes. To overcome these limitations, different and complementary technologies (e.g., liquid scintillation counting, liquid chromatography/mass spectrometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and size exclusion chromatography) have to be used to access the pharmacokinetics of the total antibody, the released small molecule drug as well as its metabolites.

Whether it refers to single or dual labeling, these methods all require expensive radioisotopes and dedicated facilities that complicate their clinical transfer. In addition, the radioactive tags are often incorporated randomly within the ADCs core, with potential consequences on their *in vivo* behavior. In this respect, the incorporated tag may cause immunoreactivity or alter the characteristics of ADCs binding and distribution.

#### 4. Conclusions

ADME characterization of ADCs is a complex process due to the multicomponent and heterogeneous nature of these conjugates. While conventional large- and small-molecule methods can be used for ADC bioanalysis, it is however important to understand their limitations to develop ADCs-dedicated bioanalytical strategies.

These recent years, the hybrid LB-LC-MS method has become the most versatile assay in ADCs bioanalysis since they can provide information not only on the entire molecule but also on ADC-derived analytes. When combined with a highly specific LC-MS method, LBA has overcome its intrinsic limitations, mainly related to interferences with highly abundant proteins, to enable unambiguous identification of ADC-derived analytes in many different biological samples. In addition, recent emerging technologies such as an enrichment strategy via pH regulation and ionic solvent strengths [106] are completing the array of LC-MS quantification of biotherapeutics in biological matrices and should be soon applicable to ADCs.

The use of radiolabeled ADCs to support pharmacokinetic and biodistribution studies is undoubtedly a way to reach high detection threshold. More specifically, designing a dual radiolabeled ADC, harboring distinct radioactive tags on the protein component and the small molecule drug, could appear as a particularly valuable strategy to monitor the *in vivo* fate of both entities simultaneously and to accurately and sensitively measure their relative amount during the circulation and distribution phases. Combined with whole-body imaging, such an approach can provide useful information on overall stability of the conjugate as well as its biodistribution within target-expressing and nontarget-expressing tissues, thus assessing the ADCs efficacy and potential toxicity. However, imaging and accurate quantification by radioactive counting must be associated to qualitative analyses such as HPLC or SEC-HPLC to provide information about the identity of the radio emitting species. Furthermore, the dual radiolabeling must neither interfere with the physicochemical properties of both ADCs components, nor add further heterogeneity that could alter ADCs binding properties and *in vivo* behavior. Accordingly, the conception of dual labeled ADCs must imperatively rely on efficient radiolabeling reactions that do not affect the drug properties, namely traceless reactions, and on site-specific conjugation reactions aiming at controlling the modification made within the antibody core. Once these limitations are overcome, the dual labeling strategy could become a central methodology to rapidly challenge and optimize various ADCs in preclinical models, thus accelerating their transfer to clinical studies.

**Author Contributions:** Writing—review and editing, H.C. and L.D.; supervision, L.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by CEA program “*amont-aval*”.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

ADA	Antidrug antibody
ADC	Antibody–drug conjugate
ADME	Absorption, distribution, metabolism and excretion
CIQA	Cryo-imaging quantitative autoradiography
DAR	Drug-to-antibody ratio
DM1	Mertansine
DM4	Ravtansine
DOTA	Tetraxetan
DTPA	Pentetic acid
EIC	Extracted-ion chromatogram
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPR	Enhanced permeability and retention
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallizable
FcRn	Neonatal Fc receptor
FDA	Food and Drug Administration
FMT	Fluorescence molecular tomography
HER-2	Human epidermal growth factor receptor 2
HR/AM	High resolution accurate-mass
HRMS	High resolution mass spectrometry
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunoglobulin G
IS	Internal standard
LBA	Ligand binding assay
LB-LC-MS	Ligand-binding immuno-affinity capture followed by LC-MS analysis
LC-MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry
LESA- $\mu$ LC-MS	Liquid extraction surface analysis coupled to $\mu$ LC-MS
LLOQ	Lower limit of quantification
MMAE	Monomethyl auristatin E
MMAF	Monomethyl auristatin F
nSMOL	Nano-surface and molecular-orientation limited proteolysis
PET	Positron emission tomography
QWBA	Quantitative whole-body autoradiography
SEC	Size exclusion chromatography
SHA	Semihomogeneous assay
SPE	Solid phase extraction
SPECT	Single-photon emission computed tomography
T-DM1	Trastuzumab emtansine/Kadcyla <sup>®</sup>

## References

1. Joubert, N.; Beck, A.; Dumontet, C.; Denevault-Sabourin, C. Antibody–Drug Conjugates: The Last Decade. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Beck, A.; Goetsch, L.; Dumontet, C.; Corvaia, N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 315–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Yu, B.; Liu, D. Antibody-drug conjugates in clinical trials for lymphoid malignancies and multiple myeloma. *J. Hematol. Oncol.* **2019**, *12*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Coats, S.; Williams, M.; Kebble, B.; Dixit, R.; Tseng, L.; Yao, N.; Tice, D.A.; Soria, J. Antibody–Drug Conjugates: Future Directions in Clinical and Translational Strategies to Improve the Therapeutic Index. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 5441–5449. [[CrossRef](#)]
5. Chau, C.H.; Steeg, P.S.; Figg, W.D. Therapeutics Antibody–Drug conjugates for cancer. *Therapeutics* **2019**, *394*, 793–804. [[CrossRef](#)]

6. Lehar, S.M.; Pillow, T.; Xu, M.; Staben, L.; Kajihara, K.K.; Vandlen, R.; DePalatis, L.; Raab, H.; Hazenbos, W.L.; Hiroshi Morisaki, J.; et al. Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature* **2015**, *527*, 323–328. [[CrossRef](#)]
7. Wang, R.E.; Liu, T.; Wang, Y.; Cao, Y.; Du, J.; Luo, X.; Deshmukh, V.; Kim, C.H.; Lawson, B.R.; Tremblay, M.S.; et al. An immunosuppressive antibody-drug conjugate. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3229–3232. [[CrossRef](#)]
8. Lim, R.K.V.; Yu, S.; Cheng, B.; Li, S.; Kim, N.J.; Cao, Y.; Chi, V.; Kim, J.Y.; Chatterjee, A.K.; Schultz, P.G.; et al. Targeted Delivery of LXR Agonist Using a Site-Specific Antibody-Drug Conjugate. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 2216–2222. [[CrossRef](#)]
9. Svendsen, P.; Graversen, J.H.; Etzerodt, A.; Hager, H.; Røge, R.; Grønbaek, H.; Christensen, E.I.; Møller, H.J.; Vilstrup, H.; Moestrup, S.K. Antibody-Directed Glucocorticoid Targeting to CD163 in M2-type Macrophages Attenuates Fructose-Induced Liver Inflammatory Changes. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **2017**, *4*, 50–61. [[CrossRef](#)]
10. Pahl, A.; Lutz, C.; Hechler, T. Amanitins and their development as a payload for antibody-drug conjugates. *Drug Discov. Today Technol.* **2018**, *30*, 85–89. [[CrossRef](#)]
11. Masters, J.C.; Nickens, D.J.; Xuan, D.; Shazer, R.L.; Amantea, M. Clinical toxicity of antibody drug conjugates: A meta-analysis of payloads. *Invest. New Drugs* **2017**, *36*, 121–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zhou, Q. Site-specific antibody conjugation for ADC and beyond. *Biomedicines* **2017**, *5*, 64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Hoffmann, R.M.; Coumbe, B.G.T.; Josephs, D.H.; Mele, S.; Ilieva, K.M.; Cheung, A. Antibody structure and engineering considerations for the design and function of Antibody Drug Conjugates (ADCs). *Oncoimmunology* **2018**, *7*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. 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. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 925–932. [[CrossRef](#)]
15. Hallam, T.J.; Smider, V.V. Unnatural amino acids in novel antibody conjugates. *Future Med. Chem.* **2014**, *6*, 1309–1324. [[CrossRef](#)]
16. Hofer, T.; Skeffington, L.R.; Chapman, C.M.; Rader, C. Molecularly defined antibody conjugation through a selenocysteine interface. *Biochemistry* **2009**, *48*, 12047–12057. [[CrossRef](#)]
17. Dennler, P.; Chiotellis, A.; Fischer, E.; Brégeon, D.; Belmant, C.; Gauthier, L.; Lhospice, F.; Romagne, F.; Schibli, R. Transglutaminase-based chemo-enzymatic conjugation approach yields homogeneous antibody-drug conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 569–578. [[CrossRef](#)]
18. Pishesha, N.; Ingram, J.R.; Ploegh, H.L. Sortase A: A Model for Transpeptidation and Its Biological Applications. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2018**, *34*, 163–188. [[CrossRef](#)]
19. Rabuka, D.; Rush, J.S.; Dehart, G.W.; Wu, P.; Bertozzi, C.R. Site-specific chemical protein conjugation using genetically encoded aldehyde tags. *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 1052–1067. [[CrossRef](#)]
20. Badescu, G.; Bryant, P.; Bird, M.; Henseleit, K.; Swierkosz, J.; Parekh, V.; Tommasi, R.; Pawlisz, E.; Jurlewicz, K.; Farys, M.; et al. Bridging disulfides for stable and defined antibody drug conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 1124–1136. [[CrossRef](#)]
21. Van Geel, R.; Wijdeven, M.A.; Heesbeen, R.; Verkade, J.M.M.; Wasiel, A.A.; Van Berkel, S.S.; Van Delft, F.L. Chemoenzymatic Conjugation of Toxic Payloads to the Globally Conserved N-Glycan of Native mAbs Provides Homogeneous and Highly Efficacious Antibody-Drug Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 2233–2242. [[CrossRef](#)]
22. Bargh, J.D.; Isidro-Llobet, A.; Parker, J.S.; Spring, D.R. Cleavable linkers in antibody-drug conjugates. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 4361–4374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bross, P.F.; Beitz, J.; Chen, G.; Chen, X.H.; Duffy, E.; Kieffer, L.; Roy, S.; Sridhara, R.; Rahman, A.; Williams, G.; et al. Approval summary: Gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 1490–1496. [[PubMed](#)]
24. Lamb, Y.N. Inotuzumab Ozogamicin: First Global Approval. *Drugs* **2017**, *77*, 1603–1610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Pillow, T.H.; Schutten, M.; Yu, S.F.; Ohri, R.; Sadowsky, J.; Poon, K.A.; Solis, W.; Zhong, F.; Del Rosario, G.; Go, M.A.T.; et al. Modulating therapeutic activity and toxicity of pyrrolbenzodiazepine antibody-drug conjugates with self-immolative disulfide linkers. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16*, 871–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. De Claro, R.A.; McGinn, K.; Kwitkowski, V.; Bullock, J.; Khandelwal, A.; Habtemariam, B.; Ouyang, Y.; Saber, H.; Lee, K.; Koti, K.; et al. U.S. Food and Drug Administration approval summary: Brentuximab vedotin for the treatment of relapsed Hodgkin lymphoma or relapsed systemic anaplastic large-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 5845–5849. [[CrossRef](#)]
27. Deeks, E.D. Polatuzumab Vedotin: First Global Approval. *Drugs* **2019**, *79*, 1467–1475. [[CrossRef](#)]
28. Zhong, Y.J.; Shao, L.H.; Li, Y. Cathepsin B-cleavable doxorubicin prodrugs for targeted cancer therapy (Review). *Int. J. Oncol.* **2013**, *42*, 373–383. [[CrossRef](#)]
29. Jeffrey, S.C.; Andreyka, J.B.; Bernhardt, S.X.; Kissler, K.M.; Kline, T.; Lenox, J.S.; Moser, R.F.; Nguyen, M.T.; Okeley, N.M.; Stone, I.J.; et al. Development and properties of  $\beta$ -glucuronide linkers for monoclonal antibody-drug conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 831–840. [[CrossRef](#)]
30. Kern, J.C.; Cancilla, M.; Dooney, D.; Kwasnjuk, K.; Zhang, R.; Beaumont, M.; Figueroa, I.; Hsieh, S.C.; Liang, L.; Tomazela, D.; et al. Discovery of Pyrophosphate Diesters as Tunable, Soluble, and Bioorthogonal Linkers for Site-Specific Antibody-Drug Conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 1430–1445. [[CrossRef](#)]
31. Erickson, H.K.; Widdison, W.C.; Mayo, M.F.; Whiteman, K.; Audette, C.; Wilhelm, S.D.; Singh, R. Tumor delivery and in vivo processing of disulfide-linked and thioether-linked antibody-maytansinoid conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 84–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Doronina, S.O.; Mendelsohn, B.A.; Bovee, T.D.; Cervený, C.G.; Alley, S.C.; Meyer, D.L.; Oflazoglu, E.; Toki, B.E.; Sanderson, R.J.; Zabinski, R.F.; et al. Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: Effects of linker technology on efficacy and toxicity. *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 114–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Lucas, A.; Price, L.; Schorzman, A.; Storrie, M.; Piscitelli, J.; Razo, J.; Zamboni, W. Factors Affecting the Pharmacology of Antibody–Drug Conjugates. *Antibodies* **2018**, *7*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Lucas, A.T.; Robinson, R.; Schorzman, A.N.; Piscitelli, J.A.; Razo, J.F.; Zamboni, W.C. Pharmacologic Considerations in the Disposition of Antibodies and Antibody-Drug Conjugates in Preclinical Models and in Patients. *Antibodies* **2019**, *8*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Shen, B.Q.; Xu, K.; Liu, L.; Raab, H.; Bhakta, S.; Kenrick, M.; Parsons-Reponte, K.L.; Tien, J.; Yu, S.F.; Mai, E.; et al. Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 184–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Gorovits, B.; Alley, S.C.; Bilic, S.; Booth, B.; Kaur, S.; Oldfield, P.; Purushothama, S.; Rao, C.; Shord, S.; Siguenza, P. Bioanalysis of antibody-drug conjugates: American Association of Pharmaceutical Scientists Antibody-Drug Conjugate Working Group position paper. *Bioanalysis* **2013**, *5*, 997–1006. [[CrossRef](#)]
37. Sun, X.; Ponte, J.F.; Yoder, N.C.; Laleau, R.; Coccia, J.; Lanieri, L.; Qiu, Q.; Wu, R.; Hong, E.; Bogalhas, M.; et al. Effects of Drug-Antibody Ratio on Pharmacokinetics, Biodistribution, Efficacy, and Tolerability of Antibody-Maytansinoid Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 1371–1381. [[CrossRef](#)]
38. Kamath, A.V.; Iyer, S. Preclinical Pharmacokinetic Considerations for the Development of Antibody Drug Conjugates. *Pharm. Res.* **2015**, *32*, 3470–3479. [[CrossRef](#)]
39. Sukumaran, S.; Zhang, C.; Leipold, D.D.; Saad, O.M.; Xu, K.; Gadkar, K.; Samineni, D.; Wang, B.; Milojevic-blair, M.; Rubinfeld, B.; et al. Development and Translational Application of an Integrated, Mechanistic Model of Antibody-Drug Conjugate Pharmacokinetics. *AAPS J.* **2016**. [[CrossRef](#)]
40. Lin, K.; Tibbitts, J. Pharmacokinetic considerations for antibody drug conjugates. *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 2354–2366. [[CrossRef](#)]
41. Kumar, S.; King, L.E.; Clark, T.H.; Gorovits, B. Antibody-drug conjugates nonclinical support: From early to late nonclinical bioanalysis using ligand-binding assays. *Bioanalysis* **2015**, *7*, 1605–1617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Dowell, J.A.; Korth-Bradley, J. Pharmacokinetics of Gemtuzumab Ozogamicin, an Antibody-Targeted Chemotherapy Agent for the Treatment of Patients with Acute Myeloid Leukemia in First Relapse. *J. Clin. Pharmacol.* **2001**, *41*, 1206–1214. [[CrossRef](#)]
43. Lewis Phillips, G.D.; Li, G.; Dugger, D.L.; Crocker, L.M.; Parsons, K.L.; Mai, E.; Blättler, W.A.; Lambert, J.M.; Chari, R.V.J.; Lutz, R.J.; et al. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 9280–9290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Pollack, V.A.; Alvarez, E.; Tse, K.F.; Torgov, M.Y.; Xie, S.; Shenoy, S.G.; MacDougall, J.R.; Arrol, S.; Zhong, H.; Gerwien, R.W.; et al. Treatment parameters modulating regression of human melanoma xenografts by an antibody–Drug conjugate (CR011-vcMMAE) targeting GPNMB. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2007**, *60*, 423–435. [[CrossRef](#)]
45. Singh, A.P.; Shah, D.K. Measurement and Mathematical Characterization of Cell-Level Pharmacokinetics of Antibody-Drug Conjugates: A Case Study with Trastuzumab-vc-MMAE s. *Drug Metab. Dispos.* **2017**, *45*, 1120–1132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Singh, A.P.; Guo, L.; Verma, A.; Wong, G.G.; Shah, D.K. A Cell-Level Systems PK-PD Model to Characterize In Vivo Efficacy of ADCs. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Stephan, J.P.; Chan, P.; Lee, C.; Nelson, C.; Elliott, J.M.; Bechtel, C.; Raab, H.; Xie, D.; Akutagawa, J.; Baudys, J.; et al. Anti-CD22-MCC-DM1 and MC-MMAF conjugates: Impact of assay format on pharmacokinetic parameters determination. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 1673–1683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Xie, H.; Audette, C.; Hoffee, M.; Lambert, J.M.; Blättler, W. Erratum: Pharmacokinetics and biodistribution of the antitumor immunoconjugate, cantuzumab mertansine (huC242-DM1), and its two components in mice (Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (2004) 308 (1073-1082)). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *310*, 844. [[CrossRef](#)]
49. Kovtun, Y.V.; Audette, C.A.; Ye, Y.; Kovtun, Y.V.; Audette, C.A.; Ye, Y.; Xie, H.; Ruberti, M.F.; Phinney, S.J.; Leece, B.A.; et al. Antibody-Drug Conjugates Designed to Eradicate Tumors with Homogeneous and Heterogeneous Expression of the Target Antigen with Homogeneous and Heterogeneous Expression of the Target Antigen. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 3214–3221. [[CrossRef](#)]
50. Advani, A.; Coiffier, B.; Czuczman, M.S.; Dreyling, M.; Foran, J.; Gine, E.; Gisselbrecht, C.; Ketterer, N.; Nasta, S.; Rohatiner, A.; et al. Safety, Pharmacokinetics, and Preliminary Clinical Activity of Inotuzumab Ozogamicin, a Novel Immunoconjugate for the Treatment of B-Cell Non-Hodgkin’s Lymphoma: Results of a Phase I Study. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 2085–2093. [[CrossRef](#)]
51. DiJoseph, J.F.; Armellino, D.C.; Boghaert, E.R.; Khandke, K.; Dougher, M.M.; Sridharan, L.; Kunz, A.; Hamann, P.R.; Gorovits, B.; Udata, C.; et al. Antibody-targeted chemotherapy with CMC-544: A CD22-targeted immunoconjugate of calicheamicin for the treatment of B-lymphoid malignancies. *Blood* **2004**, *103*, 1807–1814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Alley, S.C.; Benjamin, D.R.; Jeffrey, S.C.; Okeley, N.M.; Meyer, D.L.; Sanderson, R.J.; Senter, P.D. Contribution of linker stability to the activities of anticancer immunoconjugates. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 759–765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Tolcher, B.A.W.; Ochoa, L.; Hammond, L.A.; Patnaik, A.; Edwards, T.; Takimoto, C.; Smith, L.; De Bono, J.; Schwartz, G.; Mays, T.; et al. Directed to the CanAg Antigen: A Phase I, Pharmacokinetic, and Biologic Correlative Study. *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 211–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Sanderson, R.J.; Hering, M.A.; James, S.F.; Sun, M.M.C.; Doronina, S.O.; Siadak, A.W.; Senter, P.D.; Wahl, A.F. In vivo drug-linker stability of an anti-CD30 dipeptide-linked auristatin immunoconjugate. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 843–852.
55. Kozak, K.R.; Tsai, S.P.; Fourie-O’Donohue, A.; Dela Cruz Chuh, J.; Roth, L.; Cook, R.; Chan, E.; Chan, P.; Darwish, M.; Ohri, R.; et al. Total antibody quantification for MMAE-conjugated antibody-drug conjugates: Impact of assay format and reagents. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 772–779. [[CrossRef](#)]
56. Chang, H.-P.; Shah, D.K. Determination of ADC concentration by Ligand-Binding Assays. In *Methods in Molecular Biology 2078*; Springer: Berlin, Germany, 2020; pp. 361–369. ISBN 9781493999286.
57. Ramagiri, S.; Moore, I. Hybridizing LBA with LC-MS/MS: The new norm for biologics quantification. *Bioanalysis* **2016**, *8*, 483–486. [[CrossRef](#)]
58. Zhu, X.; Huo, S.; Xue, C.; An, B.; Qu, J. Current LC-MS-based strategies for characterization and quantification of antibody-drug conjugates. *J. Pharm. Anal.* **2020**, *10*, 209–220. [[CrossRef](#)]
59. Botzanowski, T.; Wagner-Rousset, E.; Rabuka, D.; Beck, A.; Drake, P.M.; Cianf, S. Insights from native mass spectrometry approaches for top- and middle- level characterization of site-specific antibody-drug conjugates. *MAbs* **2017**, *9*, 801–811. [[CrossRef](#)]
60. Fung, E.N.; Bryan, P.; Kozhich, A. Techniques for quantitative LC-MS/MS analysis of protein therapeutics: Advances in enzyme digestion and immunocapture. *Bioanalysis* **2016**, *8*, 847–856. [[CrossRef](#)]
61. Van Den Broek, I.; Van Dongen, W.D. LC-MS-based quantification of intact proteins: Perspective for clinical and bioanalytical applications. *Bioanalysis* **2015**, *7*, 1943–1958. [[CrossRef](#)]

62. Wang, J.; Gu, H.; Liu, A.; Kozhich, A.; Rangan, V.; Myler, H.; Luo, L.; Wong, R.; Sun, H.; Wang, B.; et al. Antibody-drug conjugate bioanalysis using LB-LC-MS/MS hybrid assays: Strategies, methodology and correlation to ligand-binding assays. *Bioanalysis* **2016**, *8*, 1383–1401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Li, H.; Ortiz, R.; Tran, L.; Hall, M.; Spahr, C.; Walker, K.; Laudemann, J.; Miller, S.; Salimi-Moosavi, H.; Lee, J.W. General LC-MS/MS method approach to quantify therapeutic monoclonal antibodies using a common whole antibody internal standard with application to preclinical studies. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1267–1273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. He, J.; Su, D.; Ng, C.; Liu, L.; Yu, S.F.; Pillow, T.H.; Del Rosario, G.; Darwish, M.; Lee, B.C.; Ohri, R.; et al. High-Resolution Accurate-Mass Mass Spectrometry Enabling In-Depth Characterization of in Vivo Biotransformations for Intact Antibody-Drug Conjugates. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 5476–5483. [[CrossRef](#)]
65. Jian, W.; Kang, L.; Burton, L.; Weng, N. A workflow for absolute quantitation of large therapeutic proteins in biological samples at intact level using LC-HRMS. *Bioanalysis* **2016**, *8*, 1679–1691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Lanshoeft, C.; Cianfèrani, S.; Heudi, O. Generic Hybrid Ligand Binding Assay Liquid Chromatography High-Resolution Mass Spectrometry-Based Workflow for Multiplexed Human Immunoglobulin G1 Quantification at the Intact Protein Level: Application to Preclinical Pharmacokinetic Studies. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 2628–2635. [[CrossRef](#)]
67. Jin, W.; Burton, L.; Moore, I. LC-HRMS quantitation of intact antibody drug conjugate trastuzumab emtansine from rat plasma. *Bioanalysis* **2018**, *10*, 851–862. [[CrossRef](#)]
68. He, J.; Yu, S.F.; Yee, S.; Kaur, S.; Xu, K. Characterization of in vivo biotransformations for trastuzumab emtansine by high-resolution accurate-mass mass spectrometry. *MAbs* **2018**, *10*, 960–967. [[CrossRef](#)]
69. Liu, H.; Manuilov, A.V.; Chumsae, C.; Babineau, M.L.; Tarcsa, E. Quantitation of a recombinant monoclonal antibody in monkey serum by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **2011**, *414*, 147–153. [[CrossRef](#)]
70. Wagner-Rousset, E.; Janin-Bussat, M.C.; Colas, O.; Excoffier, M.; Ayoub, D.; Haeuw, J.F.; Rilatt, I.; Perez, M.; Corvaia, N.; Beck, A. Antibody-drug conjugate model fast characterization by LC-MS following IdeS proteolytic digestion. *MAbs* **2014**, *6*, 173–184. [[CrossRef](#)]
71. Kotapati, S.; Passmore, D.; Yamazoe, S.; Kishore, R.; Sanku, K.; Cardarelli, P.M.; Deshpande, S.; Strop, P.; Dollinger, G.; Rajpal, A. Article A Universal Affinity Capture LC-MS Assay for Evaluation of Biotransformation of Site-Specific Antibody Drug Conjugates in Preclinical Studies A Universal Affinity Capture LC-MS Assay for Evaluation of Biotransformation of Site-Specific Antibody Dr. *Anal. Chem.* **2019**, *92*, 2065–2073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Liu, A.; Kozhich, A.; Passmore, D.; Gu, H.; Wong, R.; Zambito, F.; Rangan, V.S.; Myler, H.; Aubry, A.F.; Arnold, M.E.; et al. Quantitative bioanalysis of antibody-conjugated payload in monkey plasma using a hybrid immuno-capture LC-MS/MS approach: Assay development, validation, and a case study. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2015**, *1002*, 54–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Rago, B.; Tumey, L.N.; Wei, C.; Barletta, F.; Clark, T.; Hansel, S.; Han, X. Quantitative Conjugated Payload Measurement Using Enzymatic Release of Antibody–Drug Conjugate with Cleavable Linker. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 620–626. [[CrossRef](#)]
74. Sanderson, R.J.; Nicholas, N.D.; Baker Lee, C.; Hengel, S.M.; Lyon, R.P.; Benjamin, D.R.; Alley, S.C. Antibody-conjugated drug assay for protease-cleavable antibody-drug conjugates. *Bioanalysis* **2016**, *8*, 55–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Li, Y.; Gu, C.; Gruenhagen, J.; Yehl, P.; Chetwyn, N.P.; Medley, C.D. An enzymatic deconjugation method for the analysis of small molecule active drugs on antibody-drug conjugates. *MAbs* **2016**, *8*, 698–705. [[CrossRef](#)]
76. Shi, C.; Goldberg, S.; Lin, T.; Dudkin, V.; Widdison, W.; Harris, L.; Wilhelm, S.; Jmeian, Y.; Davis, D.; O’Neil, K.; et al. LC/MS/MS Bioanalysis of Protein-Drug Conjugates—The Importance of Incorporating Succinimide Hydrolysis Products. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 5314–5321. [[CrossRef](#)]
77. Wei, C.; Zhang, G.; Clark, T.; Barletta, F.; Tumey, L.N.; Rago, B.; Hansel, S.; Han, X. Where Did the Linker-Payload Go? A Quantitative Investigation on the Destination of the Released Linker-Payload from an Antibody-Drug Conjugate with a Maleimide Linker in Plasma. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 4979–4986. [[CrossRef](#)]
78. Dong, L.; Li, C.; Locuson, C.; Chen, S.; Qian, M.G. A Two-Step Immunocapture LC/MS/MS Assay for Plasma Stability and Payload Migration Assessment of Cysteine-Maleimide-Based Antibody Drug Conjugates. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 5989–5994. [[CrossRef](#)]

79. Iwamoto, N.; Shimada, T.; Umino, Y.; Aoki, C.; Aoki, Y.; Sato, T.-A.; Hamada, A.; Nakagama, H. Selective detection of complementarity-determining regions of monoclonal antibody by limiting protease access to the substrate: Nano-. *Analyst* **2014**, *139*, 576–580. [[CrossRef](#)]
80. Iwamoto, N.; Shimomura, A.; Tamura, K.; Hamada, A. LC–MS bioanalysis of Trastuzumab and released emtansine using nano-surface and molecular-orientation limited (nSMOL) proteolysis and liquid–liquid partition in plasma of Trastuzumab emtansine-treated breast cancer patients. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *145*, 33–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Iwamoto, N.; Hamada, A.; Shimada, T. Antibody drug quantitation in coexistence with anti-drug antibodies on nSMOL bioanalysis. *Anal. Biochem.* **2018**, *540–541*, 30–37. [[CrossRef](#)]
82. Heudi, O.; Barteau, S.; Picard, F.; Kretz, O. Quantitative analysis of maytansinoid (DM1) in human serum by on-line solid phase extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry—Method validation and its application to clinical samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *120*, 322–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Wei, D.; Sullivan, M.; Espinosa, O.; Yang, L. A sensitive LC-MS/MS method for the determination of free maytansinoid DM4 concentrations—Method development, validation, and application to the nonclinical studies of antitumor agent DM4 conjugated hu-anti-Cripto MAb B3F6 (B3F6-DM4) in rats and monkeys. *Int. J. Mass Spectrom.* **2012**, *312*, 53–60. [[CrossRef](#)]
84. Fujiwara, Y.; Furuta, M.; Manabe, S.; Koga, Y.; Yasunaga, M.; Matsumura, Y. Imaging mass spectrometry for the precise design of antibody-drug conjugates. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–8. [[CrossRef](#)]
85. Leal, M.; Wentland, J.A.; Han, X.; Zhang, Y.; Rago, B.; Duriga, N.; Spriggs, F.; Kadar, E.; Song, W.; McNally, J.; et al. Preclinical Development of an anti-5T4 Antibody-Drug Conjugate: Pharmacokinetics in Mice, Rats, and NHP and Tumor/Tissue Distribution in Mice. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 2223–2232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Walles, M.; Rudolph, B.; Wolf, T.; Bourgailh, J.; Suetterlin, M.; Moenius, T.; Peraus, G.; Heudi, O.; Elbast, W.; Lanshoeft, C.; et al. New insights in tissue distribution, metabolism, and excretion of [3H]-labeled antibody maytansinoid conjugates in female tumor-bearing nude rats. *Drug Metab. Dispos.* **2016**, *44*, 897–910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Carmon, K.S.; Azhdarinia, A. Application of Immuno-PET in Antibody—Drug Conjugate Development. *Mol. Imaging* **2018**, *17*, 1–10. [[CrossRef](#)]
88. Sijbrandi, N.J.; Merkul, E.; Muns, J.A.; Waalboer, D.C.J.; Adamzek, K.; Bolijn, M.; Somsen, G.W.; Haselberg, R.; Steverink, P.J.G.M.; Houthoff, H.; et al. A Novel Platinum (II)—Based Bifunctional ADC Linker Benchmarked Using 89 Zr-Desferal and Auristatin F—Conjugated Trastuzumab. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 257–268. [[CrossRef](#)]
89. Chia, P.; Parakh, S.; Tsao, M.; Pham, N.; Gan, H.K.; Cao, D.; Burvenich, I.J.G.; Rigopoulos, A.; Reilly, E.B.; John, T.; et al. Targeting and Efficacy of Novel mAb806-Antibody-Drug Conjugates in Malignant Mesothelioma. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 289. [[CrossRef](#)]
90. Lütje, S.; Gerrits, D.; Molkenboer-kuenen, J.D.; Herrmann, K.; Fracasso, G.; Colombatti, M.; Boerman, O.C.; Heskamp, S. Characterization of Site-Specifically Conjugated Monomethyl Auristatin E—And Duocarmycin-Based Anti-PSMA Antibody—Drug Conjugates for Treatment of PSMA-Expressing Tumors. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59*, 494–502. [[CrossRef](#)]
91. Boswell, C.A.; Yadav, D.B.; Mundo, E.E.; Yu, S.F.; Lacap, J.A.; Fourie-O'Donohue, A.; Kozak, K.R.; Ferl, G.Z.; Zhang, C.; Ho, J.; et al. Biodistribution and efficacy of an anti-TENB2 antibody-drug conjugate in a patient-derived model of prostate cancer. *Oncotarget* **2019**, *10*, 6234–6244. [[CrossRef](#)]
92. Boswell, C.A.; Mundo, E.E.; Zhang, C.; Stainton, S.L.; Yu, S.F.; Lacap, J.A.; Mao, W.; Kozak, K.R.; Fourie, A.; Polakis, P.; et al. Differential effects of predosing on tumor and tissue uptake of an 111in-labeled anti-TENB2 antibody-drug conjugate. *J. Nucl. Med.* **2012**, *53*, 1454–1461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. ter Weele, E.J.; van Scheltinga, A.G.T.T.; Kosterink, J.G.W.; Pot, L.; Vedelaar, S.R.; Lamberts, L.E.; Williams, S.P.; Lub-de Hooge, M.N.; de Vries, E.G.E. Imaging the distribution of an antibody-drug conjugate constituent targeting mesothelin with 89Zr and IRDye 800CW in mice bearing human pancreatic tumor xenografts. *Oncotarget* **2015**, *6*, 42081–42090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Giddabasappa, A.; Gupta, V.R.; Norberg, R.; Gupta, P.; Spilker, M.E.; Wentland, J.; Rago, B.; Eswaraka, J.; Leal, M.; Sapra, P. Biodistribution and targeting of anti-5t4 antibody-drug conjugate using fluorescence molecular tomography. *Mol. Cancer Ther.* **2016**, *15*, 2530–2540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

95. Yang, C.; Zhao, X.; Sun, X.; Li, J.; Wang, W.; Zhang, L.; Gou, S. Preclinical pharmacokinetics of a novel anti-c-Met antibody–drug conjugate, SHR-A1403, in rodents and non-human primates. *Xenobiotica* **2019**, *49*, 1097–1105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Saad, O.M.; Shen, B.Q.; Xu, K.; Khojasteh, S.C.; Girish, S.; Kaur, S. Bioanalytical approaches for characterizing catabolism of antibody–drug conjugates. *Bioanalysis* **2015**, *7*, 1583–1604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Mandler, R.; Kobayashi, H.; Hinson, E.R.; Brechbiel, M.W.; Waldmann, T.A. Herceptin–Geldanamycin Immunoconjugates: Pharmacokinetics, Biodistribution, and Enhanced Antitumor Activity. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 1460–1467. [[CrossRef](#)]
98. Journal, A.I.; Gong, J.; Guo, F.; Cheng, W.; Fan, H.; Miao, Q. Preliminary biological evaluation of 123I-labelled anti-CD30-LDM in CD30-positive lymphomas murine models. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2020**, *48*, 408–414. [[CrossRef](#)]
99. Boswell, C.A.; Mundo, E.E.; Zhang, C.; Bumbaca, D.; Valle, N.R.; Kozak, K.R.; Fourie, A.; Chuh, J.; Koppada, N.; Saad, O.; et al. Impact of drug conjugation on pharmacokinetics and tissue distribution of Anti-STEAP1 antibody–drug conjugates in rats. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 1994–2004. [[CrossRef](#)]
100. Herbertson, R.A.; Tebbutt, N.C.; Lee, F.T.; MacFarlane, D.J.; Chappell, B.; Micallef, N.; Lee, S.T.; Saunder, T.; Hopkins, W.; Smyth, F.E.; et al. Phase I biodistribution and pharmacokinetic study of Lewis Y-targeting immunoconjugate CMD-193 in patients with advanced epithelial cancers. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 6709–6715. [[CrossRef](#)]
101. Shen, B.-Q.; Bumbaca, D.; Saad, O.; Yue, Q.; V Pastuskovas, C.; Cyrus Khojasteh, S.; Tibbitts, J.; Kaur, S.; Wang, B.; Chu, Y.-W.; et al. Catabolic Fate and Pharmacokinetic Characterization of Trastuzumab Emtansine (T-DM1): An Emphasis on Preclinical and Clinical Catabolism. *Curr. Drug Metab.* **2012**, *13*, 901–910. [[CrossRef](#)]
102. Alley, S.C.; Zhang, X.; Okeley, N.M.; Anderson, M.; Law, C.L.; Senter, P.D.; Benjamin, D.R. The pharmacologic basis for antibody–auristatin conjugate activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *330*, 932–938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Cohen, R.; Vugts, D.J.; Visser, G.W.M.; Stigter-Van Walsum, M.; Bolijn, M.; Spiga, M.; Lazzari, P.; Shankar, E.; Sani, M.; Zanda, M.; et al. Development of novel ADCs: Conjugation of tubulysin analogues to trastuzumab monitored by dual radiolabeling. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 5700–5710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Ilovich, O.; Qutaish, M.; Hesterman, J.Y.; Orcutt, K.; Hoppin, J.; Polyak, I.; Seaman, M.; Abu-Yousif, A.O.; Cvet, D.; Bradley, D.P. Dual-isotope cryoimaging quantitative autoradiography: Investigating antibody–drug conjugate distribution and payload delivery through imaging. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59*, 1461–1466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Muns, J.A.; Montserrat, V.; Houthoff, H.; Codée-van der Schilden, K.; Zwaagstra, O.; Sijbrandi, N.J.; Merkul, E.; Van Drogen, G.A.M.S. In vivo Characterization of Platinum(II)-base linker Technology for the Development of Antibody–Drug Conjugates: Taking Advantage of Dual Labeling with. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59*, 1146–1152. [[CrossRef](#)]
106. An, B.; Zhang, M.; Pu, J.; Shen, S.; Qu, Y.; Chen, Y.; Huo, S.; Wang, X.; Polli, J.R.; Balthasar, J.P.; et al. High-throughput, sensitive LC-MS quantification of biotherapeutics and biomarkers using an antibody-free, peptide-level multiple-mechanism enrichment via strategically regulated pH, ionic and solvent strengths The Department of Pharmaceutical Sciences. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 3475–3483. [[CrossRef](#)]

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Titre :** Antibody-Drug Conjugates (ADCs) : apport du double marquage tritium et carbone 14 et de la radio-imagerie duale pour la production de données quantitatives *in vivo*.

**Mots clés :** bioconjugués ; double marquage ; radio-imagerie ; pharmacocinétique ; biodistribution.

**Résumé :** Les Antibody-Drug Conjugates (ADCs) sont une classe de thérapies ciblées émergentes qui révolutionnent le traitement de certains cancers. Cependant, la fenêtre thérapeutique de nombreux ADCs reste étroite, ce qui nécessite des efforts supplémentaires pour améliorer leur efficacité. Le développement d'un ADC efficace exige i) l'optimisation des éléments de conception, y compris le nombre de molécules thérapeutiques par anticorps, les positions de conjugaison et la stabilité du lien entre le médicament et l'anticorps, combinés à ii) une compréhension approfondie de sa pharmacocinétique, de sa biodistribution dans l'ensemble du corps et du ciblage tumoral. En raison de leur composition unique, de leur nature hétérogène et de leur capacité à subir des

transformations *in vivo*, de multiples méthodes analytiques reposant sur les techniques utilisées pour les molécules biologiques et les petites molécules sont utilisées pour la caractérisation et la quantification des ADCs. Pour simplifier l'analyse des ADCs, nous envisageons une méthode polyvalente basée sur le double radiomarquage des conjugués, qui permet de distinguer le médicament et son vecteur respectivement marqué au  $^3\text{H}$  et au  $^{14}\text{C}$ . Ce double marquage permettrait à la fois i) de mesurer simultanément la concentration du médicament et de son vecteur en circulation, évaluant ainsi la stabilité des ADC, et ii) de quantifier simultanément la quantité de médicament et d'anticorps dans les différents organes et tissus ciblés par double radio-imagerie.

**Title :** Antibody-Drug Conjugates (ADCs) : contribution of double tritium and carbon 14 labeling and dual radio-imaging to produce quantitative data *in vivo*.

**Keywords :** bioconjugués ; dual labeling ; radio-imaging ; pharmacokinetics ; biodistribution.

**Abstract :** Antibody-Drug Conjugates (ADCs) are an emerging class of targeted-therapeutics that are revolutionizing the treatment of cancers by optimizing distribution of potent cytotoxic drugs to target cells and tissues. However, the therapeutic window of many ADCs in clinical or preclinical studies remains narrow, requiring further efforts to enhance their efficacy. The development of an effective ADC requires i) the optimization of design elements including drug-to-antibody ratio (DAR), positions of conjugation and stability of the linker between the drug and the antibody, combined to ii) an extensive understanding of its pharmacokinetics, whole-body biodistribution and tumor targeting. Because of their unique composition, heterogeneous nature, and

ability to undergo further dynamic changes *in vivo*, multiple bioanalytical methods which rely on techniques used for biologics and small molecule drugs are used for the characterization and quantification of ADCs. To simplify the bioanalysis of ADCs we are considering a versatile method based on the dual radiolabeling of conjugates, which allows to distinguish the drug and its vector respectively labeled by  $^3\text{H}$  and  $^{14}\text{C}$ . This dual labeling would enable both i) to measure simultaneously the concentration of drug and its carrier in circulation, thus evaluating ADCs stability and to ii) simultaneously quantify the amount of drug and antibody within the different organs and targeted tissues through dual radio-imaging.