



HAL
open science

Évaluation in vivo de molécules biologiques mono ou bi-spécifiques dérivées des anticorps monocaténaire de lama (nanobodies) : étude portant sur leurs capacités à moduler les activités biologiques ou à induire la déplétion cellulaire

Henri Gondé

► To cite this version:

Henri Gondé. Évaluation in vivo de molécules biologiques mono ou bi-spécifiques dérivées des anticorps monocaténaire de lama (nanobodies) : étude portant sur leurs capacités à moduler les activités biologiques ou à induire la déplétion cellulaire. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2023. Français. NNT : 2023NORMR024 . tel-04200129

HAL Id: tel-04200129

<https://theses.hal.science/tel-04200129>

Submitted on 8 Sep 2023

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.



Normandie Université



THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Evaluation in vivo de molécules biologiques mono ou bi-spécifiques dérivées des anticorps monocaténaires de lama (nanobodies) : étude portant sur leurs capacités à moduler les activités biologiques ou à induire la déplétion cellulaire

**Présentée et soutenue par
HENRI GONDE**

**Thèse soutenue le 06/07/2023
devant le jury composé de**

MME VALERIE GOUILLEUX-GRUART	MAITRE DE CONFERENCES HDR, UNIVERSITE DE TOURS	Rapporteur du jury
M. PIERRE LAFAYE	DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSTITUT PASTEUR	Rapporteur du jury
MME LAURENCE GUGLIELMI	MAITRE DE CONFERENCES, UNIVERSITE DE MONTPELLIER	Membre du jury
MME SOPHIE CANDON	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., Université de Rouen Normandie	Président du jury
M. SAHIL ADRIOUCH	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M. OLIVIER BOYER	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., Université de Rouen Normandie	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par SAHIL ADRIOUCH (PHYSIOPATHOLOGIE, AUTOIMMUNITE ET IMMUNOTHERAPIE) et OLIVIER BOYER (PHYSIOPATHOLOGIE, AUTOIMMUNITE ET IMMUNOTHERAPIE)



Normande de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier le Professeur Sophie Candon de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse, le Docteur Pierre Lafaye et le Docteur Valérie Gouilleux-Gruart pour avoir accepté d'être rapporteurs, ainsi que le Docteur Laurence Guglielmi pour avoir accepté d'être examinatrice.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude au Professeur Olivier Boyer. Vous m'avez accueilli dans votre laboratoire avec bienveillance et m'avez permis de m'y épanouir. Je vous remercie pour m'avoir soutenu et conforté dans mes choix professionnels. Merci également pour les échanges, scientifiques ou non, que nous avons eus ensemble, et que je l'espère, nous aurons encore.

Un remerciement chaleureux au Professeur Sahil Adriouch. C'était frustrant pour moi, au moins autant que pour toi, d'avoir fait cette thèse à temps partiel. Malgré cela, je crois que ces cinq années passées à tes côtés m'ont permis de me forger comme scientifique. Merci infiniment pour cela. Je te remercie également de m'avoir transmis ta passion pour la science et de m'avoir montré que, malgré la pression, on peut travailler avec bonne humeur et esprit d'équipe.

Un grand merci à l'équipe du laboratoire 1234. C'est un plaisir d'évoluer à vos côtés. J'ai une pensée particulière pour Romain, Mélanie, Allan, Marine et Gaëtan, avec qui nous avons passé des bons moments, mais aussi des moins bons. Ceux qui consolident les liens. Merci également pour votre aide technique et scientifique tout au long de ce projet.

Je voudrais remercier l'équipe de la Pharmacie du CHU et notamment le Professeur Rémi Varin, pour ton appui dans mon projet hospitalo-universitaire et ta positivité au quotidien. Merci également à mes confrères pharmaciens et amis, Charles, Charlotte et Damien.

J'adresse des remerciements tout particuliers à ma famille. Delphine, pour me faire l'honneur de partager ma vie, mais également pour ton courage. Je fais des choix de carrière qui impactent notre vie personnelle et pourtant tu tiens le coup. Louise, Margot et Judith, papa vous aime fort.

Enfin j'ai une pensée émue pour toi Maman. Toi qui es partie pendant la rédaction de ce manuscrit. J'espère que là-haut tu te reposes enfin.

« Il ne saurait exister pour la science de vérité acquise. Le savant n'est pas l'homme qui fournit les vraies réponses ; c'est celui qui fournit les vraies questions. »

Claude Lévi-Strauss

Sommaire

Liste des tableaux	1
Liste des figures	1
Liste des abréviations	3
Partie 1 : Les immunoglobulines.....	4
A. Isotypes et allotypes	4
I. Isotypes.....	4
II. Allotypes	5
1. Chez l'homme.....	5
2. Chez la souris.....	6
B. Structure des IgG.....	6
I. Structure générale.....	6
1. Organisation en domaines.....	6
2. Repliement immunoglobuline	8
II. Région Fab	11
1. Domaines constants CH1 et CL.....	11
2. Domaines variables VH et VL.....	14
III. Région Fc	15
1. Domaines constants CH2 et CH3	15
a) Domaine CH2	15
b) Domaine CH3	18
2. Région charnière.....	20
a) Ponts disulfures inter-chaînes lourdes	21
b) Flexibilité	22
Partie 2 : Mécanismes effecteurs.....	25
A. La cytotoxicité dépendant du complément	26
I. Le système du complément	26
II. Oligomérisation des IgG	28
III. Sites d'interaction.....	29
B. Mécanismes effecteurs dépendant des récepteurs aux fragments Fc	31
I. Récepteurs aux fragments Fc	31
1. Récepteurs activateurs et inhibiteurs	31
2. Profil d'expression.....	33
3. Sites d'interaction avec les FcγR	36

II.	ADCC et ADCP	37
1.	ADCC	37
2.	ADCP.....	38
III.	Le récepteur au fragment Fc néonatal	40
C.	Facteurs influençant les mécanismes effecteurs	42
I.	L'anticorps.....	42
1.	Sous-classe.....	42
2.	Affinité de l'anticorps.....	45
3.	Glycosylation.....	46
a)	Sialylation	46
b)	Afucosylation.....	46
II.	L'antigène.....	47
1.	La densité de l'antigène	47
2.	L'épitope.....	48
3.	La distance entre l'épitope et la membrane plasmique.....	50
4.	La localisation dans les radeaux lipidiques	52
5.	Modulation antigénique	53
Partie 3 :	Les nanobodies	54
A.	Les IgG des camélidés	54
B.	Structure des VHH	55
C.	Propriétés des nanobodies	57
I.	Affinité et spécificité	57
II.	Faible immunogénicité	58
I.	Modularité	59
II.	Accessibilité à des épitopes inaccessibles aux anticorps conventionnels	60
D.	Nanobodies anti-P2X7 et anti-ARTC2.2	61
I.	Le récepteur P2X7 et l'ectoenzyme ARTC2.2.....	61
II.	Nanobodies anti-P2X7	65
III.	Nanobodies anti-ARTC2.2.....	66
IV.	Constructions basées sur les nanobodies anti-P2X7 et anti-ARTC2.2.	66
V.	La méthodologie AAV nanobodies	69
1.	Les vecteurs AAV.....	69
2.	La méthodologie AAVnano.....	72
Objectifs	75
Résultats	76

A. Article original: « A Methodological Approach Using rAAV Vectors Encoding Nanobody-Based Biologics to Evaluate ARTC2.2 and P2X7 <i>In Vivo</i> . ».....	76
Contexte de l'étude	76
Principaux résultats.....	76
B. Manuscrit: « Nanobody-based biologics induce specific and efficient <i>in vivo</i> depletion of cells expression P2X7 and/or ARTC2.2. »	94
Contexte de l'étude	94
Principaux résultats.....	94
Discussion générale.....	146
Approche basée sur les vecteurs AAV	147
Étude de la capacité des nanobodies à moduler des activités biologiques	148
Etude de la capacité des nanobodies à induire la déplétion cellulaire.....	152
C. Limites du modèle.....	159
Références bibliographiques	162
Annexe	189

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des nanobodies anti-P2X7 en fonction de leur capacité à moduler (augmenter ou bloquer) ou non l'activité de P2X7.

Tableau 2 : Classification des nanobodies anti-ARTC2.2 en fonction de leur capacité à bloquer ou non l'activité d'ARTC2.2.

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique d'une IgG

Figure 2 : Domaines immunoglobulines des anticorps.

Figure 3 : Alignement des séquences des chaînes légères κ et λ humaines et de souris.

Figure 4 : Alignement des séquences des domaines CH1 humains et de souris.

Figure 5 : Structure tridimensionnelle de la région Fab des IgG.

Figure 6 : Alignement des séquences des domaines CH1 humains et de souris.

Figure 7 : Structure des N-glycanes retrouvés sur le résidu asparagine 297 de la région CH2 des IgG.

Figure 8 : Alignement des séquences des domaines CH3 humains et de souris.

Figure 9 : Structure tridimensionnelle d'un fragment Fc illustrant les interactions entre l'homodimère CH3 et entre les régions CH2 et CH3

Figure 10 : Alignement des séquences des régions charnières des IgG humaines et de souris.

Figure 11 : Structure tri-dimensionnelle d'une IgG illustrant la flexibilité de la région charnière.

Figure 12 : Mécanismes effecteurs qui sont susceptibles d'être engagés par la partie Fc des anticorps.

Figure 13 : Voie classique du complément initiée par la fixation des IgG.

Figure 14: Structure tri-dimensionnelle d'une IgG illustrant les zones d'interaction avec le C1q et la zones d'interaction Fc-Fc après fixation de l'antigène à la surface cellulaire.

Figure 15 : Expression des Fc γ R humains et murins.

Figure 16 : Structure tridimensionnelle d'une IgG illustrant la zone d'interaction entre les IgG et les FcγR.

Figure 17 : Affinité des sous-classes d'IgG humaines et de souris pour les FcγR.

Figure 18 : Illustration de l'effet de l'épitope sur l'orientation de l'anticorps avec l'exemple d'anticorps anti-CD20

Figure 19 : Représentation schématique des IgG présentes dans le sérum des camélidés.

Figure 20 : Structure tri-dimensionnelle d'un VHH

Figure 21 : Structure tri-dimensionnelle d'un VHH interagissant avec le lysozyme.

Figure 22 : Structure tridimensionnelle de P2X7 et représentation schématique de l'activation de P2X7 par l'ATP.

Figure 23 : Structure tridimensionnelle d'ARTC2.2 et représentation schématique de l'activation de P2X7 par ARTC2.2

Figure 24 : Représentation schématique des constructions biologiques basées sur les nanobodies utilisées dans ce projet

Figure 25 : Modulation de l'activité d'ARTC2.2 et de P2X7 par des constructions biologiques basées sur les nanobodies.

Figure 26 : Mécanisme de transduction des rAAV.

Figure 27 : Comparaison entre l'injection répétée de molécules chimiques ou d'anticorps/nanobodies et la méthodologie AAVnano

Liste des abréviations

AAP : protéine activant l'assemblage
ADCC: cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
ADCP: phagocytose cellulaire dépendante des anticorps
ATP: adénosine 5'-triphosphate
ART : ADP-ribosyltransférase
CDC : cytotoxicité dépendante du complément
CDR : région déterminant la complémentarité
CH : domaine constant de la chaîne lourde des anticorps
CL : domaine constant de la chaîne légère des anticorps
DimHLE: dimer half-life extended (forme dimérique liée à un nanobody anti-albumine)
Fab : fragment antigen binding
Fc : fragment cristallizable
FcR: récepteur aux fragments Fc
FcRn: Fc récepteur néonatal
FR : region charpente
Gm : marqueur gamma
GPI: glycosylphosphatidylinositol
HcAb: anticorps à chaîne lourde
HEK: human embryonic kidney
Ig : immunoglobuline
Inter H-H : pont disulfure liant les deux chaînes lourdes
Inter H-L : pont disulfure liant la chaîne légère à la chaîne lourde
ITAM: Motif d'activation des récepteurs immunologiques contenant des tyrosines
ITIM: Motif d'inhibition des récepteurs immunologiques contenant des tyrosines
ITR: séquence terminales répétées
Km: marqueur kappa
LT CD8⁺ : lymphocytes T CD8⁺
MFI: intensité moyenne de fluorescence
mIg : immunoglobuline de souris
NAD : nicotine adénine dinucléotide
NICD : mort cellulaire induite par le NAD⁺
NK: natural killer
rAAV: virus adéno-associé recombinant
SDR: specificity-determining residues
SIRP α : signal regulatory protein α
Tconvs : lymphocytes T conventionnels CD4⁺CD25⁻
Tfh: lymphocytes T follicular helper
Tregs: lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺
Trm: lymphocytes T résidents mémoire
VH : domaine variable de la chaîne lourde
VHH: domaine variable des anticorps à chaîne lourde des camélidés
VL : région variable de la chaîne lourde

Partie 1 : Les immunoglobulines

A. Isotypes et allotypes

I. Isotypes

Les premières études sur la structure des immunoglobulines se sont basées sur une approche consistant à scinder la molécule. En 1959, Gerald Edelman a montré que la réduction des ponts disulfures de gammaglobulines en présence d'agents dénaturants entraîne la dissociation des molécules en morceaux de taille inférieure, que nous savons aujourd'hui être les chaînes lourdes et les chaînes légères (Edelman, 1959).

Les IgG sont les immunoglobulines plus abondantes dans le sérum humain, représentant 75% des immunoglobulines et tous les anticorps monoclonaux commercialisés sont d'isotype IgG (Schroeder and Cavacini, 2010; Walsh and Walsh, 2022). Les IgG sont divisées en quatre sous-classes chez l'homme, IgG1 (67% des IgG), IgG2 (22%), IgG3 (7%) et IgG4 (4%), arborant une chaîne lourde respectivement $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ ou $\gamma 4$.

Chez la souris *Mus Musculus*, quatre sous-classes d'IgG sont également présentes : mIgG1, mIgG2a/c, mIgG2b et mIgG3 (le préfixe m sera utilisé dans ce manuscrit pour désigner les sous-classes murines). Les sous-classes mIgG1, mIgG3 et mIgG4 sont retrouvées dans toutes les souches de souris consanguines, au contraire des mIgG2a/c. Les souris consanguines BALB/c, DBA2 et NMRI expriment des mIgG2a, tandis que les souris C57BL/6 et SJL expriment des mIgG2c (Zhang *et al.*, 2012). Les séquences d'acides aminés de mIgG2a et de mIgG2c présentent 16% de différence (Martin *et al.*, 1998). La répartition entre les sous-classes d'IgG varie entre les souches de souris consanguines. Chez la souris BALB/c, la sous-classe la plus abondante est mIgG1, puis mIgG2a, mIgG2b et mIgG3. Dans la souris C57BL/6, mIgG2b semble être la sous-classe prépondérante, mIgG1 et mIgG3 ont des titres similaires et mIgG2c est la sous-classe la moins abondante (Honjo *et al.*, 2012; Klein-Schneegans *et al.*, 1989). Des différences ont également été observées au sein de la même souche. Les souris C57BL/6J (Jackson Laboratory) ont un titre deux fois plus faible de mIgG2b par rapport aux souris C57BL/6Nhsd (Envigo) (Jones *et al.*, 2019).

Les chaînes légères sont d'isotype κ ou λ . Chez l'humain et la souris, les gènes codant pour la chaîne κ et la chaîne λ sont localisés sur deux chromosomes différents et le réarrangement du locus κ précède celui du locus λ (Collins and Watson, 2018; Hieter *et al.*, 1981). Le ratio $\kappa:\lambda$ est variable selon les espèces, 20:1 chez l'homme et 2:1 chez la souris (Montaño and Morrison, 2002).

II. Allotypes

1. Chez l'homme

Chez l'homme, il existe un important polymorphisme des sous-classes d'immunoglobulines. Ces variations alléliques (allotypes), qui peuvent différer entre les individus et entre groupes ethniques, correspondent à des variations d'acides aminés détectés par des tests sérologiques (Lefranc and Lefranc, 2012). Pour les IgG, elles peuvent concerner la région constante des chaînes lourdes $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ et/ou celle de la chaîne légère κ (Jefferis and Lefranc, 2009). Les allotypes exprimés sur la chaîne lourde sont désignés par le terme Gm (« *Gamma marker* ») dans lequel la sous-classe est mentionnée (par exemple, G1m désigne un allotype de la chaîne lourde $\gamma 1$, G3m un allotype de $\gamma 3$). La désignation du phénotype se fait par un suffixe qui peut consister en un système alphabétique ou numérique selon les auteurs. Les principales formes alléliques d'IgG1 sont G1m17,1, G1m3 et G1m3,1. Le phénotype G1m3 est uniquement retrouvé dans les populations caucasiennes alors que G1m3,1 est commun dans les populations orientales (Vidarsson *et al.*, 2014). G1m3 et G1m17 diffèrent par le résidu 214 dans la région CH1, qui est respectivement une arginine ou une lysine, alors que G1m1 est corrélé avec la présence d'un résidu D356 et L358 dans la région CH3 (Jefferis and Lefranc, 2009). Les chaînes lourdes des IgG2 peuvent exprimer l'allotype G2m23 qui corrèle avec la présence d'un résidu M282 dans la région CH2 et d'un résidu T189 dans la région CH1 contrairement à l'allotype G2m(..) et aux autres sous-classes d'IgG qui possèdent une proline en position 189. L'allotypie des IgG3 est plus complexe. Pour cette sous-classe, une dizaine d'allotypes ont été décrits sérologiquement, correspondant à des variations d'acides aminés des régions CH1, CH2 et CH3, et l'analyse ultérieure des séquences d'ADN a mis en évidence qu'un même phénotype pouvait être codé par plusieurs allèles différents. Le polymorphisme des IgG3 concerne également la région charnière qui peut être codée par 2 à 5 exons,

contrairement aux autres sous-classes d'immunoglobulines, résultant en une séquence protéique de 27 à 83 acides aminés (Dard *et al.*, 1997).

Utilisant un modèle similaire à celui des chaînes lourdes, le polymorphisme des chaînes légères κ est désigné Km (« *Kappa marker* ») et la désignation du phénotype se fait par système numérique. Le phénotype Km1 est corrélé des résidus valine en position 153 et leucine en position 191, le phénotype Km1,2 avec une A153 et L191, et Km3 avec une A153 et une V191 (Jefferis and Lefranc, 2009).

2. Chez la souris

Il a été initialement suggéré que les mIgG2a et mIgG2c sont deux isotypes distincts. Selon cette hypothèse, les gènes *Igh-1a* et *Igh-1b*, codant respectivement pour mIgG2a et mIgG2c, sont organisés en tandem sur deux loci différents du même chromosome et l'expression de mIgG2a ou de mIgG2c dans les souches de souris consanguines résultent d'un mécanisme de délétion génique (Jouvin-Marche *et al.*, 1989; Morgado *et al.*, 1989). Plus récemment, le séquençage des régions codantes des gènes *Igh-1a* et *Igh-1b* a permis d'identifier qu'ils sont situés sur le même locus et qu'ainsi mIgG2a et mIgG2c sont deux allotypes, bien que les deux gènes puissent coexister sur le même chromosome dans certaines souches de souris (Zhang *et al.*, 2012).

B. Structure des IgG

I. Structure générale

1. Organisation en domaines

En 1969, Gerald Edelman *et al.* décrivaient la première séquence d'acides aminés complète d'une IgG1 humaine (Edelman *et al.*, 1969). Ces travaux posaient les bases de la connaissance actuelle de la structure moléculaire des immunoglobulines. Les anticorps sont des hétérotétramères polypeptidiques formés par deux chaînes lourdes identiques d'environ 50 Kda et deux chaînes légères identiques d'environ 25 Kda. Les chaînes lourdes et les chaînes légères possèdent chacune une partie constante, dénommées respectivement CH (« *constant heavy* ») et CL (« *constant light* »). La partie CH peut être divisée en trois domaines de longueur

similaire : CH1, CH2 et CH3. Les domaines CH1 et CH2 sont liées par une région polypeptique « extra-domaine », dénommée région charnière. Les domaines variables sont dénommés respectivement VH (« *variable heavy* ») et VL (« *variable light* ») pour les chaînes lourdes et les chaînes légères.

Dans une étude publiée en 1959, Rodney Porter relatait l'utilisation de la papaïne pour cliver des gammaglobulines de lapin en trois fragments. Les fractions I et II conservent la capacité de fixation à l'antigène et sont similaires en termes de poids moléculaire et de spécificité antigénique. Le fragment III est extrêmement stable et peut être facilement cristallisé (Porter, 1959). Les fragments I et II identifiés par Rodney Porter, ayant la capacité de fixer l'antigène, sont dénommés Fab (« *fragment antigen binding* »). Le fragment III, facilement cristallisable est dénommé Fc (« *fragment cristallizable* »).

Le Fab est formé par l'appariement de VL et CL de la chaîne légère avec VH et CH1 de la chaîne lourde, le Fc par l'appariement des régions charnières, CH2 et CH3 des deux chaînes lourdes. Les IgG contiennent un pont disulfure intra-chaîne dans chacun des domaines et des ponts disulfures inter-chaînes liant les chaînes légères et les chaînes lourdes (inter H-L), et liant les deux chaînes lourdes au niveau de la région charnière (inter H-H) (Figure 1).

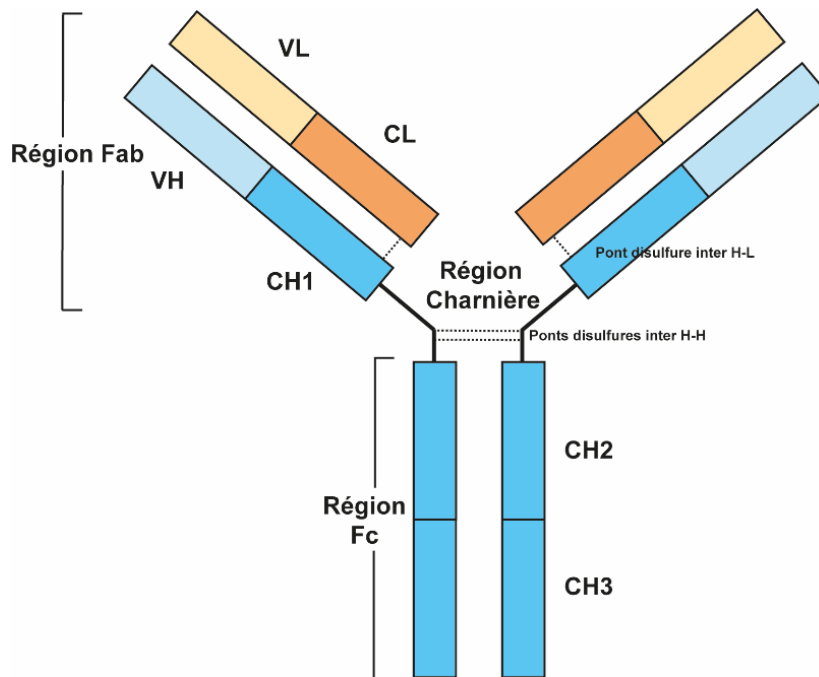


Figure 1 : Représentation schématique d'une IgG. Les chaînes lourdes sont colorées en bleu, les chaînes légères en orange. Les ponts disulfures sont indiqués par des traits en pointillés.

La comparaison de séquences protéiques, notamment celles des immunoglobulines, requiert un système de numérotation des résidus d'acides aminés. Dans ce manuscrit, le système utilisé pour la région charnière, CH2 et CH3 est la numérotation EU (Edelman *et al.*, 1969). Pour la région Fab (CL et VL, VH et CH1), la numérotation suivra la nomenclature Kabat (Kabat, 1991).

2. Repliement immunoglobuline

Les anticorps appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Les protéines de cette famille ont en commun au minimum un motif structural caractéristique, appelé repliement immunoglobuline, qui consiste en deux feuillets β antiparallèles superposés à la manière d'un « sandwich ». Les deux feuillets β sont stabilisés par un pont disulfure intra-chaîne unique et par des interactions non covalentes formées par les chaînes latérales des résidus d'acides aminés de chaque feuillet.

Le repliement immunoglobuline est classiquement constitué de sept brins β , désignés par une lettre de A à F, par ordre alphabétique de la séquence primaire de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. Chaque brin consiste en 5-10 acides aminés dont les chaînes latérales des acides aminés hydrophobes sont dirigées vers l'intérieur, entre les deux feuillets, et celles des acides aminés hydrophiles sont dirigées vers l'extérieur des feuillets. Entre ces brins, les résidus d'acides aminés forment des boucles plus « flexibles » (Bork *et al.*, 1994).

A partir du modèle général, il existe des variations des domaines immunoglobulines, portant notamment sur le nombre de brins au sein des domaines ainsi que l'association entre eux (Figure 2). Le domaine immunoglobuline type C (« Constant »), généralement compact, est retrouvé dans les domaines CL, CH1, CH2 et CH3 des anticorps. Ces domaines sont constitués de sept brins β , quatre brins (A, B, E, D) formant le premier feuillet et trois brins (C, F, G) formant l'autre. Le pont disulfure intra-chaîne connectant les deux feuillets est formé entre un résidu cystéine du brin B et un autre du brin F.

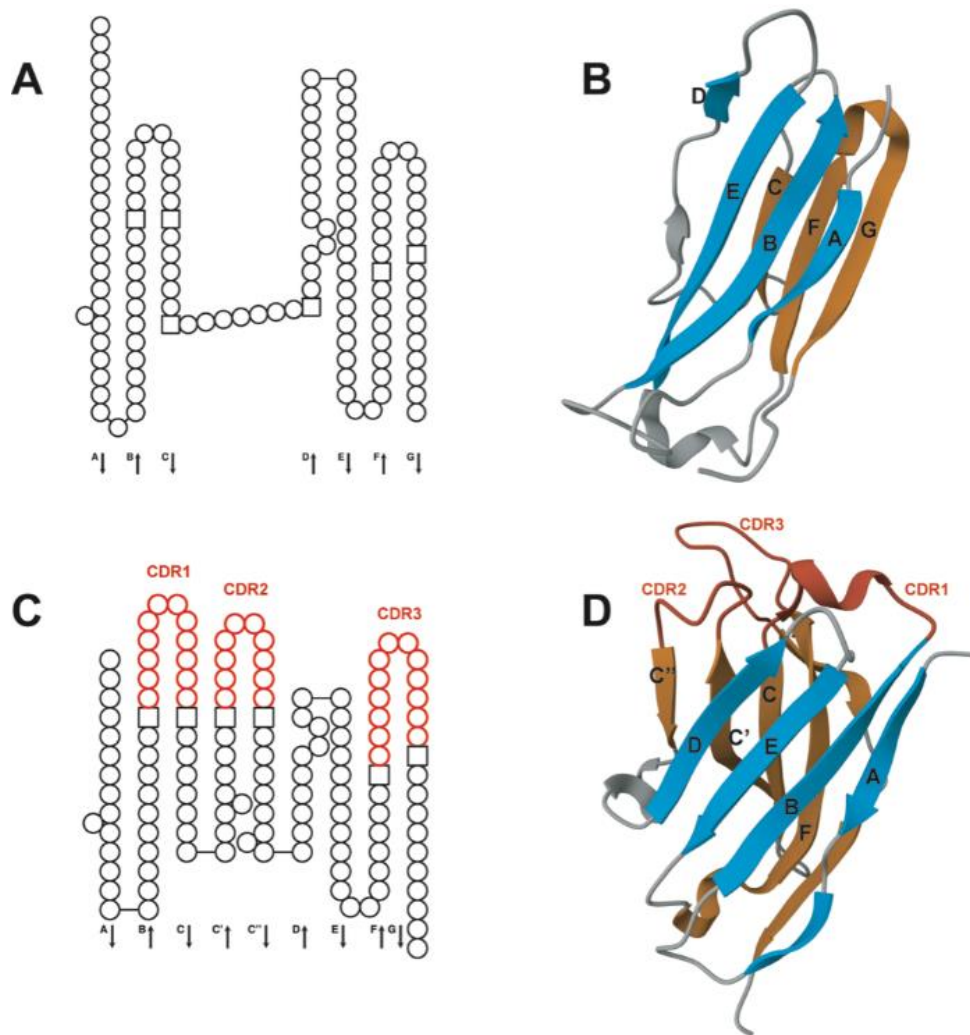


Figure 2 : Domaines immunoglobulines des anticorps. (A) Représentation en collier de perles du domaine immunoglobuline type C. (B) Diagramme en ruban d'une région CH1 illustrant le type C. (C) Représentation en collier de perles du domaine immunoglobuline type V. (D) Diagramme en ruban d'une région VL illustrant le type V (numéro d'accèsion PDB - *Protein data bank*- : 1DFB)

Les domaines immunoglobuline type V (« Variable »), retrouvés dans les régions VL et VH, ont une structure similaire aux domaines C mais comportent neuf brins β , les 2 brins additionnels par rapport au type C étant désignés C' et C''. Le premier feuillet est de la même façon que pour le type C, formé par les brins A, B, E, D alors que le second feuillet inclue les deux brins additionnels (C'', C', C, F, B). Le pont disulfure intra-chaîne est également formé entre les brins B et F. Les domaines immunoglobulines V sont généralement moins compacts que les domaines type C, avec des boucles plus grandes entre les feuillets β . Parmi celle-ci, les boucles BC, C'C'' et FG correspondent respectivement aux régions hypervariables (CDR :

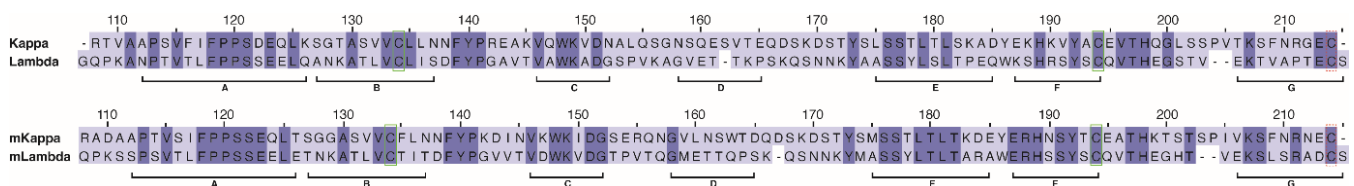
Complementarity Determining Regions) CDR1, CDR2 et CDR3 (CDR-H1, CDR-H2 et CDR-H3 pour les chaînes lourdes ; CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 pour les chaînes légères) (Natarajan *et al.*, 2015).

II. Région Fab

La région Fab des anticorps est formée par l'association de VL et CL de la chaîne légère avec VH et CH1 de la chaîne lourde. Cet appariement des deux chaînes concourt à la formation du paratope à l'extrémité N-terminale de l'anticorps.

1. Domaines constants CH1 et CL

Les IgG contiennent un pont disulfure intra-chaîne dans chacun des domaines et des ponts disulfures inter-chaînes liant les chaînes légères et les chaînes lourdes. L'alignement des séquences des chaînes légères κ et λ humaines et murines est présenté en [Figure 3](#), celui des domaines CH1 en [Figure 4](#).



[Figure 3](#) : [Alignement des séquences des chaînes légères \$\kappa\$ et \$\lambda\$ humaines et de souris](#). Les résidus d'acides aminés sont colorés selon le pourcentage d'identité sur chaque colonne. Les lettres correspondent aux feuillets β . Les résidus cystéine encadrés en vert sont engagés dans le pont disulfure intra-chaîne. Les résidus cystéine encadrés en pointillés rouges forment le pont disulfure inter-chaîne avec le domaine CH1. Numéros d'accession des séquences : P01834, P0CG04, P01837, P01843.

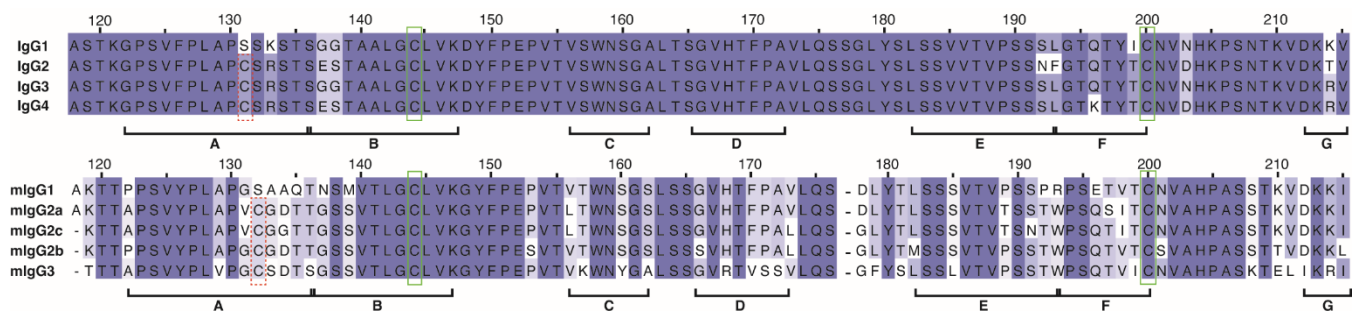


Figure 4 : Alignement des séquences des domaines CH1 humains et de souris. Les résidus d'acides aminés sont colorés selon le pourcentage d'identité sur chaque colonne. Les lettres correspondent aux feuillets β . Les résidus cystéine encadrés en vert sont engagés dans le pont disulfure intra-chaîne. Les résidus cystéine encadrés en pointillés rouges forment le pont disulfure inter-chaîne avec la chaîne légère. Numéros d'accèsion des séquences : P01857, P01859, P01860, P01861, P01868, P01863, A0A0A6YY53, P01867, P03987.

Une analyse de plusieurs Fabs arborant une chaîne légère κ ou λ a mis en évidence que des résidus impliqués dans l'appariement CH1-CL sont conservés quel que soit l'isotype de la chaîne légère, incluant F126, P127, L128, L145, F170 et P171 sur la chaîne lourde et F118, E123 et E124 sur la chaîne légère. Les auteurs pointent également l'importance du résidu 178 de la chaîne légère, qui est une thréonine dans les chaînes κ ou une tyrosine dans les chaînes λ humaines et murines, ce résidu étant situé dans une cavité entre CH1 et CL (Padlan *et al.*, 1986) (Figure 5).

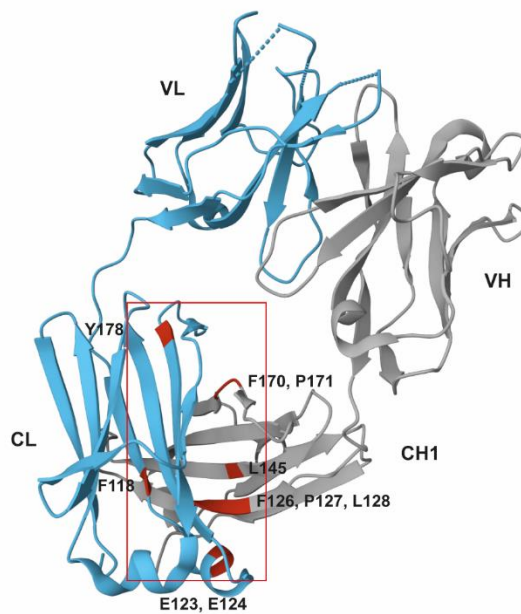


Figure 5 : Structure tridimensionnelle de la région Fab des IgG. Les résidus d'acides aminés colorés en rouge sont impliqués dans l'interaction CH1-CL (PDB : 5BQ7)

La chaîne légère joue un rôle important dans l'affinité de l'anticorps pour l'antigène. Des souris invalidées pour le gène *C γ 1* (codant pour le domaine CH1) ont été générées pour produire des IgG1 à chaîne lourde unique, dépourvues de chaînes légères. Ces souris produisent moins d'IgG1 que des souris *wild-type* avant et après immunisation par l'ovalbumine. Les IgG1 à chaîne lourde unique spécifiques de l'ovalbumine, identifiées par phage-display, ont une affinité plus faible pour l'ovalbumine par rapport à un anticorps monoclonal anti-OVA conventionnel (Zhang *et al.*, 2018).

Une différence entre les chaînes légères κ et λ est la position du résidu cystéine formant le pont disulfure inter H-L. Chez l'homme et chez la souris, il est le dernier résidu C-terminal pour les chaînes κ (C215) et l'avant-dernier pour les chaînes λ (C214). Le dernier résidu (215) des chaînes λ est une sérine. La présence de ce résidu augmente la susceptibilité du pont inter H-L à être réduit et dégradé par la chaleur ou le pH (Liu *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2013).

Les résidus cystéine 214 (λ) ou 215 (κ) interagissent avec une cystéine de la chaîne lourde, située dans le domaine CH1 pour les IgG2, IgG3 et IgG4 (position 131) et dans la région charnière pour les IgG1 (C220) pour former la liaison H-L. Chez la souris, le résidu cystéine impliqué est également situé dans la région charnière pour les mIgG1 (C219) et des résidus du domaine CH1 pour les mIgG2a/c, IgG2b et IgG3 (C132).

2. Domaines variables VH et VL

Les domaines VH et VL situés dans la région N-terminale respectivement de la chaîne lourde et la chaîne légère, sont associés de manière non covalente pour former le domaine de reconnaissance à l'antigène.

Les domaines variables différents présentent une identité de séquence d'environ 35% (Chothia *et al.*, 1998). La variabilité est la plus importante au sein des régions CDR dans VH et VL, qui représentent environ 25% des domaines variables (Chothia *et al.*, 1985). Les CDR sont espacés par des régions « charpentes » (FR : *Framework Regions*), numérotées de 1 à 4 de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale (FR1, FR2, FR3 et FR4). Une structure canonique des FR a été identifiée à partir d'une base de données de plus de 5000 domaines variables, comprenant 76 résidus dont 9 sont invariants (Chothia *et al.*, 1998).

Plusieurs études de mutagenèse dirigée ont suggéré que des résidus situés des régions FR à l'interface VL-VH éloignés du paratope peuvent influencer la fixation à l'antigène. Chatellier *et al.* ont réalisé des expériences de mutagenèse de résidus des régions FR de VL et de VH impliqués dans la formation de liaisons de Van der Waals. Les anticorps portant une des mutations Y91A, W104A ou G104A de la chaîne lourde ou L36A, L38A, F98A de la chaîne légère n'ont plus la capacité de fixer l'antigène. Les auteurs suggèrent que les résidus qui ne sont pas directement en contact avec l'antigène peuvent influencer la fixation par i. modification de la géométrie du paratope (repliement différent des domaines modifiant la forme d'un ou plusieurs CDR), ii. modification de la forme du paratope par modification de l'appariement VH-VL, iii. modification de la mobilité affectant la capacité du Fab à s'adapter à l'antigène (Chatellier *et al.*, 1996).

La troisième CDR de VH (CDR-H3) est la plus variable. Les domaines VH résultent de la recombinaison des gènes V_H , D et J_H . Le segment génique V_H code pour les résidus 1 à 94

qui inclue CDR-H1 et CDR-H2. CDR-H3 est formée par la fin du segment V_H, de D, et le début de J_H, participant à sa plus grande variabilité. Les domaines VL sont formés par la combinaison des segments géniques V_L et J_L. De la même façon que pour V_H, CDR-L1 et CDR-L2 sont codés par V_L alors que CDR-L3 est codé à la fois par les segments V_L et J_L (Chothia *et al.*, 1992).

Les résidus interagissant directement avec l'antigène sont dénommés résidus déterminant la spécificité (SDR : *specificity-determining residues*) qui diffèrent par leur nombre et leur localisation selon l'antigène reconnu. Par comparaison de 59 complexes anticorps-antigènes de structure connue, il a été identifié dans VL en moyenne 7 SDR pour les anticorps anti-protéines et anti-peptides, 5 pour les anti-haptènes. Dans VH, en moyenne 9.5, 10.2 et 7.1 SDR sont présents, respectivement pour les anticorps anti-protéines, anti-peptides et anti-haptènes. Les SDR sont distribués différemment selon la taille de l'antigène. Ils se situent principalement dans la région apicale des CDR pour les anticorps dirigés contre des protéines alors que pour les anticorps anti-haptènes ces résidus sont situés en dehors des boucles CDR, dans les feuillets β. Les SDR des anticorps anti-peptides ont un profil de distribution intermédiaire entre les anticorps anti-protéines et les anticorps anti-haptènes (Almagro, 2004).

III. Région Fc

1. Domaines constants CH2 et CH3

a) Domaine CH2

Le domaine CH2 est le seul domaine des anticorps qui présente des interactions inter-chaînes médiées par les chaînes latérales des acides aminés très faibles, contrairement aux interactions importantes qui se produisent entre les domaines VH-VL, CL-CH1 et CH3-CH3. L'homodimère Fc forme une structure en « fer à cheval », dans laquelle l'espace entre les deux domaines CH2 est occupé par les N-glycanes portés par les deux résidus asparagine 297 (Chiu *et al.*, 2019). La N-glycosylation de N297 est conservée entre les sous-classes d'IgG humaines et murines (Figure 6).

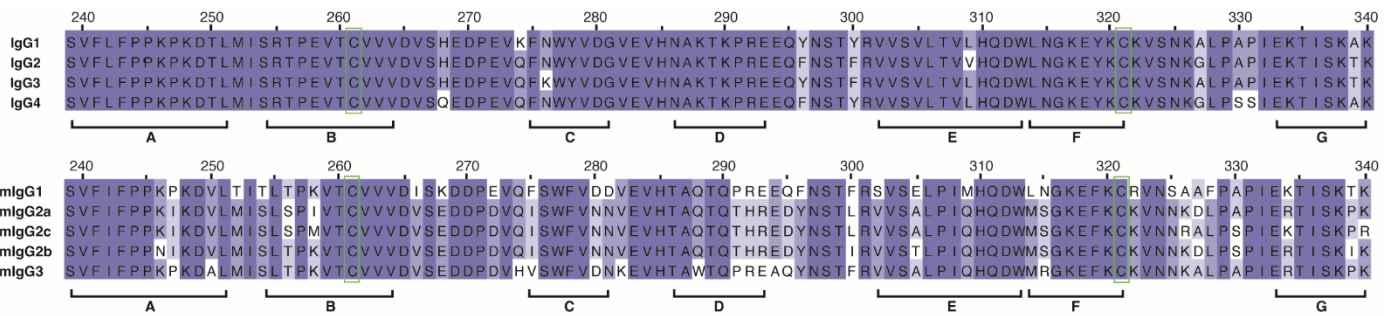


Figure 6 : Alignement des séquences des domaines CH2 humains et de souris. Les résidus d'acides aminés sont colorés selon le pourcentage d'identité sur chaque colonne. Les lettres correspondent aux feuillets β . Les résidus cystéine encadrés en vert sont engagés dans le pont disulfure intra-chaîne. Numéros d'accèsion des séquences : P01857, P01859, P01860, P01861, P01868, P01863, A0A0A6YY53, P01867, P03987.

Le motif glycane de base « biantennaire » est constitué de 7 unités saccharidiques : successivement 2 résidus N-acétylglucosamine et 1 résidu mannose liés de façon linéaire chacun par une liaison β 1,4 (Figure 7). Sur le premier résidu mannose, sont fixés deux autres résidus mannose, l'un par une liaison α 1,3 et l'autre par une liaison α 1,6. Sur chacun de ces résidus mannose est fixé un résidu N-acétylglucosamine. Cette structure est dite « biantennaire », avec d'un côté la branche α 1,3 et de l'autre la branche α 1,6.

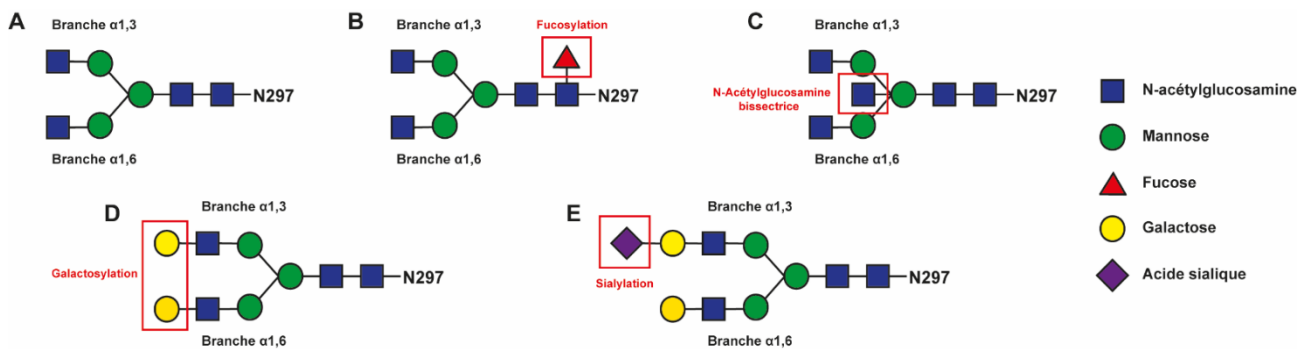


Figure 7 : Structure des N-glycanes retrouvés sur le résidu asparagine 297 de la région CH2 des IgG. (A) Motif de base. (B,C,D,E) : Modification du motif de base par : (B) ajout d'un résidu fucose sur le premier résidu N-acétylglucosamine, (C) ajout d'un résidu N-acétylglucosamine bissecteur, (D) ajout d'un ou deux résidu galactose sur les résidus N-acétylglucosamine des branches α 1,3 et ou α 1,6, (E) ajout d'un résidu acide sialique sur le bras α 1,3.

Ce motif de base peut être modifié par fucosylation correspondant à l'ajout d'un résidu fucose sur le 1^{er} résidu N-acetylglucosamine, par l'ajout d'un résidu N-acetylglucosamine « bissecteur » sur le premier résidu mannose, par l'ajout de résidus galactose sur le bras α 1,3 et/ou le bras α 1,6, et par sialylation, c'est-à-dire l'ajout de résidus acide sialique (acide N-acétylneuraminique) sur les résidus galactose par une liaison α 2,3 ou α 2,6 (Cobb, 2020; Reily *et al.*, 2019).

La composition des glycanes influence la structure quaternaire de la région Fc. Des analyses par RMN en solution ont mis en évidence que la branche α 1,6 est immobilisée par des interactions non covalentes avec la structure protéique de la région CH2 portant cette branche. Ces interactions glycanes-protéine stabilisent le Fc et contribuent à maintenir sa structure. La branche α 1,3 est plus dynamique, dirigée vers l'autre région CH2 interagissant avec l'autre bras α 1,3 de la chaîne opposée (Arnold *et al.*, 2007; Wormald *et al.*, 1997; Yamaguchi *et al.*, 1998).

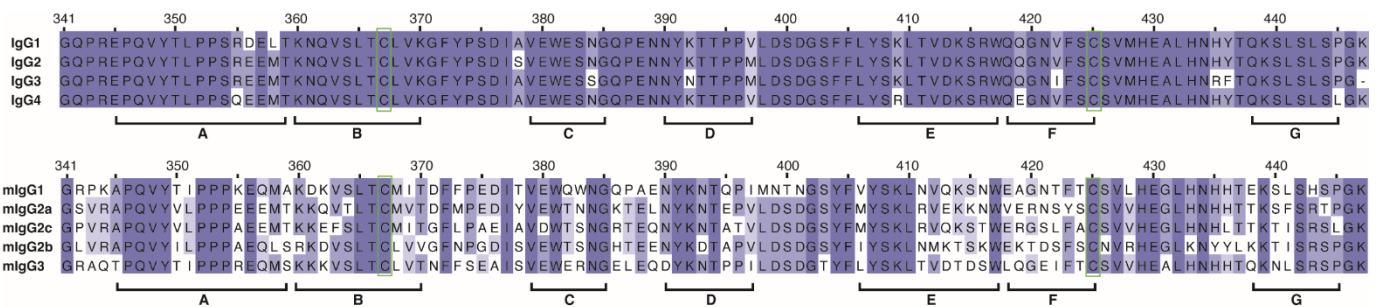
Selon la structure des glycanes, la conformation de l'homodimère Fc en « fer à cheval » peut être dans un état « ouvert », avec une distance maximale entre les deux régions ou dans un état « fermé » lorsque la distance est minimale (Krapp *et al.*, 2003). A titre d'exemple, la distance entre les domaines CH2 d'un Fc humain d'isotype IgG1 passe de 11.4 Å lorsque le glycanes est constitué uniquement d'un résidu N-acétylglucosamine à 36.1 Å lorsque le Fc porte des glycanes hybrides riches en résidus mannose (Ahmed *et al.*, 2014).

Chez l'homme, les caractéristiques de la N-glycosylation des fragments Fc incluent une faible proportion de monosialylation (5-17%), exclusivement sur le bras α 1,3, peu de disialylations (2-7%), une faible proportion de résidus N-acetylglucosamine bissecteurs, une proportion élevée de résidus fucose et une hétérogénéité dans la proportion de résidus galactose. La présence ou non de galactose définit les glycoformes G0 (agalactosylé), G1 (monogalactosylé, préférentiellement sur le bras α 1,6) et G2 (digalactosylé) (Dwek *et al.*, 1995; Wormald *et al.*, 1997). Chez la souris, le profil de N-glycosylation est de façon générale similaire à celui de l'homme, incluant la structure diantennaire, une forte proportion de glycanes fucosylés, et une proportion variable de résidus galactose (de Haan *et al.*, 2017). En revanche, il diffère par la nature de l'acide sialique. L'acide N-glycolyneuraminique est prépondérant chez la souris, alors qu'il est absent et immunogène chez l'homme (Okerblom and Varki, 2017).

Le N-glycome des souris C57BL/6 et BALB/c diffère peu, en comparaison des souris non consanguines CD-1 et Swiss Webster, une faible variation de la galactosylation et de la sialylation ayant été observée (de Haan *et al.*, 2017).

b) Domaine CH3

L'interaction non covalente entre les domaines CH3 est la première étape de l'assemblage des anticorps et le dimère CH3 est la principale interaction stabilisant les chaînes lourdes (Feige *et al.*, 2010). Le dimère CH3 est extrêmement robuste, la stabilité mécanique de l'homodimère CH3 étant plus élevée que beaucoup de complexes protéiques homo- ou hétérodimériques incluant l'interaction antigène-anticorps (Bertz *et al.*, 2013). L'appariement des séquences CH3 humaines et murines est présentée en [Figure 8](#).



[Figure 8 : Alignement des séquences des domaines CH3 humains et de souris.](#) Les résidus d'acides aminés sont colorés selon le pourcentage d'identité sur chaque colonne. Les lettres correspondent aux feuillets β . Les résidus cystéine encadrés en vert sont engagés dans le pont disulfure intra-chaîne. Numéros d'accès des séquences : P01857, P01859, P01860, P01861, P01868, P01863, A0A0A6YY53, P01867, P03987.

L'interface CH3/CH3 contient 16 résidus sur chaque domaine CH3 qui sont impliqués dans des contacts intermoléculaires. La contribution de ces résidus à la stabilité du dimère CH3 a été analysée par scannage d'alanine (*alanine scanning*). Les résidus identifiés ont une chaîne latérale hydrophobe (F405 et L368), polaire (T366 et Y407) ou chargée (K409). Les résidus T366 d'une chaîne et Y407 de l'autre forment une liaison hydrogène. Le résidu K409 forme également une liaison hydrogène avec le résidu D399 de l'autre chaîne. Les résidus L368 et F405 forment des contacts inter-chaînes et intra-chaînes par interactions de Van der Waals. Ces

résidus sont situés sur deux feuillets β intérieurs et forment un « patch » au centre de l'interface CH3-CH3 (Figure 9). La mutation P395A influe sur la stabilité de l'homodimère CH3 vraisemblablement par un effet sur la conformation de la structure, affectant les interactions moléculaires impliquant les résidus voisins (Dall'Acqua *et al.*, 1998).

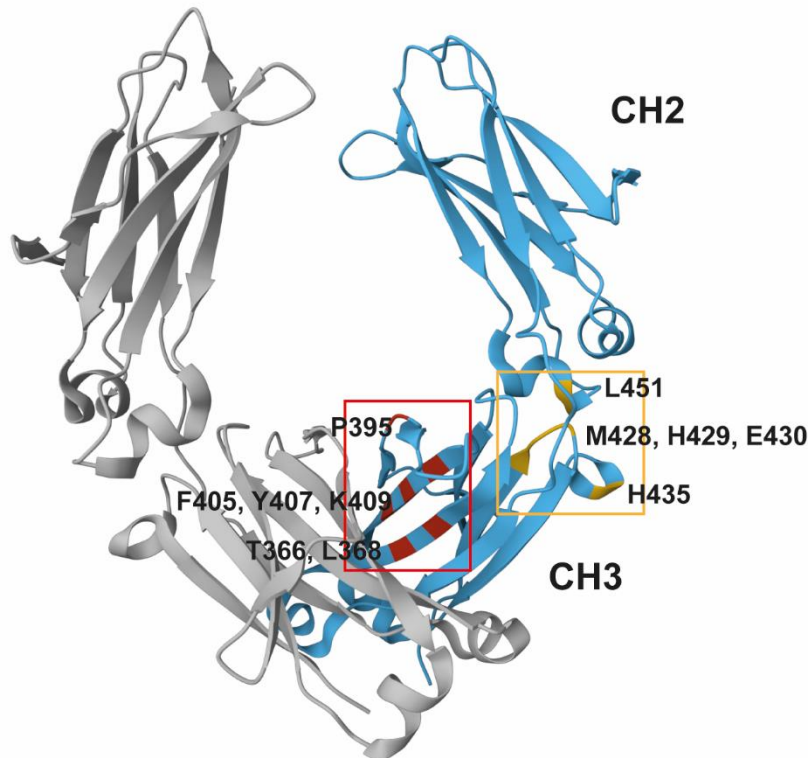


Figure 9 : Structure tridimensionnelle d'un fragment Fc illustrant les interactions entre l'homodimère CH3 et entre les régions CH2 et CH3. Les résidus en rouge sont impliqués dans l'interaction CH3-CH3 formant un « patch » au centre de l'interface. Les résidus en jaune sont impliqués dans l'interaction CH2-CH3 (« articulation en rotule ») (PDB : 4KUI).

Une analyse cristallographique de deux IgG2 et une comparaison de structures d'IgG1 ont permis de caractériser l'interface entre le domaine CH3 et le domaine CH2 de la même chaîne. Par analogie, le mouvement de CH2 relativement à CH3 se rapproche de celui d'une articulation sphérique en rotule (« *ball-and-socket joint* ») dans laquelle la chaîne latérale du résidu L251 de CH2 pivote dans une poche formée par les résidus M428, H429, E430 et H435 de CH3. La majorité de ces résidus sont conservés entre les sous-classes d'IgG chez l'homme et chez la souris, suggérant qu'il s'agit d'une propriété structurale générale de l'interface entre

ces domaines permettant de faciliter le mouvement de CH2 par rapport à CH3 (Teplyakov *et al.*, 2013).

La capacité des régions CH3 à stabiliser la chaîne lourde a été mise à profit pour le développement d'anticorps bispécifiques. Les mutations « *knob-into-hole* » consistent à remplacer un résidu d'acide aminé de petite taille par un acide aminé plus grand sur une chaîne (« *knob* »), et l'inverse sur la chaîne opposée (« *hole* ») pour faciliter l'hétérodimérisation de deux chaînes lourdes différentes. Dans cette stratégie, la formation d'homodimères est prévenue d'une part par encombrement stérique (« *knob* ») et d'autre part par suppression d'interactions non covalentes (« *hole* »). Une mutation T366Y d'une chaîne et Y407T de l'autre permet d'obtenir 95% d'anticorps bispécifiques anti-CD3/anti-CD4, par rapport à 57% sans mutations (Ridgway *et al.*, 1996). Une autre étude relate la combinaison des mutations S354C et T366W (« *knob* ») d'une chaîne et Y349C, T366S, L368A et Y407V de l'autre (« *hole* ») pour obtenir des anticorps bispécifiques. Ces mutations permettent d'obtenir également 95% de constructions bispécifiques (Merchant *et al.*, 1998).

2. Région charnière

La région charnière est la région polypeptidique située entre les domaines CH1 et CH2. Cette région « extra-domaine » n'est pas organisée en domaines immunoglobulines, lui permettant d'être un lien flexible entre le Fc et les deux Fabs.

La charnière haute est la région située entre l'extrémité N-terminale du domaine CH1 et le premier résidu cystéine impliqué dans la formation du pont inter H-L (IgG1 : résidu 216 à résidu 224) ([Figure 10](#)). La charnière centrale comprend les résidus cystéines formant les ponts entre les chaînes lourdes. Ces résidus sont entourés d'un nombre important de résidus proline conférant à la charnière centrale une structure secondaire en hélice polyproline, relativement inflexible. La charnière basse se situe entre les résidus 234 et 238, précédant le premier brin β du domaine CH2. Bien qu'elle soit codée par l'exon CH2, elle est associée à la région charnière car elle possède une structure désorganisée similaire (Brekke *et al.*, 1995; Deveuve *et al.*, 2019).

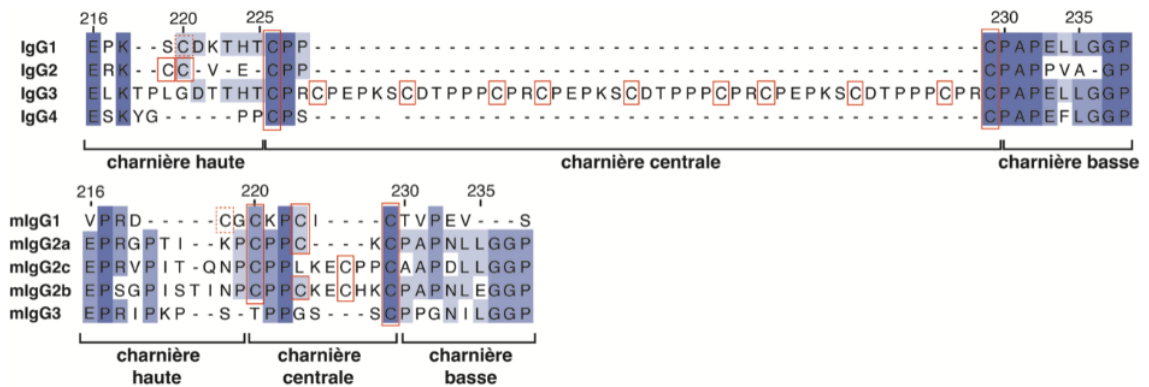


Figure 10 : Aligment des séquences des régions charnières des IgG humaines et de souris. Les résidus d'acides aminés sont colorés selon le pourcentage d'identité sur chaque colonne. Les résidus cystéine encadré en rouge forment les ponts disulfures inter H-H. Les résidus cystéine encadrés en pointillés rouges forment le pont disulfure inter H-L avec la chaîne légère. Numéros d'accès des séquences : P01857, P01859, P01860, P01861, P01868, P01863, A0A0A6YY53, P01867, P03987.

a) Ponts disulfures inter-chaînes lourdes

La charnière centrale est le site de liaisons des deux chaînes lourdes, par des ponts disulfures inter-chaînes (inter H-H). Le nombre et la position des ponts disulfures intra-chaînes entre les deux chaînes lourdes dépend de la sous-classe d'IgG.

Chez l'homme, les chaînes lourdes des IgG1 et IgG4 ont deux ponts disulfures formés par des résidus cystéine en positions 226 et 229.

Les IgG2 présentent plusieurs isoformes. L'isoforme « classique » IgG2-A présente quatre ponts disulfures inter-chaînes en positions 219, 220, 226 et 229. Les isoformes IgG2-A et IgG-A-B présentent 3 ponts disulfures inter H-H. Dans l'isoforme IgG2-A/B, une cystéine de la région charnière d'une des deux chaînes lourdes (position 219) n'est plus impliquée dans le pont inter H-H mais forme une liaison « non classique » avec la cystéine 231 dans la formation du pont inter H-L. Dans l'isoforme IgG-B, les cystéines 219 de chacune des chaînes lourdes participent à la liaison « non classique » H-L (Wypych *et al.*, 2008). L'isotype de la chaîne légère influence la cinétique de formation des isoformes d'IgG2, la formation d'IgG2-B à partir d'IgG2A/B étant plus rapide pour les IgG2 κ que pour les IgG2 λ (Liu *et al.*, 2013). Les

IgG2 peuvent également former des dimères par formation de cystines entre des résidus de la chaîne légère et/ou de la région charnière de deux molécules d'IgG2 (Yoo *et al.*, 2003).

La région charnière des IgG3 contient 11 ponts disulfures inter H-H. La séquence codée par l'exon a comporte 2 résidus cystéine et les séquences répétées codées par les exons b,c et d en contiennent 3 chacune. Dans certains allotypes d'IgG3, un, deux ou trois exons parmi b,c et d sont délétés, codant ainsi pour des régions charnières avec respectivement 8, 5 ou 2 liaisons disulfures H-H (Chu *et al.*, 2021). En revanche, il semblerait que les ponts disulfures des IgG3 ne forment pas de liaisons « non classiques » (Lakbub *et al.*, 2016).

Les IgG4 peuvent échanger entre elles leurs parties HC/LC *in vivo*, formant naturellement des anticorps bispécifiques. Lorsque des IgG4 dirigées contre l'allergène Betv1 et des IgG4 dirigées contre Feld1 sont injectés en quantité égale chez la souris *nude*, environ la moitié des IgG4 sont bispécifiques anti-Betv1 et anti-Feld1 dans le sérum 48h après injection (van der Neut Kolfschoten *et al.*, 2007). Ce phénomène, appelé échange du bras Fab (« *Fab arm exchange* »), semble être dû à un équilibre entre des cystines inter-chaînes (liaisons « classiques ») et intra-chaînes lourdes (« non classiques »). Cette liaison non « classique » est formée entre les résidus C226 et C299 de la même chaîne lourde (Moritz and Stracke, 2017). Les IgG4 contiennent deux ponts disulfures inter H-H comme les IgG1. En revanche, ces liaisons se forment plus lentement et paraissent plus instables dans le cas des IgG4 (Petersen and Dorrington, 1974).

Chez la souris, les mIgG1, mIgG2a et mIgG2 ont trois ponts disulfures inter H-H, les mIgG3 un seul, et les mIg2c en ont quatre. Contrairement à l'homme, il semble qu'aucune variation de l'arrangement des ponts disulfures n'ait été décrite pour les sous-classes d'IgG murines.

b) Flexibilité

La flexibilité de la région charnière est différente entre les sous-classes d'IgG. Les IgG3 possèdent la région charnière la plus flexible, puis par ordre de flexibilité décroissante, IgG1, IgG4 et IgG2. Chez la souris, l'ordre est le suivant : IgG2b > IgG2a > IgG3 > IgG1 (Dangl *et al.*, 1988).

La flexibilité des IgG se caractérise à deux niveaux, d'une part entre les deux régions Fabs (Fab-Fab) et d'autre entre les régions Fabs et Fc (Fab-Fc). Elle se caractérise par la capacité de la molécule à effectuer des mouvements de flexion, de torsion, à s'étirer ou au contraire à se contracter (Roux *et al.*, 1997) (Figure 11).

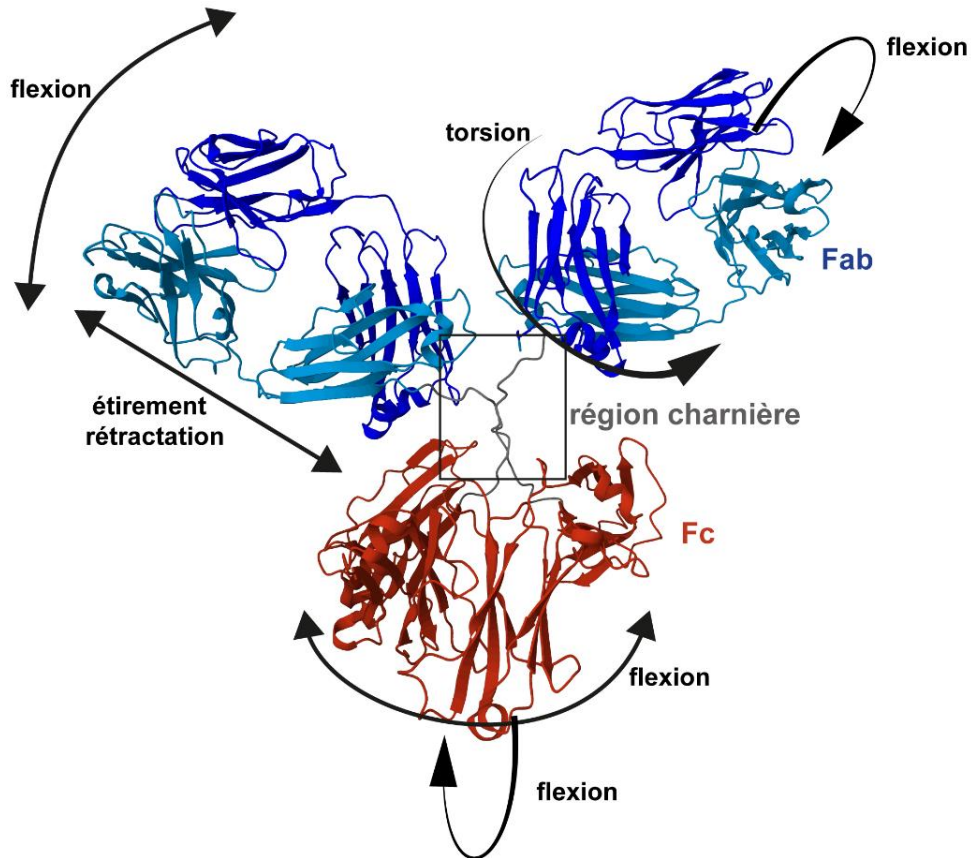


Figure 11 : Structure tri-dimensionnelle d'une IgG illustrant la flexibilité de la région charnière. La région charnière des IgG permet des mouvements de flexion des segments Fab et Fc dans les trois plans de l'espace, de torsion des parties Fab autour de leur axe. Elle permet également des mouvements d'étirement/rétraction des parties Fab leur permettant de se fixer sur des antigènes plus ou moins éloignés. (PDB : 1IGY)

L'angle Fab-Fab moyen mesuré par microscopie électronique est 136° pour IgG3, 128° pour IgG4, 127° pour IgG2 et 117° pour IgG1. L'angle maximal pour IgG3 semble être en lien avec la taille de sa région charnière moyenne, qui minimise les éventuels encombrements stériques entre les Fabs et le Fc, qui pourraient survenir avec les autres sous-classes dont la région charnière est plus petite (Roux *et al.*, 1997).

Pour les autres sous-classes, la flexibilité Fab-Fab est principalement apportée par la charnière haute. La charnière haute des IgG2 est restreinte, 3 résidus séparant l'extrémité C-terminale de CH1 et la cystéine formant le premier pont disulfure par rapport aux 10 résidus de la charnière haute d'IgG1. La charnière restreinte des IgG2 est responsable d'une proximité accrue entre le domaine CH1 et la charnière haute, diminuant la flexibilité Fab-Fab. Chez la souris, la charnière haute de mIgG1 est également restreinte, comprenant 6 résidus, en comparaison de mIgG2a et de mIgG2c qui en comprennent respectivement 9 et 10 (Burton, 1985).

Les résidus C-terminaux de la charnière haute sont relativement peu contraints. En revanche, les résidus N-terminaux peuvent interagir avec des résidus du domaine CH1 adjacent, altérant la flexibilité Fab-Fab (Roux *et al.*, 1997). Une étude de dynamique moléculaire réalisée sur des anticorps murins mIgG2a et mIgG1 a permis de valider cette hypothèse. Alors que mIgG2a est plus flexible que mIgG1, un mIgG2a mutant avec une région charnière de mIgG1 a une flexibilité équivalente à celle de mIgG1. La flexibilité de mIgG2a n'est pas altérée lorsqu'il est muté pour arborer des domaines CH2 et CH3 de mIgG1, suggérant peu ou pas d'influence de ces domaines pour la flexibilité de la molécule. En revanche, lorsque le domaine CH1 de mIgG2a est muté pour celui de mIgG1, la flexibilité est similaire à celle de mIgG1, soulignant l'importance de ce domaine, et notamment de la boucle formée par les résidus 131 à 139 de CH1, pour la flexibilité Fab-Fab (Schneider *et al.*, 1988).

Partie 2 : Mécanismes effecteurs

Les fonctions effectrices des anticorps sont une partie importante de la réponse immunitaire humorale et forment un lien essentiel entre immunité innée et immunité adaptative. Ces fonctions effectrices sont médiées par la partie Fc des anticorps, qui a la capacité d'interagir avec des composants protéiques et des récepteurs cellulaires.

L'interaction de la partie Fc avec le complexe C1 déclenche la voie classique du complément aboutissant à la formation du complexe membranaire et à la lyse de la cellule, dans un processus dénommé cytotoxicité dépendante du complément (CDC, « *complement-dependent cytotoxicity* ») (Figure 12).

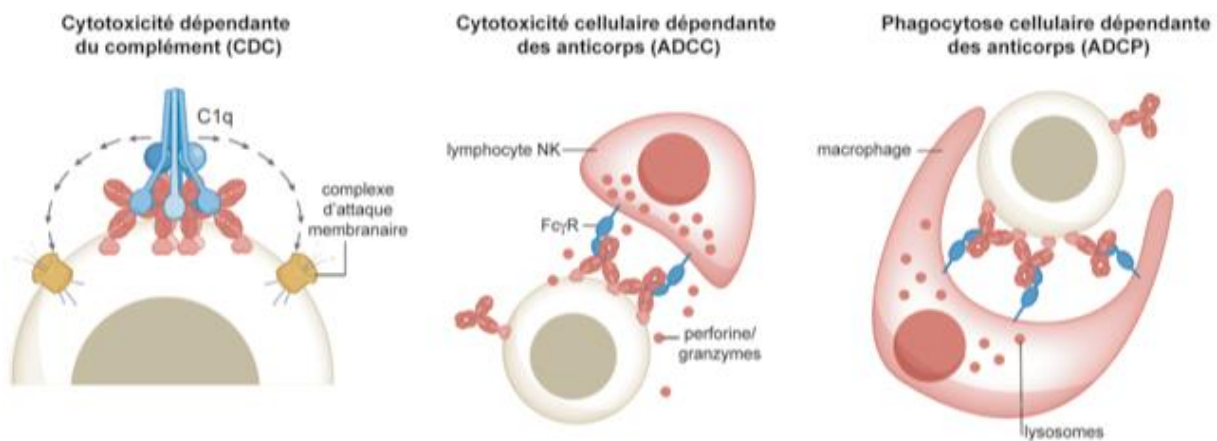


Figure 12 : Mécanismes effecteurs qui sont susceptibles d'être engagés par la partie Fc des anticorps. Les IgG regroupées à la surface d'une cellule cible peuvent interagir avec le C1q et déclencher la voie classique du complément (CDC). L'interaction avec les récepteurs aux fragments Fc à la surface des lymphocytes NK et des macrophages déclenche respectivement l'ADCC et l'ADCP. Adapté de (Oostindie *et al.*, 2022).

La partie Fc (incluant la région charnière) est également capable d'interagir avec différents récepteurs aux fragments Fc ($Fc\gamma R$: « *Fc gamma receptor* ») présents notamment à la surface des lymphocytes NK et des phagocytes (monocytes/macrophages). L'engagement des lymphocytes NK par la partie Fc d'anticorps regroupés à la surface d'une cellule cible entraîne la libération des enzymes protéolytiques perforine et granzymes et à l'apoptose de la

cellule, dans un processus appelé cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC : « *antibody-dependent cellular cytotoxicity* »). La reconnaissance de la partie Fc d'anticorps par les FcγR présents à la surface des phagocytes entraîne la phagocytose de la cellule cible par un mécanisme dénommé phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP : « *antibody-dependent cellular phagocytosis* »)

A. La cytotoxicité dépendant du complément

I. Le système du complément

Le système du complément fait partie du système immunitaire inné et regroupe des protéines plasmatiques ainsi que des protéines membranaires. Les protéines plasmatiques sont majoritairement synthétisées par le foie dans une forme « pro-enzyme » (ou zymogènes). Ces protéines sont inactives jusqu'à ce qu'un clivage protéolytique permette d'exposer leur site actif (Kindt *et al.*, 2006).

La cascade du complément peut être activée par trois voies : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines. Toutes ces voies aboutissent à la génération des complexes enzymatiques C3 et C5 convertases, à la formation du complexe d'attaque membranaire et à la lyse cellulaire (Kolev *et al.*, 2014). Les anticorps sont capables d'activer la voie classique du complément pour lyser les cellules sur lesquelles ils sont fixés. La CDC ne semble pas impliquer la voie alterne du complément (Bindon *et al.*, 1988).

La voie classique du complément est initiée par l'interaction d'immunoglobulines avec le complexe macromoléculaire C1, qui est constitué de la protéine de reconnaissance C1q (410 KDa) et d'un hétérotétramère formé par les sérine-protéases C1r et C1s (C1r2s2, 356 KDa), l'ensemble étant stabilisé par des ions Ca^{2+} . C1q est composé de 18 chaînes polypeptidiques qui s'associent pour former une structure en « bouquet de tulipes » consistant en six bras analogues au collagène qui se terminent chacun par un domaine globulaire interagissant avec les parties Fc des immunoglobulines (Zwarthoff *et al.*, 2021) (Figure 13).

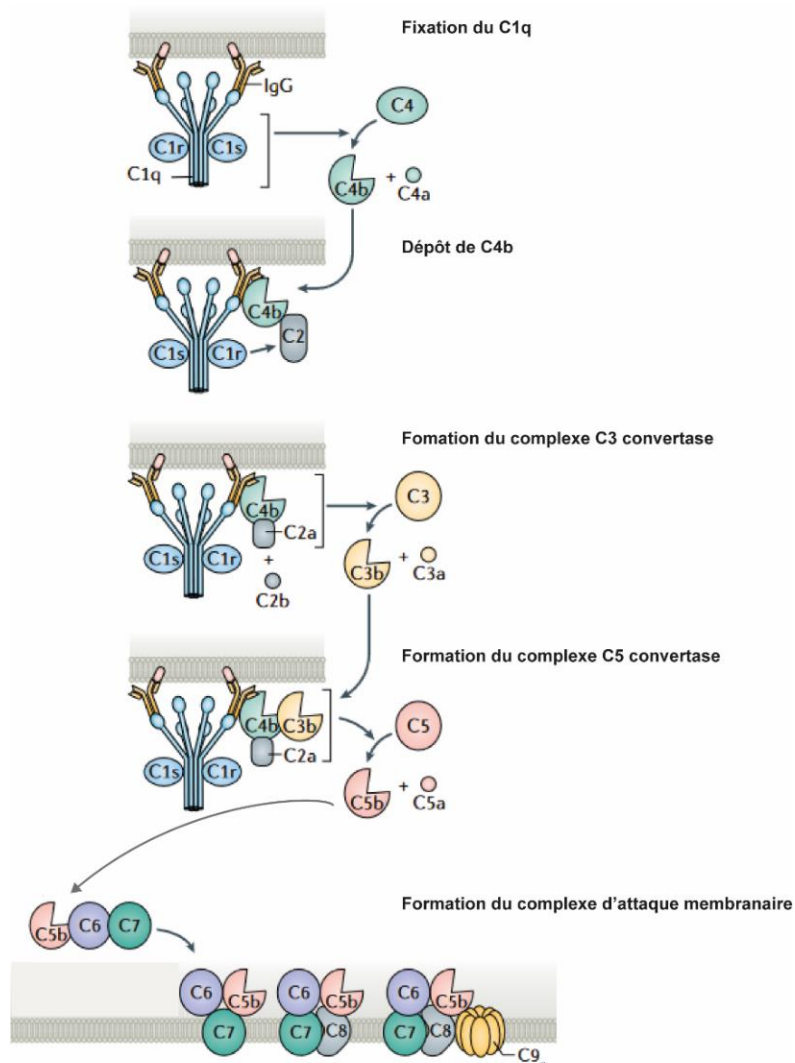


Figure 13: Voie classique du complément initiée par la fixation des IgG. La fixation des IgG regroupées à la surface de la cellule par le C1q provoque l'activation du complexe C1 qui permet la formation du complexe C4bC2a (C3 convertase). Le complexe C3 convertase clive C3 pour produire C3b, qui forme un complexe avec C4b et C2a (C5 convertase). Le complexe C5 convertase clive C5 en C5a et en C5b. Le complexe formé par C5b, C6 et C7 s'insère dans la partie externe de la membrane plasmique et s'associe avec C8 et plusieurs molécules C9 pour former le complexe d'attaque membranaire. Adapté de (Dalakas *et al.*, 2020).

La fixation du C1q provoque un changement conformationnel de C1r qui lui permet de cliver C1s, libérant son site actif. C1s a deux substrats, C4 et C2, qui sont clivés respectivement en C4a et C4b, et en C2a et C2b. Le fragment C4b se dépose à la surface cellulaire à proximité de C1, exposant un site de fixation pour la pro-enzyme C2. La sérine protéase C1s du complexe

C1 clive C2 en C2a et en C2b, le dernier diffusant dans le milieu extracellulaire. Le complexe formé par C4b et C2a (C4b2a) est appelé C3 convertase.

La C3 convertase clive le composant C3 en C3a et C3b. Le C3b se « dépose » à la surface de la cellule en se fixant de façon covalente. Des molécules de C3b se fixent au complexe C4b2a (C3 convertase) pour former un complexe trimoléculaire C4b2a3b appelé C5 convertase. Le composant C3b du complexe se lie au composant C5, qui va être clivé par le composant C4b2a en C5a, qui diffuse dans le milieu extracellulaire, et en C5b qui se dépose à la surface cellulaire pour initier la formation du complexe d'attaque membranaire.

Le composant C5b est stabilisé par la liaison avec C6. La fixation de C5b6 à C7 permet au complexe d'exposer des régions hydrophobes interagissant avec les phospholipides membranaires et ainsi de s'insérer dans la bicouche lipidique. La fixation de C8 permet au complexe C5b678 de créer un pore étroit (10 Å) insuffisant pour provoquer la lyse de la cellule. La fixation du composant C9, une molécule analogue à la perforine, et sa polymérisation (10-17 molécules par complexe C5b7678) forme le complexe d'attaque membranaire. Le complexe d'attaque membranaire forme un pore de 70-100 Å, par lequel les ions et les petites molécules peuvent diffuser, rendant la cellule cible incapable de maintenir son osmolarité intracellulaire. La lyse cellulaire est ainsi provoquée par un influx d'eau et une perte d'électrolytes (Kindt *et al.*, 2006).

Les souris consanguines présentent une activité du complément très faible par rapport à l'homme. Dans un essai d'hémolyse d'érythrocytes de mouton sensibilisés, le complément hémolytique 50 (CH50) du sérum humain est supérieur à 6000, celui du sérum de souris C57BL/6 et de souris BALB/c est inférieur à 160. A la plus grande concentration testée, il n'est pas possible d'obtenir une lyse de 100% des hématies avec le sérum de ces souris, mais respectivement 8% et 20% pour les souris C57BL/6 et de souris BALB/c (Ong and Mattes, 1989).

II. Oligomérisation des IgG

L'oligomérisation de plusieurs molécules d'IgG à la surface cellulaire est nécessaire pour activer C1 puisque l'affinité du C1q pour une seule partie Fc est très faible (Kd de l'ordre de 10^{-4} M). Une analyse en cristallographie haute résolution a permis de mettre en évidence que

les interactions non spécifiques des fragments Fc des IgG après fixation de l'antigène résultent en la formation d'hexamères qui activent et recrutent C1. Le complexe anticorps-C1 se présente sous la forme de deux plateformes, la première située à 11 nm de la membrane et la deuxième à 20 nm, surplombées par une tige. Dans le modèle proposé par les auteurs, la plateforme haute correspond aux têtes globulaires de C1q. La plateforme à 11 nm correspond aux IgG fixées à la membrane, organisés sous la forme d'hexamères, avec un premier niveau formé par les Fabs liés à l'antigène et un deuxième niveau plus dense formé par les Fc et les Fabs non fixés. Ce modèle suggère qu'une partie Fab de chaque anticorps est fixée sur l'antigène membranaire alors que l'autre est positionnée sur la hauteur de la plateforme. Des expériences de CDC *in vitro* avec des anticorps bispécifiques monovalents (*i.e.* un des deux Fab ne reconnaît pas l'antigène membranaire) ont permis de confirmer que l'activation du complément ne requiert qu'une fixation monovalente des IgG sur la surface de la cellule cible (Diebolder *et al.*, 2014).

Une étude basée sur la microscopie à force atomique à haute vitesse a permis d'identifier que la fixation du C1q à des IgG regroupées en pentamères ou en hexamères est nécessaire à l'activation maximale de la CDC. La CDC est inefficace dans le cas de monomères, et d'oligomères formés par 2, 3 ou 4 IgG (Strasser *et al.*, 2019).

III. Sites d'interaction

Les sites importants pour la CDC sont d'une part ceux sur lesquels le C1q se fixe et d'autre part ceux responsables de l'interaction Fc-Fc (Figure 14).

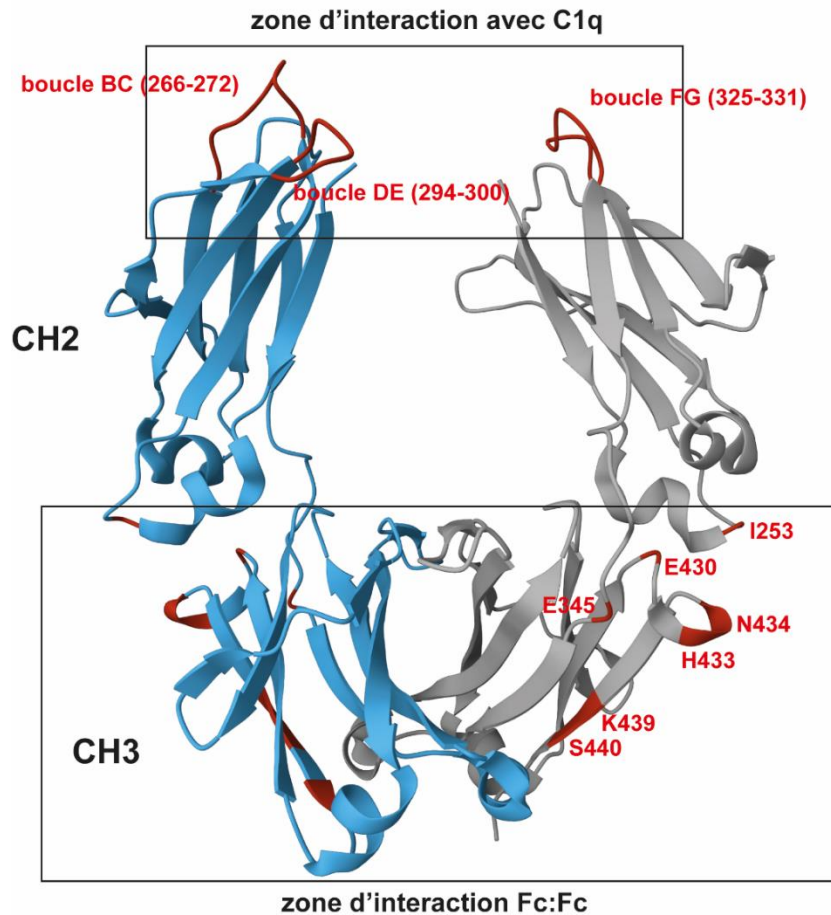


Figure 14: Structure tri-dimensionnelle d'une IgG illustrant les zones d'interaction avec le C1q et la zones d'interaction Fc-Fc après fixation de l'antigène à la surface cellulaire. Le C1q interagit avec la région CH2 d'immunoglobulines organisées en pentamères ou en hexamères, ces structures étant stabilisées par des interactions entre les fragments Fc au niveau du domaine CH3 (PDB : 4WI2).

La zone d'interaction entre le Fc et le C1q est située dans le domaine CH2, proche de la région charnière. Une analyse cristallographique a permis d'identifier que chaque tête globulaire de C1q interagit avec des zones périphériques distinctes dans les deux domaines CH2. Le premier site est formé par la boucle FG (résidus 325 à 331) d'un des deux domaines, les résidus critiques étant P329, A330 et P331 situés à l'extrémité de la boucle. Les sites d'interaction sur le second domaine CH2 consistent en la boucle BC (266 à 272) et DE (294 à 300) qui forment un patch négativement chargé, interagissant avec des résidus arginine de la tête globulaire de C1q (Ugurlar *et al.*, 2018).

La zone d'interaction Fc-Fc est située dans les domaines CH3. Plusieurs expériences de mutagenèse ont permis d'identifier les résidus d'acides aminés impliqués dans cette interaction. Alors que la fixation de l'antigène et la fixation du C1q ne sont pas altérés, des mutations d'I253, H433 ou N434 réduisent l'avidité apparente du C1q d'un facteur 20, résultant en une activation réduite du complément. Le résidu K439 d'un Fc fait face au résidu S440 d'un autre Fc et les mutations K439E et S440K inhibent la CDC. Des mutations gain-de-fonction, dont E345R, augmentent l'avidité du C1q d'un facteur 5 et la CDC d'un facteur 10. Un triple mutant E345R, E430G, S440Y forme spontanément des hexamères en solution, activant directement le complément en présence de sérum humain (Diebolder *et al.*, 2014).

B. Mécanismes effecteurs dépendant des récepteurs aux fragments Fc

I. Récepteurs aux fragments Fc

Les récepteurs aux fragments Fc (FcR : *Fc receptors*) constituent un groupe hétérogène de glycoprotéines présentes à la surface de cellules hématopoïétiques et impliquées dans l'interaction entre les anticorps et les cellules du système immunitaire. On distingue les FcR pour les IgG (FcγR), pour les IgE (FcεR), pour les IgA (FcαR), pour les IgM (FcμR) et pour les IgA/IgM (Fcα/μR). D'autres récepteurs exprimés sur d'autres types cellulaires interagissent également avec les immunoglobulines, incluant le FcR néonatal (FcRn) et le récepteur polymérique aux immunoglobulines présent sur l'épithélium des muqueuses (Ben Mkaddem *et al.*, 2019).

Six FcγR ont été identifiés chez l'homme. Il s'agit des récepteurs FcγRI (CD64), FcγRIIA FcγRIIB et FcγRIIC (CD32A, CD32B et CD32C), FcγRIIIA et FcγRIIIB (CD16A et CD16B). Quatre classes de FcγR existent chez la souris, mFcγRI, mFcγRIIB, mFcγRIII et mFcγRIV (Nimmerjahn and Ravetch, 2006).

1. Récepteurs activateurs et inhibiteurs

Les FcγR (excepté le FcγRI) présentent des affinités faibles pour les IgG. Pour déclencher le mécanisme d'ADCC et d'ADCP, ils doivent donc fixer les anticorps sous forme de complexes immuns, ou regroupés à la surface d'une cellule cible permettant d'augmenter l'avidité du complexe (Nimmerjahn and Ravetch, 2007). Dans le complexe, plusieurs études

suggèrent que les Fc γ R s'organisent sous la forme de dimères. Des formes dimériques solubles de Fc γ RIIA ou de Fc γ RIIIA sont capables de fixer les différentes sous-classes d'IgG alors que l'affinité des monomères est insuffisante pour que la fixation des IgG soit détectable (Wines *et al.*, 2016). Des mutations des résidus d'acides aminés de Fc γ RIIA, identifiés par cristallographie pour leur rôle dans l'interface entre deux Fc γ RIIA du dimère, n'affectent pas la fixation des IgG mais perturbent la cascade de signalisation incluant la phosphorylation des motifs ITAM (« *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* ») et la réponse calcique (Powell *et al.*, 2006).

Le Fc γ RI, Fc γ RIIA et Fc γ RIIIA chez l'homme et le mFc γ RI, mFc γ RIII et mFc γ RIV chez la souris sont des récepteurs activateurs, dont la signalisation se fait au travers de motifs ITAM intracellulaires.

La partie intracellulaire de Fc γ RI et de Fc γ RIIA chez l'homme et de tous les récepteurs activateurs chez la souris ne contiennent pas de motifs ITAM intracellulaires. Ces récepteurs se présentent sous une forme hétéro-oligomérique, constitués d'une sous-unité α permettant la reconnaissance des IgG et de sous-unités permettant la transduction du signal, telles que la chaîne γ commune. Cette protéine transmembranaire est un homodimère, constitué de deux chaînes polypeptidiques conservées chez l'homme et la souris, reliées par un pont disulfure (Mancardi and Daëron, 2014). La sous-unité α du Fc γ RIIIA peut également s'associer avec la chaîne CD3 ζ (Lanier *et al.*, 1991). Les Fc γ R hétéro-oligomériques doivent être associées avec au moins une sous-unité pour pouvoir être exprimées à la surface de la cellule (Wirthmueller *et al.*, 1992). Les souris invalidées pour la chaîne γ commune n'expriment pas de Fc γ R activateurs (Takai *et al.*, 1994).

Chez l'homme et la souris, le Fc γ RIIB est un récepteur inhibiteur, possédant un domaine ITIM (« *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* »).

Dans le cas des récepteurs activateurs, l'agrégation est suivie par une phosphorylation des résidus tyrosine des motifs ITAM par des tyrosine-kinases de la famille Src, qui est Lck dans le cas des lymphocytes NK, et Lyn et Hck pour les monocytes et les mastocytes (Junker *et al.*, 2020). Cette phosphorylation permet le recrutement de la tyrosine-kinase Syk par ces domaines SH2 (« *Src-homologie 2* ») et l'activation de plusieurs protéines impliquées dans la réponse cellulaire, incluant la phospholipase C gamma 1 (PLC γ), phosphoinositide 3-kinase

(PI3K) et dans le cas des cellules myéloïdes, la tyrosine kinase de Bruton (Btk). L'action de la PLC γ génère de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG), aboutissant respectivement à la mobilisation du calcium et à l'activation de la protéine kinase C (PKC). Selon le type cellulaire, ces événements aboutissent à l'ADCC, à l'ADCP, à la dégranulation ou à la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires (Ben Mkaddem *et al.*, 2019; Junker *et al.*, 2020).

Dans le cas du Fc γ RIIB, l'agrégation des récepteurs inhibiteurs est suivie par la phosphorylation des motifs ITIM par la tyrosine-kinase Lyn. Cette phosphorylation est suivie par le recrutement et l'activation des inositol polyphosphate-5-phosphatases SHIP-1 et SHIP-2, induisant la déphosphorylation de protéines en aval, inhibant la cascade d'activation induite par les Fc γ R activateurs (Smith and Clatworthy, 2010).

2. Profil d'expression

Le Fc γ RI est le seul Fc γ R, qui présente une affinité élevée pour les IgG (K_a de l'ordre de 10^8 - 10^9 M⁻¹), est exprimé par les monocytes, macrophages et les cellules dendritiques (Figure 15). Sur les mastocytes, l'expression de Fc γ RI est induite par l'IFN- γ , passant de 2% de cellules positives en cytométrie en flux à l'état basal, à 44% après incubation avec l'IFN- γ (Okayama *et al.*, 2000). De la même façon, la stimulation par l'IFN- γ induit l'expression de Fc γ RI sur les polynucléaires éosinophiles et neutrophiles. L'expression de Fc γ RI sur les polynucléaires neutrophiles est également augmentée par les facteurs de croissance granulocytaires recombinants (Graziano *et al.*, 1989; Repp *et al.*, 1991).

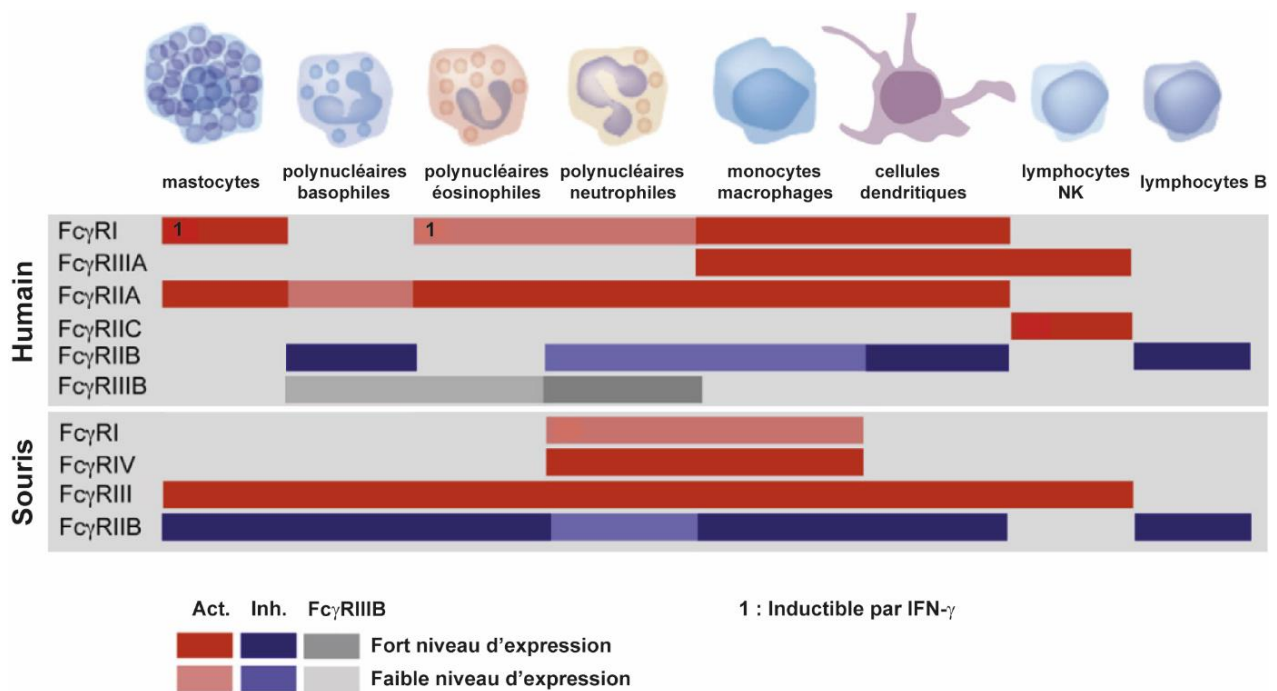


Figure 15 : Expression des FcγR humains et murins. L'expression relative des FcγR récepteurs activateurs est en rouge, celle des FcγR inhibiteurs en bleu, celle des FcγRIIIB en gris. L'intensité de la coloration reflète le niveau d'expression. Adapté de (Mancardi and Daéron, 2014).

Le FcγRIIa est le FcγR le plus largement exprimé. Il est exprimé à haut niveau sur les monocytes/macrophages, les polynucléaires neutrophiles et les cellules dendritiques, mais est également présent sur les polynucléaires éosinophiles et basophiles, les mastocytes et les mastocytes. Il est absent à la surface des lymphocytes NK (Anania *et al.*, 2019). Le gène *FCGR2A* codant pour le FcγRIIa présente un polymorphisme qui se traduit par une variation du résidu 131, qui est une histidine (FcγRIIa-131H) ou une arginine (FcγRIIa-131R). Le FcγRIIa-131H présente une meilleure affinité pour les IgG2. Il a été démontré que des polynucléaires neutrophiles de patients homozygotes (131H/131H) ont une meilleure capacité de phagocytose *in vitro* de streptocoques opsonisés par des IgG2 que les homozygotes (131R/131R). La phagocytose par les polynucléaires neutrophiles de patients hétérozygotes (131H/131R) est intermédiaire (Sanders *et al.*, 1995).

La fonction physiologique de Fc γ RIIB est de réguler l'état d'activation cellulaire à travers des interactions avec les autres récepteurs de surface. Le Fc γ RIIB est le seul FcR exprimé sur les lymphocytes B. La co-ligation du récepteur des lymphocytes B et de Fc γ RIIB en *cis* par les complexes immuns permet de limiter l'activation, la prolifération et la sécrétion d'anticorps (Stopforth *et al.*, 2016). Le Fc γ RIIB est exprimé également sur les cellules dendritiques et les macrophages. Des souris invalidées pour le Fc γ RII présentent une aggravation de l'inflammation dans un modèle d'alvéolite induite par les complexes immuns. Les macrophage Fc γ RII^{-/-} ont une activité phagocytaire augmentée après engagement du Fc γ RIII (Clynes *et al.*, 1999).

Le Fc γ RIII existe sous deux isoformes. Le Fc γ RIIIA est une protéine transmembranaire, associée à la chaîne γ commune ou CD3 ζ , qui est exprimée par les monocytes, macrophages et est le seul Fc γ R à être exprimé sur les lymphocytes NK. Le Fc γ RIIIB est ancré à la membrane par un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI). Il est exprimé sur les polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles. Le rôle de Fc γ RIIIB n'est pas totalement élucidé (Wirthmueller *et al.*, 1992). Deux allotypes ont été identifiés pour le Fc γ RIIIa, qui diffèrent par le résidu en position 158, qui est une phénylalanine (Fc γ RIIIa-158F) ou une valine (Fc γ RIIIa-158V), la fréquence des deux allèles étant similaire dans la population (Watier, 2005). L'allèle 158V présente une affinité plus élevée pour les IgG1 et les IgG3 et a été associé à une meilleure réponse clinique par rituximab (Cartron *et al.*, 2002; Koene *et al.*, 1997).

Chez la souris, les monocytes et macrophages expriment tous les Fc γ R activateurs et inhibiteurs (mFc γ RI-mFc γ RIV), les polynucléaires neutrophiles expriment principalement le mFc γ RIIB inhibiteur et les Fc γ RIII et Fc γ RIV activateurs, les cellules dendritiques expriment mFc γ RI, mFc γ RIIB et mFc γ RIII. Les lymphocytes NK n'expriment que le mFc γ RIII et les lymphocytes B n'expriment que le mFc γ RIIB. Selon la localisation des gènes et les similarités de séquences, mFc γ RIV semble être l'orthologue du mFc γ RIIIA et le mFc γ RIII est le plus proche du Fc γ RIIA (Nimmerjahn and Ravetch, 2007). Le mFc γ RIV est associé à la chaîne γ commune et est fortement exprimé sur les polynucléaires neutrophiles, les monocytes, macrophages et les cellules dendritiques (Nimmerjahn *et al.*, 2005).

3. Sites d'interaction avec les FcγR

Dans un modèle basé sur la détermination de la structure d'IgG1 en solution, il a été identifié que la liaison des IgG1 au FcγRIIIB était facilitée par un faible encombrement stérique entre les régions Fab et les FcγR, contrairement aux IgG4. Cette différence d'encombrement stérique peut être mise en parallèle avec la différence de résidus de la charnière basse et de la partie proximale du domaine CH2 entre les sous-classes. Les résidus impliqués dans la liaison des IgG1 avec les FcγR incluent ²³⁴LLGGP²³⁸ de la charnière basse et ²⁶⁵DVSHE²⁶⁹, ²⁹⁷NST²⁹⁹, ³²⁹PAPIE³³³ du domaine CH2 (Rayner *et al.*, 2015) (Figure 16).

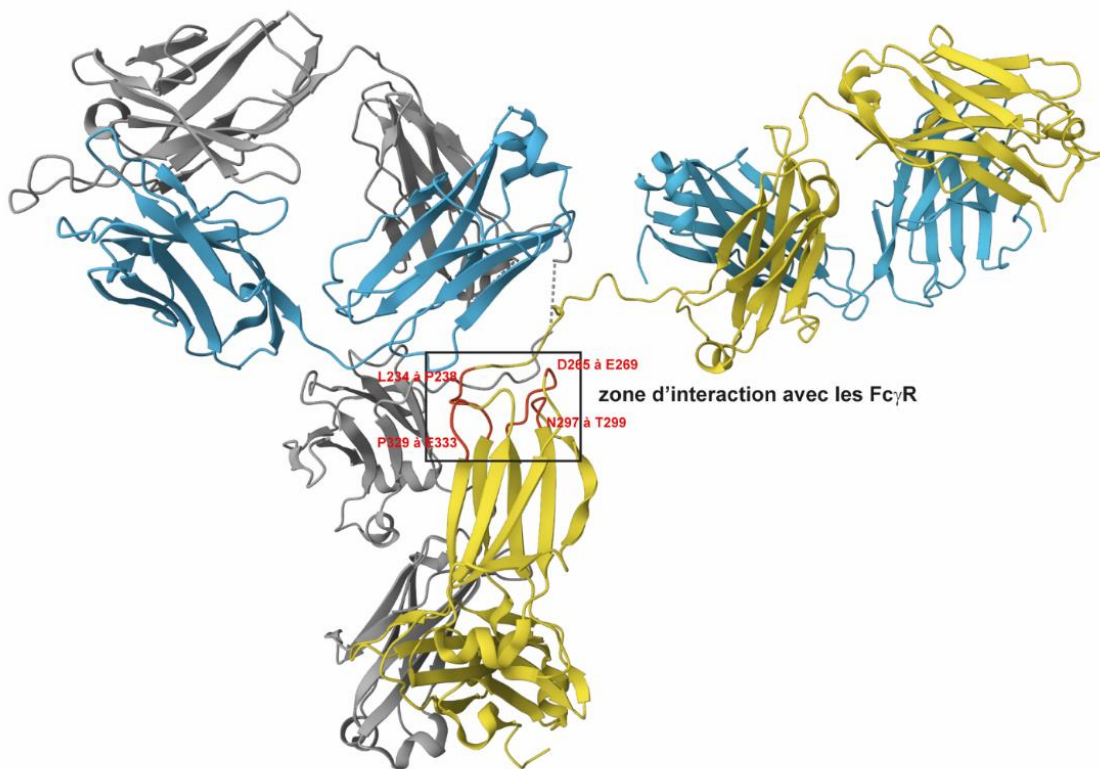


Figure 16 : Structure tridimensionnelle d'une IgG illustrant la zone d'interaction entre les IgG et les FcγR. Les résidus d'acide aminés des IgG impliqués dans l'interaction avec les FcγR sont situés au niveau de la région CH2 proximale et de la charnière basse (rouge). Les deux chaînes lourdes sont respectivement en gris et en jaune, les chaînes légères en bleu. (PDB : 1HZH).

L'étude cristallographique du complexe entre un fragment Fc obtenu par digestion à la papaine d'IgG1 humaines purifiées et de FcγRIII soluble (sFcγRIII) a également permis d'identifier que la partie basse de la région charnière et la partie haute de la région CH2 sont impliquées dans la liaison. Deux zones de contact principales sont mises en évidence. La première, dénommée « sandwich proline » par les auteurs, a lieu entre la P329 de la région CH2 d'une des deux chaînes lourdes (CH2-A) et les résidus W87 et W110 du sFcγRIII. La seconde implique les résidus L234 à S239 de la partie basse de la région charnière (Sondermann *et al.*, 2000). Le récepteur est également en contact avec des résidus des boucles inter-brins β BC (D265 à E269) et DE (N297 à T299) de la chaîne lourde CH2-B. Sur la base des séquences conservées entre les FcγR et les différents isotypes d'IgG murines et humaines, les auteurs proposaient un modèle commun pour décrire leurs principales interactions. Dans celui-ci, le « sandwich proline » est d'importance puisque les deux résidus tryptophane sont conservés dans tous les FcR et le résidu proline est présent dans tous les isotypes d'IgG (et d'IgE). La région charnière apparaît comme un autre site important et les variations de cette séquence sembleraient être la raison principale expliquant les différences d'affinité entre les sous-classes d'IgG et les FcR (Sondermann *et al.*, 2000).

La fixation Fc aux FcγR est asymétrique puisqu'elle implique des résidus différents sur les deux chaînes lourdes du fragment Fc, le « sandwich proline » et la charnière basse d'une des deux chaînes et les boucles inter-brins β BC et DE de l'autre chaîne lourde. Ainsi, bien que les IgG possèdent deux sites potentiels de fixation aux FcγR, la fixation se fait selon une stœchiométrie 1:1, *i.e.* un FcγR ne peut fixer qu'une seule molécule d'anticorps (Murin, 2020).

II. ADCC et ADCP

1. ADCC

Les lymphocytes NK représentent 5 à 20 % des lymphocytes circulants. Leur phénotype inclue l'absence de CD3 et de CD19, et la présence de CD45, CD56 et CD16. CD56 et CD16 sont exprimés à différents niveaux à la surface des lymphocytes NK, définissant la sous-population majoritaire CD56^{dim}CD16⁺, et la sous-population CD56^{bright}CD16^{low/-} qui représente 10% des lymphocytes NK. La sous-population CD56^{dim} est principalement impliquée dans l'ADCC car elle exprime constitutivement FcγRIIIA à haut niveau (Cooper *et al.*, 2001). Le

cytoplasme des lymphocytes NK comprend des granules lytiques contenant les protéines perforine, granzymes (A, B, H, M et K), Fas ligand (CD178), TRAIL (« *TNF-related apoptosis-inducing ligand* » ; CD253) et granulysine (Krzewski and Coligan, 2012).

La reconnaissance des Fc γ RIIIA par les anticorps fixés sur leur cible provoque leur agrégation à la surface des lymphocytes NK au niveau d'une « synapse immunologique » et le déclenchement de la cascade de signalisation. L'activation cellulaire provoque un réarrangement du cytosquelette permettant la concentration des granules lytiques et leur exocytose au niveau de la synapse immunologique. La perforine a la capacité de s'insérer dans la membrane plasmique de la cellule cible, de s'oligomériser et de former des pores de 10-25 nm. Les granzymes diffusent à travers ces pores dans le cytosol de la cellule cible où elles induisent l'apoptose par des mécanismes caspases-dépendant et caspases-indépendant (Krzewski and Coligan, 2012). Le clivage protéolytique et la perte de l'ectodomaine de Fc γ RIIIA contribue à la libération des lymphocytes NK de la synapse immunologique (Murin, 2020).

2. ADCP

La phagocytose est un processus basique retrouvé dans la grande majorité des types cellulaires d'organismes multicellulaires. En revanche, seules certaines cellules, dont les monocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles et les cellules dendritiques, réalisent la phagocytose avec une haute efficacité. Ces cellules ont été caractérisées comme phagocytes « professionnels » (Rabinovitch, 1995).

L'ADCP est un mécanisme important pour l'efficacité des anticorps thérapeutiques (Weiskopf and Weissman, 2015).

Alors que les phagocytes et notamment les monocytes, macrophages, coexpriment Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIIB, et Fc γ RIIIA, l'ADCP semble être médiée principalement par Fc γ RIIA. En effet, *in vitro* le blocage par un anticorps anti-Fc γ RIIA réduit la phagocytose par des macrophages différenciés à partir de monocytes de sang périphérique, dans un modèle d'anticorps anti-EpCAM. En revanche, le blocage de Fc γ RI, de Fc γ RIIIB et de Fc γ RIIIA a peu d'effet sur le niveau d'ADCC (Richards *et al.*, 2008).

La cascade de signalisation déclenchée par la reconnaissance des anticorps agrégés à la surface de la cellule cible par les Fc γ R entraîne une réorganisation du cytosquelette d'actine des phagocytes. La zone de la membrane en contact avec la cellule cible s'invagine, formant une « coupe phagocytaire ». Puis des pseudopodes s'établissent autour de la particule à ingérer, jusqu'à ce que la membrane du phagocyte la recouvre entièrement, formant une vésicule, le phagosome, à l'intérieur de la cellule. Le phagosome subit un processus de maturation, à travers des interactions avec les endosomes précoces, les endosomes tardifs et finalement les lysosomes, durant lequel il acquiert l'environnement acide et les enzymes nécessaires pour dégrader la particule ingérée (Uribe-Querol and Rosales, 2020).

Le processus de phagocytose doit être étroitement contrôlé pour prévenir l'élimination des cellules saines. La régulation se fait au travers de l'intégration de signaux pro-phagocytaires « *eat me* », dont les complexes immuns, les opsonines du complément, la calréticuline et la phosphatidylsérine exposée à la membrane, et de signaux anti-phagocytaires « *don't eat me* » *via* notamment l'interaction entre SIRP α (« *Signal regulatory protein α* ») et CD47 (Kelley and Ravichandran, 2021). SIRP α est une protéine transmembranaire exprimée sur toutes les cellules myéloïdes, incluant les monocytes, macrophages et les polynucléaires neutrophiles. CD47 est exprimé de façon ubiquitaire sur de nombreux types cellulaires pour prévenir la phagocytose par les phagocytes. En effet, SIRP α contient des motifs ITIM dans sa partie intracellulaire et l'interaction entre CD47 et SIRP α , au travers de la phosphorylation de ces domaines, inhibe la phagocytose (Qu *et al.*, 2022). Une analyse d'échantillons de tumeurs solides a mis en évidence que CD47 est fortement exprimé sur les cellules tumorales, incluant des cancers de l'ovaire, du sein, du colon, de la vessie, du système nerveux, du foie et de la prostate de cancer du sein. L'expression de CD47 est associée à une moins bonne survie globale chez ces patients. Le blocage par un anticorps anti-CD47 améliore la phagocytose *in vitro* des cellules tumorales et inhibe la croissance tumorale dans des souris NSG xénotransplantés avec des cellules tumorales humaines (Willingham *et al.*, 2012). CD47 est ainsi une cible potentielle dans le traitement du cancer, et plusieurs anticorps anti-CD47 sont actuellement en phase d'étude clinique (Jiang *et al.*, 2021).

III. Le récepteur au fragment Fc néonatal

Le récepteur au fragment Fc néonatal (FcRn) est un hétérodimère constitué d'une chaîne lourde apparentée aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) de 45 Kda, associée de façon non covalente à la β 2-microglobuline (Simister and Mostov, 1989). Il est largement exprimé dans de multiples types cellulaires, dont les cellules endothéliales, les cellules épithéliales placentaires, les kératinocytes et les mélanocytes, les entérocytes, les podocytes et les cellules tubulaires proximales rénales, les cellules épithéliales bronchiques, les glandes mammaires, les cellules épithéliales pigmentaire rétiniennes, les hépatocytes, ainsi que sur les cellules de la choroïde, des corps ciliaires et de l'iris dans l'œil (Pyzik *et al.*, 2015). Le FcRn est également présent à la surface des monocytes, macrophages, cellules dendritiques, polynucléaires neutrophiles et lymphocytes B (Zhu *et al.*, 2001).

Le FcRn a été dénommé ainsi car ce récepteur a initialement été mis en évidence dans le contexte du transfert des IgG de la mère vers le fœtus à travers le sac vitellin chez le lapin et à travers l'intestin de rats nouveau-nés (Brambell, 1966; Brambell *et al.*, 1960). Chez l'homme, la transcytose des IgG à travers le placenta est essentielle pour la transmission materno-fœtale des IgG permettant le transfert passif de l'immunité humorale (Firan *et al.*, 2001).

Le recyclage des IgG par le FcRn est responsable de la longue demi-vie de ces protéines, qui est d'environ 21 jours chez l'homme, excepté pour les IgG3 dont la demi-vie est de 7 jours (Damelang *et al.*, 2019). Chez la souris, la demi-vie des IgG est de 6-8 jours (Vieira and Rajewsky, 1988). Cette demi-vie est réduite à 1 jour pour des souris invalidées pour le FcRn (Roopenian *et al.*, 2003).

Le FcRn est majoritairement intracellulaire et contenu dans des vésicules, notamment les endosomes précoces et les endosomes de recyclage (Ober *et al.*, 2004). Les IgG pénètrent dans la cellule par un mécanisme non spécifique de pinocytose. Les IgG sont ensuite acheminées vers les endosomes dans lesquels se trouvent les FcRn. L'environnement acide des endosomes permet la fixation des IgG au FcRn. Des structures co-cristallines d'IgG et du FcRn ont mis en évidence que le FcRn fixe les IgG au niveau la région à l'interface entre les domaines CH2 et CH3, les résidus des IgG humaines et murines impliqués dans l'interaction avec le FcRn étant l'I253 et l'H310 de la région CH2 ainsi que l'H435 et la Y436 (chez l'homme) ou l'H436 (chez la souris) de la région CH3. Ce site de fixation est distinct des sites de fixation du C1q et

des Fc γ R (Burmeister *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 2001). Deux FcRn peuvent se fixer sur chaque chaîne lourde des IgG avec une affinité identique. Cette stœchiométrie 2:1 augmente l'avidité du complexe et semble être importante pour prolonger la demi-vie des IgG (Abdiche *et al.*, 2015). L'affinité des IgG pour le FcRn à pH ≤ 6.5 est de l'ordre du nanomolaire alors qu'à pH physiologique (≈ 7.5), aucune fixation des IgG sur le FcRn n'est détectable. A pH ≤ 6.5 , les résidus H310 et H435 (et H436 chez la souris) de la région CH3 des IgG sont chargés positivement et peuvent former des liaisons ioniques avec les résidus G117, E132, D137 de la chaîne lourde du FcRn et le premier résidu de la $\beta 2$ -microglobuline (West and Bjorkman, 2000). Les complexes FcRn-IgG sont ensuite acheminés en dehors de la voie de dégradation lysosomale, vers la membrane plasmique, où après fusion des membranes de l'endosome et de la cellule, le pH physiologique cause la dissociation du complexe et la libération des IgG dans l'espace extracellulaire. Les IgG et qui ne sont pas associées avec le FcRn sont acheminées vers la voie de dégradation lysosomale (Sokolosky and Szoka, 2015).

Par un mécanisme similaire mais à travers d'un site de fixation sur le FcRn distinct de celui des IgG, le FcRn protège également l'albumine sérique du catabolisme lysosomal, prolongeant sa demi-vie (Chaudhury *et al.*, 2003).

Bien que les IgG3 possèdent une affinité similaire à celle des autres sous-classes pour le FcRn, cette sous-classe possède un résidu N435 à la place de l'H435, qui d'une part améliore la fixation au FcRn à pH 7.4, mais d'autre part diminue son affinité à pH ≤ 6.5 . La plus faible demi-vie des IgG3 s'explique par un mécanisme de compétition intracellulaire pour le FcRn, en présence d'autres sous-classes d'IgG. Cette inhibition du transport dépendant du FcRn est n'est plus effective pour le mutant N435H d'IgG3 alors qu'elle l'est pour le mutant H435N d'IgG1, suggérant que ce seul résidu est responsable de la demi-vie plus courte des IgG3 (Stapleton *et al.*, 2011).

Il est possible de moduler la demi-vie d'IgG par modification de leur interaction avec le FcRn. Des expériences de mutagenèse des résidus T252, T254 et T256 localisés sur une boucle située à proximité des résidus H310, H435 et H436 ont permis d'identifier que des mutations T252L, T254S et T256F (mutant « LSF ») permettent d'augmenter la demi-vie de mIgG1 par rapport à l'IgG non mutée (Ghetie *et al.*, 1997). Des mutations M252Y, S254T, T266E (mutant « YTE ») permettent d'augmenter d'un facteur 10 la fixation au FcRn à pH 6 du motavizumab,

anticorps monoclonal de sous-classe IgG1 indiqué dans la prévention de l'infection par le virus respiratoire syncytial. La demi-vie du motavizumab est 4 fois plus longue que le contrôle non muté chez le singe *cynomolgus* et peut se prolonger jusqu'à 100 jours chez le sujet sain (Dall'Acqua *et al.*, 2006; Robbie *et al.*, 2013).

A l'inverse, l'inhibition du FcRn augmente le catabolisme des IgG par dégradation lysosomale. Cette stratégie est exploitée dans le traitement des pathologies autoimmunes. L'efgartigimod (ARGX-113) est un variant d'un fragment Fc d'IgG1 portant les mutations M252Y, S254T, T256E, H433K et N434F ("ABDEG"). L'efgartigimod a une plus grande affinité que les IgG endogènes pour le FcRn à pH 6 et à pH 7.2 et augmente leur catabolisme *in vivo*, une seule injection permettant de réduire le niveau des IgG endogènes de 50%. Dans un essai clinique de phase III, cette stratégie a démontré son efficacité dans le traitement de la myasthénie auto-immune (Howard *et al.*, 2021; Ulrichts *et al.*, 2018; Vaccaro *et al.*, 2005). Des anticorps monoclonaux anti-FcRn sont également en phase d'étude clinique, incluant le rozanoliximab et le nipocalimab (M281) (Bril *et al.*, 2021; Roy *et al.*, 2019).

C. Facteurs influençant les mécanismes effecteurs

I. L'anticorps

1. Sous-classe

La capacité des IgG à induire la CDC varie selon les sous-classes. Les IgG3 sont les plus efficaces pour activer le complément, les IgG1 sont également efficaces alors que les IgG2 et les IgG4 activent faiblement la CDC (Burton and Woof, 1992). Chez la souris, les mIgG1 induisent peu de CDC alors que les mIgG2a, mIgG2b et mIgG3 sont de puissants activateurs du complément *in vitro* (Neuberger and Rajewsky, 1981).

Dans un modèle d'érythrocytes de mouton dans lequel la densité antigénique est variable, à très faible densité antigénique seules les IgG3 sont capable d'induire une lyse par le complément. Lorsque la densité antigénique augmente, les IgG3 et les IgG1 sont efficaces pour induire la CDC. Enfin, lorsque la densité antigénique est importante, les IgG2 sont également capables d'induire une lyse par le complément (Michaelsen *et al.*, 1991).

L'évaluation *in vitro* d'anticorps chimériques portant des domaines CH1, charnière, CH2 et CH3 d'IgG1 et/ou d'IgG3 ont permis d'identifier que la CDC est maximale lorsque le Fc est celui d'IgG3. Cela pourrait s'expliquer d'une part par le fait que l'affinité des Fc d'IgG3 pour le C1q est plus élevée que celui des IgG1 ($K_a = 2,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1}$ et $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1}$ respectivement). Par ailleurs, bien que les résidus du domaine CH2 impliqués dans l'interaction avec la tête globulaire de C1q soient identiques, les résidus adjacents à cette région sont variables entre IgG1 et IgG3. Il est probable que ces résidus polymorphiques participent à l'affinité supérieure d'IgG3 pour le C1q (Natsume *et al.*, 2008).

Un variant d'IgG3 portant un domaine CH1 d'IgG1 induit une CDC plus efficace qu'une IgG3 non mutée (Natsume *et al.*, 2008). Cela pourrait s'expliquer par le modèle d'interaction entre le C1q et le Fc proposé par Gaboriaux *et al.* Dans ce modèle, la tête globulaire de C1q interagissant avec le domaine CH2 proche de la région charnière, s'insère dans un espace formé entre CH2 et le Fab. Cela suggère que le bras Fab pourrait interagir également avec la tête de C1q (Gaboriaud *et al.*, 2003).

La flexibilité Fab-Fc apportée par la région charnière est importante pour permettre l'accès de la tête globulaire de C1q au site d'interaction dans le domaine CH2, qui est proche de la région charnière. Cette importance est illustrée par la modélisation de l'interaction entre le C1q et Mcg, une IgG1 humaine sans région charnière. Les Fabs de Mcg obstruent le site de liaison au C1q empêchant sa fixation (Gaboriaud *et al.*, 2003).

Concernant les mécanismes effecteurs dépendant des Fc γ R, la situation est plus complexe, les différentes sous-classes d'IgG ayant des profils d'affinité différents pour les Fc γ R (Figure 17). Chez l'homme, les IgG1 et IgG3 se fixent sur tous les Fc γ R, avec une affinité élevée pour Fc γ RI et modérée pour Fc γ RIIA et Fc γ RIIIA. Les IgG2 ont une affinité faible pour le Fc γ RIIA et le Fc γ RIIIA et ne se fixent pas sur le Fc γ RI, ni sur le Fc γ RIIIB. Les IgG4 se fixent sur tous les récepteurs, excepté le Fc γ RIIIB, ont une affinité élevée pour le Fc γ RI et faible pour les autres Fc γ R (Bruhns *et al.*, 2009). Le niveau d'ADCC est équivalent pour les allotypes d'IgG1 mais diffère pour les allotypes d'IgG3, les allotypes avec une courte région charnière (2 exons) étant plus efficaces *in vitro* que les allotypes avec une région charnière intermédiaire (3 exons) et que ceux avec longue région charnière (4 exons) (de Taeye *et al.*, 2020).

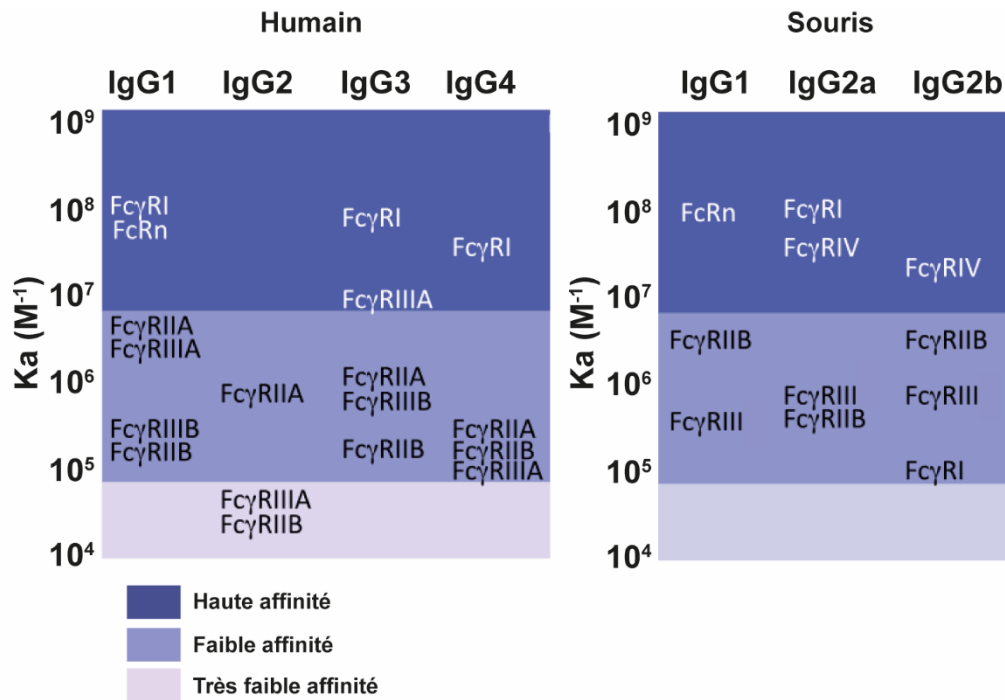


Figure 17 : Affinité des sous-classes d'IgG humaines et de souris pour les FcγR. Les constantes d'affinité (Ka) ont été déterminées par résonance plasmonique de surface. Adapté de (Mancardi and Daëron, 2014).

Chez la souris, les IgG1 se fixent sur le mFcγRIIB et le mFcγRIII. Les mIgG2a et mIgG2b se fixent sur mFcγRIIB, mFcγRIII et mFcγRIV, mais seul mIgG2a se fixe au mFcγRI. L'affinité de mIgG2a pour mFcγRI est élevée, intermédiaire pour mFcγRIV. La fixation des mIgG3 sur les mFcγR n'est pas détectable (Bruhns and Jönsson, 2015; Nimmerjahn *et al.*, 2005).

L'affinité différentielle des sous-classes d'IgG pour les FcγR peut être décrite par le ratio activateur/inhibiteur, *i.e.* l'affinité pour le FcγR activateur/l'affinité pour le mFcγRIIB. Ce ratio est de 0,1 pour les mIgG1 (mFcγRIII/mFcγRIIB), indiquant qu'ils interagissent principalement avec le mFcγRIIB. Il est de 69 pour les mIgG2a (mFcγRIV/mFcγRIIB), 7 pour les mIgG2b (mFcγRIV/mFcγRIIB), qui interagissent principalement avec les FcγR activateurs. Ce ratio ne peut pas être calculé pour mIgG3 car leur fixation sur les FcγR est indétectable. Ce ratio est corrélé à l'activité biologique *in vivo*, les mIgG2a étant plus efficaces que les mIgG2b et mIgG1 pour déclencher l'ADCC et diminuer le nombre de métastases dans un modèle murin de mélanome métastatique (Nimmerjahn and Ravetch, 2005).

2. Affinité de l'anticorps

L'effet de l'affinité de l'anticorps sur la CDC a été étudié dans le modèle des anticorps anti-CD20. En étudiant la cinétique de CDC *in vitro*, les auteurs ont constaté qu'après 6h, la CDC médiée par le rituximab est diminuée de 50%, alors que celle des anticorps 2F2 et 7D8 est maintenue à 90% du niveau initial. Le taux d'association de ces anticorps est similaire alors qu'ils diffèrent par le taux de dissociation (« *off-rate* »). Le rituximab a le taux de dissociation le plus important (30% d'anticorps fixés après 3h) par rapport à 2F2 et 7D8 (70%) (Teeling *et al.*, 2004). Cette étude suggère qu'une fixation stable de l'anticorps, évaluée par le taux de dissociation, augmente la CDC. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'un anticorps qui se détache plus rapidement aura moins de probabilité de former une structure hexamérique avec le C1q. Une autre possibilité est que l'instabilité de fixation de l'anticorps provoque l'éloignement à la membrane du complexe C1 après sa formation. Cette distance pourrait diminuer la capacité des composants C4b et C3b à se fixer de façon covalente à la membrane cellulaire, limitant la formation ultérieure du complexe d'attaque membranaire.

Il a été suggéré que le niveau d'ADCC augmente avec l'affinité de l'anticorps, dans une étude comparant plusieurs variants d'une IgG1 anti-HER2 dont la constante de dissociation (Kd) variait entre $2,7 \cdot 10^{-7}$ M et $1,6 \cdot 10^{-11}$ M. Le variant avec la plus haute affinité présentait un niveau d'ADCC *in vitro* plus important que les variants d'affinité modéré et de faible affinité, et cela sur plusieurs lignées cellulaires présentant des niveaux d'expression variables d'HER2 (Tang *et al.*, 2007).

Ces observations ont été nuancées par une étude plus récente, qui a mis en évidence que des anticorps d'affinité plus faible sont plus efficaces pour engager l'ADCC dans des modèles *in vitro* basés sur des variants d'affinité d'IgG1 anti-CD4, anti-EGFR et anti-HER2. Lorsque ces anticorps sont à saturation, le niveau de cytotoxicité par ADCC et ADCP par les anticorps d'affinité réduite est plus élevé que les anticorps de plus haute affinité. Selon les auteurs, lorsque l'affinité est modérée, les anticorps ont un taux de dissociation plus rapide et ont ainsi tendance à se fixer de façon monovalente, par rapport à la fixation bivalente qui est prépondérante en cas d'affinité élevée. La fixation monovalente est associée à un niveau d'ADCC plus élevé. En lien avec cette hypothèse, des IgG bispécifiques anti-CD4 et anti-

EGFR, dont un des Fabs ne pouvait pas reconnaître l'épitope (*i.e.* ne peuvent se fixer que de façon monovalente) étaient plus efficaces que les IgG non mutées (Mazor *et al.*, 2016).

L'effet de l'affinité de l'anticorps sur les mécanismes effecteurs dépendant des FcγR pourrait être différent selon la quantité d'anticorps (et la densité antigénique). Lorsque les anticorps ne sont pas à saturation, il se fixent de façon bivalente et une haute affinité de l'anticorps est un avantage par diminution du taux de dissociation et maintien de l'anticorps à la surface de la cellule cible. Lorsque les anticorps sont à saturation, la liaison monovalente prédomine, d'autant plus si l'affinité de l'anticorps est modérée. La fixation monovalente permet à un plus grand nombre de molécules d'anticorps d'interagir avec la cellule cible, et ainsi d'obtenir davantage de fragments Fc à la surface cellulaire pour interagir avec les FcγR.

3. Glycosylation

a) Sialylation

Des résidus acide sialique peuvent être ajoutés au motif de base oligosaccharidique en N297. La présence de résidus acide sialique modifie les interactions entre les glycanes et les domaines CH2, provoquant des changements conformationnels qui perturbent l'interaction entre le domaine CH2 et le C1q (Sondermann *et al.*, 2013).

Des variants du rituximab modifiés par ajout de deux résidus acide sialique en N297 (4 résidus sur la molécule d'IgG) sont moins efficaces dans un essai de CDC *in vitro* sur des lignées cellulaires. De la même façon, la capacité d'une glycoforme sialylée d'IgG1 à initier la CDC est diminuée par rapport à l'anticorps non sialylé. Cette diminution de la CDC est associée à une diminution de la fixation au C1q pour les glycoformes sialylées d'IgG1 (Quast *et al.*, 2015).

b) Afucosylation

L'interaction des IgG avec les FcγR est également dépendante de la N-glycosylation en N297. Des glycoformes d'IgG1 sans résidus fucose (afucosylés) présentent une affinité respectivement 50 et 18 fois plus élevée pour le FcγRIII-V158 et le FcγRIII-F158 que l'IgG native. Les auteurs proposent un modèle dans lequel le glycanes présent sur un résidu asparagine

du Fc γ RIII (N162) interagit avec une région du Fc où le résidu fucose est attaché. Le résidu fucose empêcherait le rapprochement du Fc γ RIII, excluant les interactions entre les résidus d'acides aminés (Ferrara *et al.*, 2006).

L'affinité d'IgG1 recombinantes produites dans des cellules CHO déficientes pour l'addition de fucose (lignée Lec13) est similaire pour le Fc γ RI et le Fc γ RIIA-H131, légèrement augmentée pour le Fc γ RIII-N131 et le Fc γ RIIB, et augmentée significativement pour le Fc γ RIII-F158 et Fc γ RIII-V158. Le niveau d'ADCC *in vitro* induit par la glycoforme d'IgG1 afucosylée est augmenté par rapport à l'IgG1 native (Shields *et al.*, 2002).

Ces résultats *in vitro* ont été confirmés *in vivo* dans un modèle murin de cancer du sein. Un anticorps IgG1 anti-HER2 afucosylé augmente la survie des souris et réduit le volume tumoral par rapport à l'IgG native. Cet effet est maintenu dans les souris RAG2^{-/-} invalidées pour le Fc γ RI et le Fc γ RIII murin, exprimant le Fc γ RIIIA humain. En revanche, aucune différence n'est observée par rapport entre l'anticorps afucosylé et l'anticorps natif dans les souris RAG2^{-/-} Fc γ RI^{-/-} Fc γ RIII^{-/-}, suggérant que l'effet thérapeutique supérieur observé avec l'IgG1 afucosylé dépend du Fc γ RIIIA (Junttila *et al.*, 2010).

II. L'antigène

1. La densité de l'antigène

Un effet de la densité antigénique sur la CDC a été observé sur des cellules mononuclées isolées du sang de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique, pour lequel le pourcentage de cellules CD20⁺ était déterminé. Le pourcentage de lyse de ces cellules incubées *ex vivo* avec du rituximab et du sérum humain est corrélé à l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) du marquage CD20 ($r^2 = 0.92$). Le dépôt de C3, mesuré en cytométrie en flux, est supérieur lorsque les cellules expriment CD20 à plus fort niveau, confirmant le rôle du complément dans cet essai (Golay *et al.*, 2001). De la même façon, dans un modèle de lignées cellulaires CEM et Jurkat (CD20⁻) transduites par un rétrovirus codant pour CD20, le pourcentage de CDC est corrélé à la MFI du marquage CD20, dans les deux types cellulaires (r^2 respectivement 0.83 et 0.88 pour les cellules CEM et Jurkat) avec une relation sigmoïdale (van Meerten *et al.*, 2006).

L'effet de la densité antigénique sur le niveau d'ADCC a été évalué *in vitro* dans un modèle basé sur des érythrocytes couplés à l'antigène 2,4,6-trinitrophenol (TNP) dans des proportions variables. L'opsonisation, mesurée par cytométrie en flux, par des IgG1 anti-TNP est corrélée à la densité de l'antigène TNP à la surface des érythrocytes. Aux plus faibles densités antigéniques, malgré une opsonisation détectable, peu ou pas d'ADCC n'est observée. Lorsque la densité de l'antigène TNP est plus élevée, le niveau d'ADCC *in vitro* est corrélé à la densité antigénique (Temming *et al.*, 2019). Dans une autre étude, le niveau d'ADCC obtenu *in vitro* avec des IgG1 anti-CD20 et anti-CCR4, et leurs variants afucosylés, est corrélé au niveau d'expression de la cible, dans un modèle où des niveaux d'expression variables de CD20 et CCR4 sont obtenus par transfection de cellules EL4, et l'essai d'ADCC réalisé avec des cellules mononucléaires de sang périphérique provenant de deux donneurs différents (Niwa *et al.*, 2005).

2. L'épitope

L'effet de la nature de l'épitope sur la CDC peut être illustré par les anticorps anti-CD20, la capacité à activer le complément variant entre ces anticorps qui sont tous de sous-classe IgG1. Après fixation, les anticorps anti-CD20 de type I (*e.g.* rituximab, ofatumumab) activent efficacement la voie classique du complément alors que les anticorps de type II (*e.g.* obinutuzumab – GA101) sont relativement inefficaces pour initier la CDC mais sont capables d'induire directement la mort cellulaire par un mécanisme d'adhésion homotypique entraînant un réarrangement du cytosquelette à la membrane et la mobilisation des lysosomes (Alduaij *et al.*, 2011).

Une différence importante entre les anticorps anti-CD20 de type I et de type II est l'épitope reconnu. Bien que les épitopes reconnus par le rituximab et le GA101 se chevauchent, le résidu N171 est important pour la fixation du rituximab alors qu'il impacte peu la fixation du GA101, qui implique le résidu N176. La structure cristallographique du complexe GA101-peptide épitope met en évidence que les variations d'épitope entraînent une orientation différente de GA101 et du rituximab après fixation. Une analyse par microscopie confocale suggère que les contraintes stériques imposées par GA101 pourraient être compatibles avec les molécules CD20 « statiques » présentes dans les régions d'adhésion homotypique plutôt que

celles « mobiles » présentes dans les rafts lipidiques, à l'inverse du rituximab (Niederfellner *et al.*, 2011) (Figure 18).

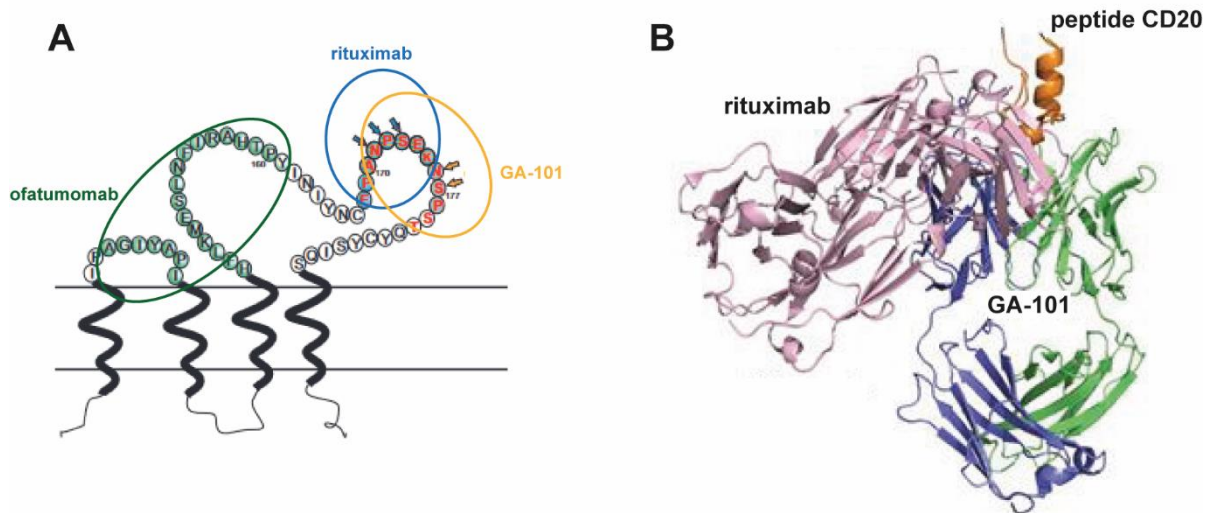


Figure 18 : Illustration de l'effet de l'épitope sur l'orientation de l'anticorps avec l'exemple d'anticorps anti-CD20 (A) Epitopes reconnus par des anticorps anti-CD20 de type I (rituximab et ofatumumab) et de type II (GA-101). Adapté de (Meyer *et al.*, 2018) ; (B) Orientation des Fabs de rituximab et de GA-101 après fixation à un peptide mimant la grande boucle extracellulaire de CD20. D'après (Niederfellner *et al.*, 2011).

Il existe également des variations d'épitope reconnus par les anticorps anti-CD20 de type I qui sont corrélés à des niveaux de CDC différents. La molécule CD20 possède 4 domaines transmembranaires et deux domaines extracellulaires formant une petite boucle de 9 acides aminés et une grande boucle de 44 acides aminés. Une cartographie d'épitope a permis d'identifier une différence entre des IgG entièrement humaines (*i.e.*, Fab et Fc) générés dans des sous transgéniques (dont l'ofatumumab) et le rituximab dont le Fab est murin. L'ofatumumab, ainsi que les autres anticorps entièrement humains, se fixent sur un épitope formé par des résidus d'acides aminés situés à la fois sur la petite boucle extracellulaire et sur la grande boucle extracellulaire. L'épitope reconnu par le rituximab est localisé uniquement sur la grande boucle extracellulaire, de la même façon que les autres anticorps murins testés dans cette étude. Les anticorps dont l'épitope reconnu comprend des résidus d'acides aminés à la fois de la grande boucle et de la petite boucle sont plus efficaces que le rituximab dans un essai de CDC *in vitro*. Les auteurs suggéraient que la fixation sur la petite boucle de CD20 favorise

la CDC par les anticorps anti-CD20 par i. amélioration des interactions entre les régions Fc par un espacement ou une orientation spatiale favorables, ii. rapprochement des Fc de la membrane cellulaire, iii. favorisation de la translocation vers les radeaux lipidiques (Teeling *et al.*, 2004).

3. La distance entre l'épitope et la membrane plasmique

La distance de la cible à la membrane plasmique influence le type de mécanisme effecteur mis en jeu. Afin de tester cette hypothèse, une série de protéines de fusion ont été développées, sans domaine extracellulaire de CD137 ou possédant 1, 4 ou 8 domaines extracellulaires de CD137, éloignant l'épitope de la membrane respectivement de 0,3 nm, 1,5 nm, 8 nm et 16 nm. La capacité du rituximab et du campath-1H à induire la CDC est maximale lorsque l'épitope est distant de 0,3 nm ou 1,5 nm de la membrane. Une tendance à une diminution de l'effet est observée lorsque l'épitope est à 8 nm, alors que le rituximab et le campath-1H sont inefficaces pour déclencher la CDC lorsque la cible est à 16 nm de la membrane plasmique. La même tendance est observée pour l'ADCC. Le rituximab et le campath-1H induisent la lyse par des cellules mononuclées de sang périphériques efficacement lorsque l'épitope est distant de 0,3 nm ou 1,5 nm, moins efficacement lorsque qu'il est à 8 nm et sont inefficaces lorsque l'épitope est situé à 16 nm de la membrane plasmique. A l'inverse, le rituximab et le campath-1H ne déclenchent pas l'ADCP lorsque l'épitope est distant de 0,3 nm de la membrane plasmique alors qu'ils sont efficaces lorsque l'épitope est à 1,5 nm, 8 nm ou 16 nm. Ces résultats *in vitro* sont associés à un meilleur contrôle tumoral *in vivo* lorsque l'épitope est situé à 0,3 nm de la membrane plasmique que lorsque qu'il est distant de 16 nm (Cleary *et al.*, 2017).

La CDC apparaît donc favorisée lorsque l'épitope est proche de la membrane plasmique. La voie classique du complément est autorégulée par la courte demi-vie des composants actifs à tous niveaux de la cascade protéolytique. En étant activés à distance, les composants C2a et C4b ont une probabilité plus faible de se stabiliser sur la membrane plasmique et une probabilité plus élevée de diffuser dans la matrice extracellulaire. En conséquence, l'efficacité de formation du complexe C3 convertase et donc du complexe d'attaque membranaire est diminuée (Cleary *et al.*, 2017).

Pour l'ADCP, une distance minimale entre l'épitope et la membrane semble requise. La phagocytose implique une réorganisation intracellulaire importante pour la formation du

phagosome. Il est probable que ce processus nécessite une interaction plus stable entre les Fc γ R et les IgG opsonisées. Lorsque l'épitope est proche de la membrane, un encombrement stérique pourrait se produire avec les protéines à la surface du phagocyte, déstabilisant la liaison Fc γ R-IgG, et ainsi diminuant l'efficacité de l'ADCP (Cleary *et al.*, 2017).

Par ailleurs, dans les macrophages, la diffusion latérale des Fc γ R est inhibée par la protéine transmembranaire CD44, immobilisée par le cytosquelette d'actine, formant des « piquets » transmembranaires. D'autre part, CD44 se lie à l'acide hyaluronique dans le glycocalyx, formant une maille qui limite d'autant plus la diffusion latérale des Fc γ R et qui impose également des contraintes stériques pour la fixation des complexes immuns, la taille des Fc γ R étant limitée (5 nm) (Freeman *et al.*, 2018).

De la même façon que la CDC, la lyse cellulaire par ADCC est favorisée lorsque l'épitope est proche de la membrane plasmique. L'activation et la libération des granules lytiques par les lymphocytes NK implique la formation d'une synapse immunologique, analogue à celle mise en œuvre par les lymphocytes T cytotoxiques (Cullen and Martin, 2008). Au niveau de la synapse immunologique des lymphocytes T, le contact étroit entre les complexes TCR-CD3 et CMH-peptide excluent les molécules avec un large domaine extracellulaire, dont la tyrosine phosphatase CD45, augmentant la phosphorylation des motifs ITAM et la cascade de signalisation, dans un modèle appelé « ségrégation cinétique ». La synapse des lymphocytes T doit être inférieure à 14 nm pour exclure les molécules inhibitrices (Choudhuri *et al.*, 2005).

L'effet de la distance entre l'épitope et la membrane plasmique sur l'ADCP a été également associé avec l'exclusion de CD45 dans un modèle de microbilles recouvertes d'une bicouche lipidique supportée par un fluide, contenant des antigènes situés à 5.0, 8.9, 11.00 ou 12.2 nm de la membrane plasmique, formés par la répétition respectivement de 1, 3, 5 ou 7 domaines extracellulaires Fibcon (domaine inspiré de la fibronectine III). La phagocytose par les macrophages est maximale lorsque le domaine extracellulaire est proximal (5.0 nm), diminuée pour l'antigène de 8.9 nm et absente pour les antigènes de 11.0 et 12.2 nm. L'engagement des IgG fixés sur l'antigène à 5.0 nm de la membrane par les macrophages provoque la ségrégation de CD45, à l'écart de la synapse immunologique, associée à la phosphorylation des motifs ITAM des Fc γ R, ce qui n'est pas le cas avec les antigènes situés à

plus de 10 nm de la membrane plasmique. L'exclusion de CD45 est effective pour les antigènes de taille inférieure à celle de CD45. Un variant de CD45 plus proche de la membrane, obtenu par CRISPR/Cas9 (7 nm), abolit la phagocytose de microbilles contenant l'antigène de 5.0 nm (Bakalar *et al.*, 2018).

4. La localisation dans les radeaux lipidiques

Situés dans la bicouche lipidique des membranes cellulaires, les radeaux lipidiques sont des microdomaines lipidiques et protéiques, riches en cholestérol et en sphingolipides, petits (10-200 nm), hétérogènes et dynamiques. Ils facilitent les processus cellulaires par la colocalisation des récepteurs et des molécules effectrices, servant de plateformes pour la transduction des signaux (Pike, 2006).

Dans un modèle de lignée cellulaire BCL1-3B3 transfectée pour exprimer CD20 étiqueté par la YFP, les anticorps anti-CD20 humains et murins efficaces pour lyser les cellules par CDC (incluant le rituximab) provoquent un regroupement important des molécules CD20 dans des clusters alors que les anticorps inefficaces (clone B1) ne causent qu'une redistribution minimale de CD20. Une analyse par FRET permet de confirmer le regroupement des anticorps anti-CD20 efficaces pour la CDC contrairement aux autres. Lorsque des lignées cellulaires sont incubées avec des anticorps anti-CD20 puis traitées par le Triton X-100 (qui solubilise la membrane plasmique en dehors des radeaux lipidiques), les anticorps anti-CD20 efficaces sont détectables par cytométrie en flux, contrairement aux anticorps inefficaces, indiquant qu'ils sont localisés dans les rafts lipidiques (Cragg *et al.*, 2003).

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer pourquoi la capacité des anticorps à induire efficacement la CDC est corrélée à leur capacité à déplacer les antigènes cibles dans les radeaux lipidiques. La première est que la concentration des anticorps dans une zone relativement petite de la membrane plasmique pourrait apporter une densité optimale de parties Fc juxtaposées pour la liaison au C1q initiant la voie classique du complément. Une autre possibilité est que l'environnement riche en cholestérol des radeaux lipidiques apporte un avantage pour la CDC, à travers le dépôt de C3 ou parce que la rigidité de la membrane plasmique favorise la pénétration par le complexe d'attaque membranaire et/ou limite son internalisation (Cragg *et al.*, 2003).

5. Modulation antigénique

Après fixation, les anticorps déplétant sont susceptibles d'être internalisés avec la cible, diminuant la densité antigénique à la surface de la cellule. Ce phénomène de « modulation antigénique » a été mis en évidence à la fois *in vitro* et *in vivo* et dans un modèle basé sur les anticorps anti-CD20. En utilisant un modèle murin de transfert passif de lymphocytes B exprimant le CD20 humain marqués au CFSE, dans des souris invalidées pour les FcγR (pour éliminer l'effet de la déplétion), le traitement avec un anticorps de type I (rituximab) induit 80% à 90% de réduction du niveau de CD20 sur les lymphocytes B, ce qui n'est pas le cas avec un anticorps de type II (tositumomab). Cela suggère que la modulation de l'expression de CD20 à la surface cellulaire est un phénomène intrinsèque aux lymphocytes B, indépendamment des FcγR. Une internalisation du rituximab avec CD20, et non du tositumomab, est mise en évidence *in vitro* et *in vivo* par une technique d'extinction de fluorescence. Une analyse ultérieure permettait de localiser le rituximab dans les endosomes précoces et les lysosomes après internalisation (Beers *et al.*, 2010).

Le phénomène de modulation antigénique a également été observé avec le muromonab-OKT3, anticorps monoclonal dirigé contre le CD3 indiqué dans la prévention du rejet de greffe rénale. Muromonab-OKT3 induit une déplétion profonde des lymphocytes T. Deux à cinq jours post-transplantation, des cellules lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ sont détectables dans le sang des patients. *In vitro*, les lymphocytes T prélevés commencent à ré-exprimer CD3 après 8h de culture et tous les lymphocytes T sont CD3⁺ après 20h (Chatenoud *et al.*, 1982).

Certains anticorps déplétant peuvent induire une modulation profonde et rapide de la cible à la surface cellulaire, résultant en deux effets concomitants : i. une réduction de l'élimination des cellules cibles, ii. une augmentation de la consommation de l'anticorps thérapeutique par internalisation. La modulation antigénique semble dose-dépendante et n'est effective que lorsque l'anticorps est présent de façon continue. L'administration répétée des anticorps thérapeutiques permet de surpasser le problème de la modulation antigénique, à condition que la cible reste présente à un niveau suffisant sur la surface cellulaire pour déclencher les mécanismes effecteurs.

Partie 3 : Les nanobodies

A. Les IgG des camélidés

La famille des camélidés comprend les chameaux (*Camelius dromedarius* -dromadaires- et *Camelius bactrianus* -chameaux-) les lamas (*Lama glama* et *Lama guanicoe*) et les alpagas (*Vicugna vicugna* et *Vicugna pacos*) (Muyldermans, 2013).

En 1993, Hamers-Castermann *et al.* ont identifié que le sérum de dromadaires contenait trois fractions : IgG1, IgG2 et IgG3. La fraction IgG1 correspond à des anticorps conventionnels, contenant les chaînes lourdes de 50 Kda et les chaînes légères de 30 Kda, alors que les fractions IgG2 et IgG3 contiennent une seule chaîne lourde, respectivement de 46 Kda et 43 Kda. Ces anticorps à chaîne lourde sont abondants dans le sérum de camélidés, représentant 75% des molécules retenues par la protéine A (Hamers-Casterman *et al.*, 1993) (Figure 19).

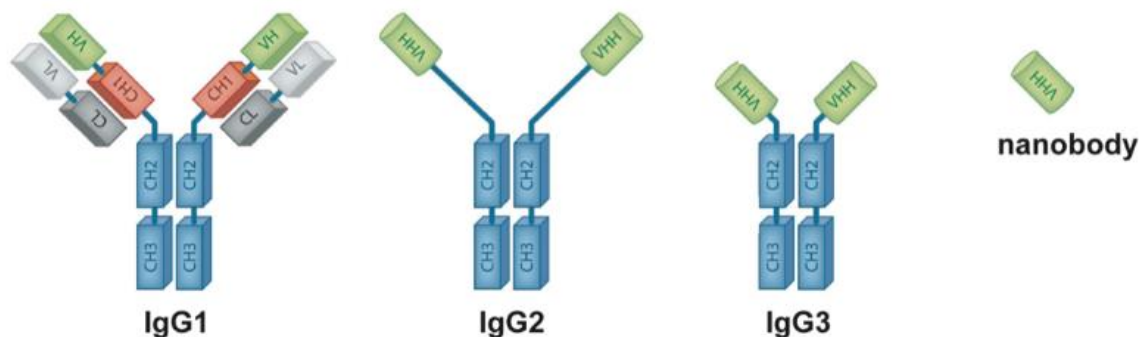


Figure 19 : Représentation schématique des IgG présentes dans le sérum des camélidés. Les IgG1 sont des anticorps conventionnels contenant deux chaînes légères et deux chaînes lourdes. Les IgG2 et IgG3 sont dépourvues de domaine CH1 et de chaîne légère, leur domaine variable est appelé VHH. La région charnière des IgG2 est plus longue que celles des IgG3. Le domaine VHH sous forme recombinante est appelé anticorps à chaîne unique ou nanobody. Adapté de (Muyldermans, 2013)

Les anticorps à chaîne lourde des camélidés sont dépourvus de chaîne légère et ne possèdent pas de domaine CH1. Dans la partie N-terminale, la chaîne lourde de ces protéines homodimériques contient le domaine variable de 15 Kda, dénommé VHH. Le domaine VHH est relié au domaine CH2 par une région charnière comprenant 35 acides aminés pour les IgG2 et 12 acides aminés pour les IgG3 (Hamers-Casterman *et al.*, 1993).

Le locus H humain sur le chromosome 14 comprend de multiples segments V_H , D et J_H en amont des gènes codant pour la partie constante de la chaîne lourde (*IGHM*, *IGHD*, *IGHG*, *IGHE* et *IGHA*). Les camélidés possèdent des segments géniques dédiés à la génération de VHH (V_{HH}) en plus des segments V_H . Durant la lymphopoïèse, le réarrangement VDJ peut impliquer V_H ou V_{HH} . De la même façon que chez l'homme, les CDR-1 et CDR-2 sont codées par le segment V_H (ou V_{HH}), et CDR-3 par V_H (ou V_{HH}), D et J_H (Conrath *et al.*, 2003).

Chez l'homme, après recombinaison VDJ, le domaine VH est exprimé avec une chaîne lourde μ , puis après commutation isotypique, avec une chaîne constante γ dans le cas des IgG. Les gènes des immunoglobulines contiennent des introns et des exons, qui sont éliminés par épissage de l'ARNm. Les camélidés possèdent des gènes IGHG dédiés à la génération d'anticorps conventionnels et d'autres qui produiront des anticorps à chaîne unique. Ces derniers possèdent la séquence nucléotidique pour le domaine CH1, mais une mutation ponctuelle (G vers A) entraîne l'épissage de CH1 (Achour *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 1999).

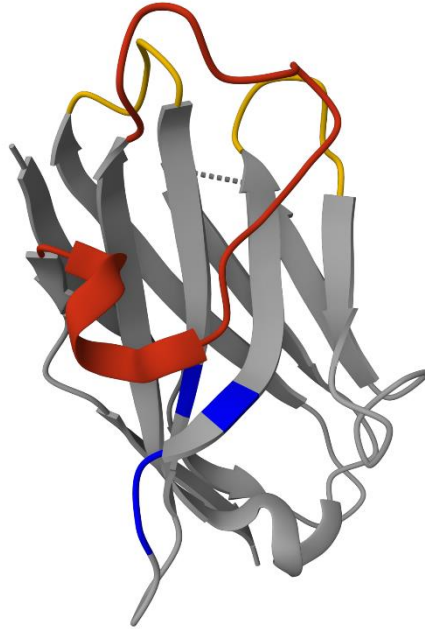
Les VHH recombinants sont appelés anticorps à chaîne unique, ou nanobodies en référence à leur petite taille, de l'ordre du nanomètre (Bannas *et al.*, 2017).

Certains requins produisent également des anticorps à chaîne lourde, dépourvus de chaîne légère et de domaine CH1, les immunoglobulines NAR (« new antigen receptor »), qui reconnaissent l'antigène par un seul domaine variable (V-NAR) (English *et al.*, 2020).

B. Structure des VHH

Le VHH a une structure proche du domaine VH des immunoglobulines humaines. Il forme un repliement immunoglobuline formé par deux feuillets β , le premier formé par 4 brins β (A, B, D et E) et l'autre formé par 5 brins β (G, F, C, C' et C''). Les CDR1, CDR2 et CDR3

correspondent respectivement aux boucles BC, C'C'' et FG ([Figure 20](#)). Le pont disulfure canonique du domaine immunoglobuline relie les brins B et F.



[Figure 20](#) : Structure tridimensionnelle d'un VHH. La boucle CDR3 est colorée en rouge, les boucles CDR1 et CDR2 en jaune. Les résidus d'acides aminés colorés en bleu sont les résidus Phe37, Glu44, Arg45 et Gly47 contribuant à la solubilité des nanobodies (PDB : 4KRN).

L'appariement des domaines VH et VL des anticorps conventionnels est assuré par une interface hydrophobe entre les deux domaines permettant d'ordonner les CDR-H et CDR-L pour former le paratope. Cette interface implique notamment les résidus conservés V37, G44, L45 et W47 dans la région FR2 (Chothia *et al.*, 1985). Dans le VHH, ces résidus sont remplacés par des résidus dont la chaîne latérale est plus petite et/ou hydrophile (F37, E44, R45 et G47) abolissant toute interaction avec un domaine VL (Vu *et al.*, 1997). Ces résidus confèrent au VHH une meilleure solubilité. VH en l'absence de VL a tendance à s'agréger en solution au travers de la zone d'interface avec VL et la substitution de résidus FR2 de VH par des résidus de VHH augmente sa solubilité (Davies and Riechmann, 1994). A l'inverse, des mutations

Y37V, E44G, R45L d'un VHH pour reproduire la région FR2 de VH confère au VHH la capacité de s'apparier avec des chaînes VL (Conrath *et al.*, 2005).

Les VHH possèdent généralement une grande boucle CDR3. Une analyse de 217 complexes VHH-antigène a mis en évidence que les régions CDR1 et CDR2 possèdent généralement 7 résidus alors que CDR3 en possède 15 (Zavrtanik *et al.*, 2018). Chez l'homme et la souris, CDR-H3 contient respectivement 12 et 9 résidus (Wu *et al.*, 1993). Les VHH possèdent également une région CDR1 étendue par rapport à VH (Nguyen *et al.*, 2000). Généralement, la boucle CDR3 se replie sur la zone de FR2 correspondant à l'interface avec VL dans VH, formant une petite zone hydrophobe inaccessible aux solvants et contribuant à la stabilité du VHH (Bond *et al.*, 2003).

Alors que plus de la moitié des interactions avec l'épitope impliquent des résidus de CDR3, 20% impliquent CDR2, 10% CDR1 et 10 à 20 % des interactions sont médiées par les régions FR. Celles-ci impliquent notamment les résidus N-terminaux précédant le brin β A, des résidus de FR2 (brins C, C' et boucle CC'), de FR3 (boucle C''D) et de la boucle DE (Zavrtanik *et al.*, 2018).

En plus de la cystine formée entre les brins B et F, les VHH peuvent former des ponts disulfures inter-boucles non canoniques. Le plus commun est un pont disulfure formé entre les régions CDR1 et CDR3. Un pont disulfure peut également se former entre FR2 et CDR3 et certains VHH possèdent des ponts disulfures intra-boucles dans CDR3 (Conrath *et al.*, 2003). Ces ponts disulfures additionnels contribuent à la stabilité du VHH (Mendoza *et al.*, 2020).

C. Propriétés des nanobodies

I. Affinité et spécificité

Les nanobodies possèdent une affinité similaire à celles des anticorps conventionnels. Les bibliothèques de VHH générées après immunisation de camélidés avec des antigènes protéiques permettent d'isoler des nanobodies avec haute affinité (K_d de l'ordre de 10^{-9} M), similaire à celle d'anticorps conventionnels obtenus après une seconde exposition à l'antigène (Foote and Milstein, 1991; Riechmann and Muyldermans, 1999). Des formes dimériques de nanobodies permettent d'augmenter l'avidité du complexe (Debie *et al.*, 2020).

Les nanobodies sont également très spécifiques, de la même façon que les anticorps conventionnels. A titre d'exemple, des nanobodies dirigés contre le récepteur P2X7 de souris, obtenus après immunisation de lamas ne se fixent pas sur la protéine orthologue humaine, ni sur les récepteurs P2X1 et P2X4 murins qui sont les paralogues les plus proches de P2X7 (Danquah *et al.*, 2016).

II. Faible immunogénicité

Les nanobodies semblent être faiblement immunogènes. Après six injections sous-cutanées hebdomadaires d'un VHH anti-EGFR à des souris Jcl:ICR, un titre très faible d'IgG anti-VHH est détecté en ELISA. Au contraire, des agrégats de VHH isolés de la fraction insoluble de lysats d'*E.coli* (1846 nm), ou produits par remaniement des ponts disulfures (1951 nm) génèrent une réponse humorale (Kibria *et al.*, 2020).

Le profil de risque d'immunogénicité de deux nanobodies non humanisés en essai clinique de phase II, l'un dirigé contre EGFR et l'autre contre MMR (« *Macrophage Mannose Receptor* »), a été analysé *in vitro*. Après capture des nanobodies, les cellules dendritiques sont peu activées (faible expression de CD80, CD83, CD86, CD40 et HLA-DR) en comparaison à des IgG murines, et le KLH (« keyhole limpet hemocyanin ») et LPS (lipopolysaccharides) comme contrôles positifs. Ces cellules ne sécrètent pas d'IL-12, d'IL-6 de TNF- α , ni d'IL-10 et n'induisent que faiblement la prolifération des lymphocytes T (Ackaert *et al.*, 2021).

Des propriétés intrinsèques des nanobodies contribuent à leur faible immunogénicité, incluant leur petite taille, qui diminue *ipso facto* le nombre d'épitopes potentiellement immunogènes, et leur stabilité qui limite la formation d'agrégats connus pour contribuer à l'immunogénicité des protéines thérapeutiques (Lundahl *et al.*, 2021). De plus, les séquences germinales des gènes *IGHV* des camélidés possèdent une forte homologie avec les séquences germinales des gènes *IGHV*, *IGVL* et *IGVK* chez l'homme (Klarenbeek *et al.*, 2015).

Les nanobodies peuvent être "humanisés" par mutation de résidus des régions FR, notamment de la région FR2 qui diffère le plus entre VH et VHH (Vincke *et al.*, 2009). Le bénéfice de l'humanisation des nanobodies pour limiter leur immunogénicité n'est pas évident, les nanobodies étant intrinsèquement peu immunogènes. L'introduction de séquences humaines peut en revanche diminuer leur stabilité et leur tendance à s'agréger (Rossotti *et al.*, 2022).

I. Modularité

La structure à chaîne unique des nanobodies leur confère la propriété d'être facilement reformatés. Ils peuvent être associés à des étiquettes His6, c-myc ou hémagglutinine pour faciliter leur purification et/ou leur détection (Muyldermans, 2021). La fusion de deux nanobodies identiques connectés par un linker peptidique (*e.g.* un linker flexible glycine-sérine-GS-) permet d'obtenir une molécule bivalente avec une plus grande avidité pour l'antigène (Els Conrath *et al.*, 2001). Des formes trimériques, tétramériques et pentamériques ont également été développées (Huet *et al.*, 2014).

Des formats bispécifiques de nanobodies sont obtenus par fusion de deux monomères dirigés contre deux antigènes différents. Ces molécules peuvent cibler deux antigènes différents à la surface de la cellule et agir de façon synergique (Hao *et al.*, 2022; Zhu *et al.*, 2017). Des constructions biparatopiques sont obtenues par fusion de deux nanobodies dirigés contre deux épitopes distincts du même antigène. Cette stratégie a été appliquée à des nanobodies anti-EGFR et anti-CD38 (Roovers *et al.*, 2011; Schütze *et al.*, 2018). La fusion d'un anticorps anti-HER2 à un nanobody anti-FcγRIIIA permet de former une construction "bispecific NK-cell engager" ("BiKE") et la fusion de nanobodies anti-EGFR et anti-EpCAM à un scFv anti-CD3 forme une construction "trispecific T-cell engager" ("TriTE") (Kasuya *et al.*, 2010; Tapiagalisteo *et al.*, 2022).

La petite taille des nanobodies est propice à une bonne pénétration tissulaire mais peut être délétère en terme de pharmacocinétique (Cortez-Retamozo *et al.*, 2002). Après injection, les nanobodies ont un temps de demi-vie plasmatique de l'ordre de quelques heures, les molécules dont la taille est inférieure à 60-70 Kda étant généralement éliminées rapidement par clairance rénale (Sargentini-Maier *et al.*, 2019). La demi-vie des nanobodies peut être augmentée par l'ajout d'un nanobody anti-albumine à la construction. L'ajout d'un nanobody anti-albumine à une construction bivalente anti-EGFR augmente le temps de résidence dans le sang, permettant d'améliorer la pénétration dans la tumeur d'un facteur 25 dans un modèle de xénogreffe de carcinome épidermoïde vulvaire (Tijink *et al.*, 2008).

Il est également possible de fusionner un nanobody à un fragment Fc pour reproduire les anticorps à chaîne lourde des camélidés. Le fragment Fc permet d'augmenter la demi-vie de la construction, mais également l'engagement des mécanismes effecteurs selon la sous-classe.

Cette stratégie a été appliquée à des nanobodies anti-EGFR et anti-CXCR4 fusionnés à un Fc d'IgG1 (Bobkov *et al.*, 2018; Tintelnot *et al.*, 2019).

II. Accessibilité à des épitopes inaccessibles aux anticorps conventionnels

Le paratope des anticorps conventionnels forme une cavité, une fente ou une surface plane (Webster *et al.*, 1994). Les haptènes ont tendance à s'insérer dans les cavités des paratopes, les peptides dans les fentes, et les antigènes plus larges à interagir avec des paratopes plans (Riechmann and Muyldermans, 1999). Les nanobodies ont également la capacité de former des paratopes convexes et la région CDR3 peut former une boucle proéminente, conférant aux nanobodies la capacité d'interagir avec des cavités à la surface de l'antigène (Muyldermans, 2013) (Figure 21).

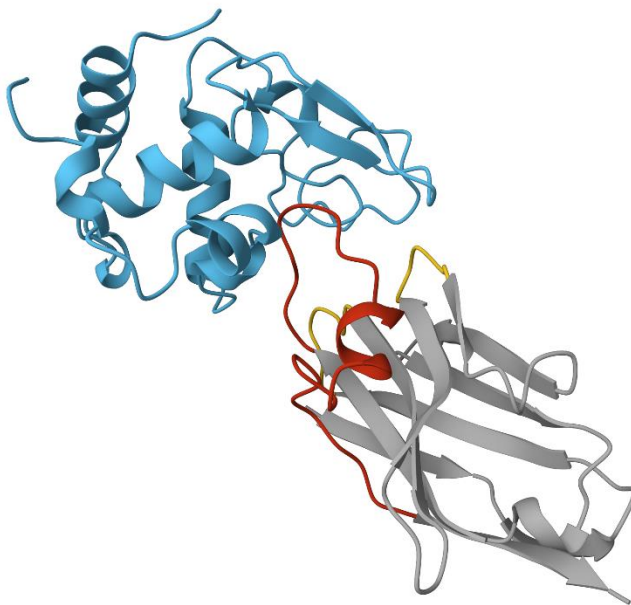


Figure 21 : Structure tri-dimensionnelle d'un VHH interagissant avec le lysozyme. La boucle CDR3 (rouge) du VHH (gris) est saillante au-delà de la surface d'interaction avec le lysozyme (bleu) et s'insère profondément dans son site actif. Les boucles CDR1 et CDR2 sont en jaune. Le lysozyme est en bleu. PDB : 1MEL

Ces cavités correspondent généralement aux régions fonctionnelles des protéines (*i.e.* le site actif, le site de fixation au ligand ou des sites allostériques), conférant aux nanobodies la

propriété de moduler des activités biologiques (Koch-Nolte *et al.*, 2019). Des nanobodies obtenus après immunisation d'un dromadaire inhibent l'activité enzymatique de l' α -amylase (IC50 de 1,5 μ M et 2 μ M respectivement pour deux VHH testés) et celle de l'anhydrase carbonique (IC50 de 10 μ M et 25 μ M) (Lauwereys *et al.*, 1998). Dans une étude s'intéressant au mécanisme d'action de nanobodies inhibiteurs d'EGFR, les auteurs ont mis en évidence qu'un nanobody (7D12) inhibe l'EGFR en se fixant sur le site de fixation au ligand, de la même façon que l'anticorps monoclonal cetuximab alors que deux autres nanobodies (EgA1 et 9G8) n'interfèrent pas avec la fixation du ligand. Le paratope convexe et la grande boucle CDR3 d'EgA1 et 9G8 interagissent avec un épitope cryptique situé entre les domaines II et III d'EGFR, imposant un blocage stérique qui empêche l'EGFR d'adopter la conformation nécessaire à sa dimérisation et à sa signalisation (Schmitz *et al.*, 2013). De la même façon, la structure cristallographique d'un nanobody inhibant l'activité de la dihydrofolate réductase (DHFR) démontre qu'il se fixe sur un site allostérique de l'enzyme, stabilisant une conformation dans laquelle elle ne peut pas se lier au cofacteur NADPH nécessaire à son activité (Oyen *et al.*, 2011).

D. Nanobodies anti-P2X7 et anti-ARTC2.2

I. Le récepteur P2X7 et l'ectoenzyme ARTC2.2

Le récepteur P2X7 fait partie de la famille des récepteurs purinergiques, qui inclue les récepteurs P1 à l'adénosine, et les récepteurs P2 qui reconnaissent les nucléotides puriques et pyrimidiques, dont les récepteurs métabotropiques associés aux protéines G P2Y et les récepteurs ionotropiques P2X (Burnstock, 2018). L'adénosine 5'-triphosphate (ATP) extracellulaire est le ligand physiologique des récepteurs P2X. P2X1, P2X2, P2X3 et P2X4 sont activés par de faibles quantités d'ATP alors que P2X7 a un seuil d'activation plus élevé, de l'ordre du millimolaire.

Chez l'homme et chez la souris, P2X7 est une protéine homotrimétrique de 195 Kda. Chaque sous-unité de 595 acides aminés comprend un domaine extracellulaire volumineux (269-288 acides aminés), deux hélices transmembranaires (TM1 et TM2) et des extrémités N- et C-terminales intracellulaires (Di Virgilio *et al.*, 2018) (Figure 22). Chaque région TM1 est située vers l'extérieur alors que les régions TM2 sont situées vers l'intérieur de la partie

transmembranaire de P2X7 et sont responsables de la formation du canal ionique. Trois poches de liaison à l'ATP sont situées aux interfaces des parties extracellulaires des sous-unités. La fixation de l'ATP sur ces sites entraîne des changements conformationnels de la partie extracellulaire ouvrant le canal ionique formé par les trois régions TM2 (Karasawa and Kawate, 2016).

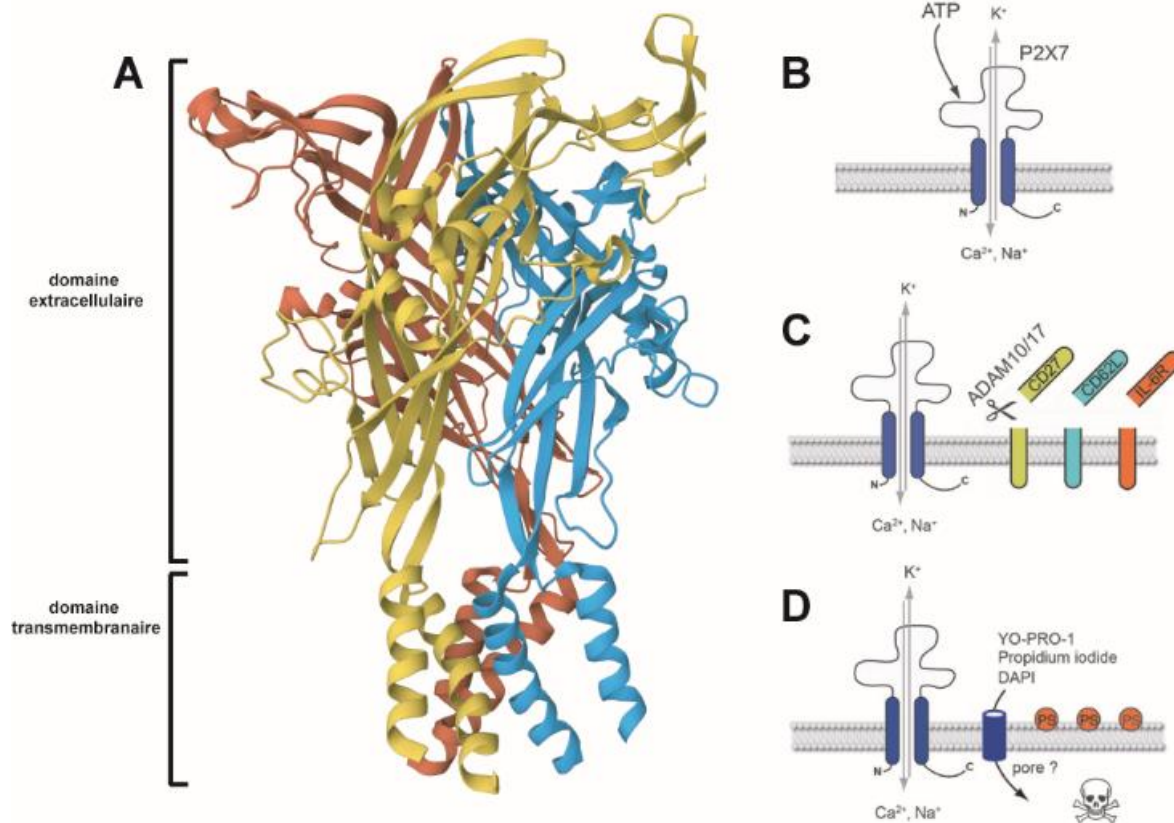


Figure 22 : Structure tridimensionnelle de P2X7 et représentation schématique de l'activation de P2X7 par l'ATP. (A) P2X7 est une protéine homotrimerique de 195 Kda. Les 3 sous-unités sont représentées en rouge, bleu et jaune. Les extrémités N- et C-terminales intracellulaires ne sont pas représentées (PDB : 5U1L). (B) L'ATP extracellulaire en quantité suffisante (100 μ M) entraîne l'ouverture du canal ionique et l'influx de Na^+ et de Ca^{2+} , ainsi que l'efflux de K^+ (C) L'activation de P2X7 déclenche l'activation des métalloporotéases ADAM10 et ADAM17 qui catalysent la perte de CD27, de CD62L et d'IL6R. (D) L'activation de P2X7 entraîne l'externalisation des phosphatidylsérines, la formation d'un pore non sélectif permettant la pénétration de molécules fluorescentes, et finalement la mort cellulaire. (B, C, D) Adapté de (Rissiek *et al.*, 2015).

P2X7 est largement exprimé les cellules de la lignée hématopoïétique ainsi que sur différents types de cellules gliales, épithéliales et endothéliales (Kaczmarek-Hajek *et al.*, 2018). Sur les lymphocytes T, l'activation de P2X7 par l'ATP entraîne un influx de Na⁺, de Ca²⁺ et un efflux de K⁺, l'externalisation des phosphatidylsérines sur le feuillet externe de la membrane plasmique et l'activation des métalloprotéases ADAM10 et ADAM17 qui catalysent la perte de protéines de surface dont CD62L, CD27 et l'IL-6R. L'activation prolongée de P2X7 induit la formation d'un pore non sélectif, permettant le passage de marqueurs de l'ADN fluorescents dont l'iodure de propidium et le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI), et qui provoque finalement la mort cellulaire (Rissiek *et al.*, 2015).

Chez la souris, P2X7 peut également être activée par un mécanisme indépendant de l'ATP impliquant l'ecto-ADP-ribosyltransférase ARTC2.2. La famille des mono-ADP-ribosyltransférases (ART) comprend 6 membres chez la souris, ARTC1-5, dont deux isoformes d'ARTC2. ARTC2.1 est inactive en l'absence d'agents réducteurs alors que l'activité enzymatique d'ARTC2.2 est maintenue dans des conditions standards. Chez l'homme, des codons stop rendent inactif le gène codant pour ARTC2 (Haag *et al.*, 1994).

ARTC2.2 est une protéine monomérique de 35 Kda, ancrée à la membrane par un groupement GPI, dont la localisation dans les rafts lipidiques a été suggérée dans un modèle de lignée cellulaire transfectée avec la version native d'ARTC2.2 et un variant avec le domaine transmembranaire et la partie intracellulaire de CD8. Dans cette étude, P2X7 était associé, au moins partiellement, avec les rafts lipidiques (Bannas *et al.*, 2005). Une étude ultérieure a mis en évidence que la localisation de P2X7 dans les rafts lipidiques dépend de la palmitoylation de sa partie C-terminale intracellulaire (Gonnord *et al.*, 2009).

En présence de son substrat, le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) extracellulaire, ARTC2.2 catalyse le transfert d'un résidu ADP-ribose sur de multiples protéines membranaires, dont P2X7. L'ADP-ribosylation de P2X7 provoque son activation durable, même après une exposition brève à des concentrations relativement faibles de NAD⁺, de l'ordre du nanomolaire (Figure 23). Ce processus, qui peut survenir à 4°C, a été appelé mort cellulaire induite par le NAD⁺ (NICD : « *NAD induced cell death* ») (Seman *et al.*, 2003). La NICD a un rôle important, à la fois *ex vivo* pour la préparation des échantillons et *in vivo* pour

la régulation des cellules qui expriment P2X7 et ART2 à haut niveau, dont les lymphocytes T régulateurs (Tregs), invariants NKT, auxiliaires folliculaires (*Follicular Helper*, Tfh) et résidents mémoire (T_{rm}) (Borges da Silva *et al.*, 2019; Rissiek *et al.*, 2014; Georgiev *et al.*, 2018; Hubert *et al.*, 2010).

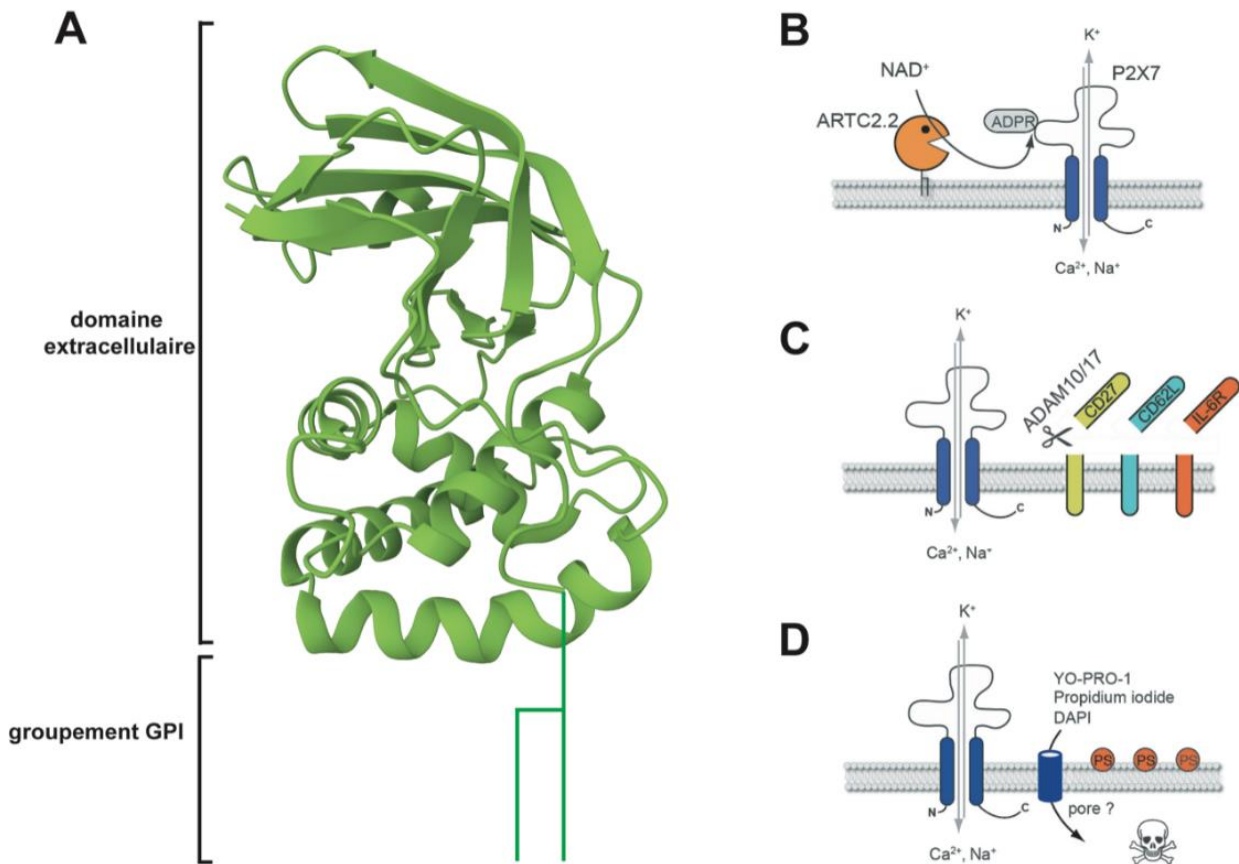


Figure 23 : Structure tridimensionnelle d'ARTC2.2 et représentation schématique de l'activation de P2X7 par ARTC2.2. (A) ARTC2.2 est une protéine monomérique de 35 Kda ancrée à la membrane par un groupement GPI (PDB : 1OG3). (B) ARTC2.2 catalyse l'ADP-ribosylation covalente de P2X7 en présence de NAD⁺ entraînant l'ouverture du canal ionique et l'influx de Na⁺ et de Ca²⁺, ainsi que l'efflux de K⁺ (C) L'activation de P2X7 déclenche l'activation des métalloprotéases ADAM10 et ADAM17 qui catalysent la perte de CD27, de CD62L et d'IL6R. (D) L'activation de P2X7 entraîne l'externalisation des phosphatidylsérines, la formation d'un pore non sélectif permettant la pénétration de molécules fluorescentes, et finalement la mort cellulaire. (B, C, D) Adapté de (Rissiek *et al.*, 2015).

II. Nanobodies anti-P2X7

Des nanobodies ciblant P2X7 ont été sélectionnés par phage display à partir de lamas immunisés soit avec des cellules HEK transfectées pour exprimer P2X7 de souris, soit avec des vecteurs plasmidiques codant pour P2X7 de souris (incluant un rappel avec des cellules HEK transfectées). Les nanobodies sélectionnés ont été évalués pour leur capacité à moduler l'activité de P2X7 sur des cellules de lymphome de souris Yac-1 transfectées pour exprimer P2X7 de souris, incubées avec de l'ATP ou du NAD⁺ (Tableau 1). Certains nanobodies augmentent (modulateurs allostériques positifs) ou bloquent (antagonistes) l'activité de P2X7. D'autres se fixent sur P2X7 mais ne modulent pas son activité (*e.g.* 7E2). Le nanobody 13A7 est le plus puissant bloqueur de la fonction de P2X7 et 14D5 le plus puissant modulateur allostérique positif. L'administration *in vivo* des formes dimériques associées un nanobody anti-albumine formant des structures *dimer-HLE* (*HLE* : « *half-life extended* ») a permis d'identifier que 13A7 réduit l'inflammation dans des modèles de dermatite allergique et de glomérulonéphrite. A l'inverse, 14D5 aggrave les scores cliniques dans ces deux modèles (Danquah *et al.*, 2016)

Tableau 1 : Classification des nanobodies anti-P2X7 en fonction de leur capacité à moduler (augmenter ou bloquer) ou non l'activité de P2X7. (¹bloquent la perte de CD62L après incubation avec du NAD⁺ ; ²antagoniste pour P2X7 murin et humain). D'après (Danquah *et al.*, 2016).

Activité sur P2X7	Modulateurs allostériques positifs	Antagonistes	Peu ou pas d'effet
Clones	14D5, 7G5, 13G5, 7E8, 13G4, 7B4, 13F6, 7D5,	13A7, 8G11, 13G9, 7H6, 1C81 ²	7E2, 8E7 ¹ , 13B8 ¹ 7A4, 6B7 ¹ , 13B5 ¹

III. Nanobodies anti-ARTC2.2

Des nanobodies anti-ARTC2.2 ont été isolés par phage display à partir d'un lama immunisé par un vecteur plasmidique codant pour ARTC2.2 avec des rappels réalisés avec la protéine recombinante (Tableau 2). Les nanobodies s-14, s+16a, s+16b et l-17 se fixent de façon spécifique et avec une bonne affinité (Kd entre 37,7 et 55.5 nM) sur des cellules EL4 transfectées pour ARTC2.2. Après incubation avec s+16a, s+16b, l-17, les lymphocytes T murins sont protégés de la NICD, alors qu'ils ne le sont pas après incubation avec s-14 (Koch-Nolte *et al.*, 2007). L'injection intraveineuse de s+16a protège les Tregs de la NICD (Hubert *et al.*, 2010).

Tableau 2 : Classification des nanobodies anti-ARTC2.2 en fonction de leur capacité à bloquer ou non l'activité d'ARTC2.2. D'après (Koch-Nolte *et al.*, 2007).

Activité sur ARTC2.2	Antagonistes	Peu ou pas d'effet
Clones	s+16a, s+16b, l-17	s-14

IV. Constructions basées sur les nanobodies anti-P2X7 et anti-ARTC2.2.

Dans ce projet, les nanobodies anti-P2X7 et anti-ARTC2.2 ont été recomposés en différents formats (Figure 24).

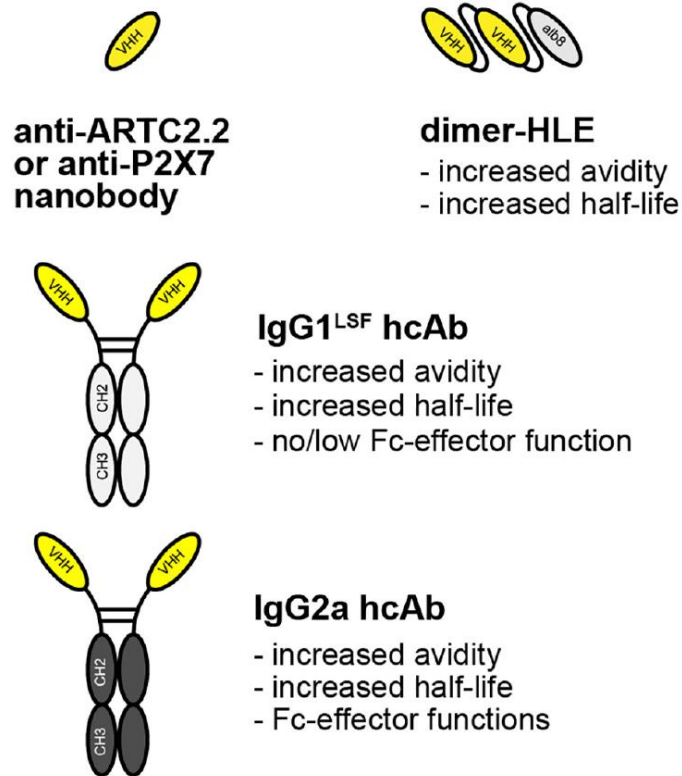


Figure 24 : Représentation schématique des constructions biologiques basées sur les nanobodies utilisées dans ce projet. Les nanobodies spécifiques de P2X7 ou d'ARTC2.2 peuvent être recomposés sous la forme de dimères bivalents fusionnés au nanobody anti-albumine Alb8 (dimHLE) ou sous la forme d'anticorps à chaîne lourde (HcAb) par fusion à un fragment Fc d'IgG de souris. La partie Fc peut être de sous classe mIgG1 portant les mutations LSF (T252L, T254S, T256F) pour obtenir des HcAb engageant peu ou pas les fonctions effectrices ou de sous classe mIgG2a pour induire la déplétion cellulaire.

Le format « dimère à demi-vie étendue » (*dimHLE : dimer half-life extended*) consiste en la fusion de deux nanobodies identiques liés par une séquence peptidique 35-GS (GGGGS)₇ à un nanobody anti-albumine (clone Alb8) par un lien 9-GS (GGGSGGGS). Ce format permet ainsi d'augmenter à la fois l'avidité et la demi-vie des nanobodies. Une autre approche utilisée consiste à fusionner un nanobody à la région charnière et à la partie Fc d'IgG conventionnelles par l'intermédiaire d'un peptide de 5 acides aminés (GGGGS) pour obtenir un format anticorps à chaîne lourde (*HcAb : heavy-chain antibody*). De la même façon que le format dimHLE, le format HcAb permet d'augmenter l'avidité et la demi-vie, cette dernière pouvant être davantage augmentée par l'introduction des mutations LSF (T252L, T254S, T256F) dans le domaine CH2

d'une partie Fc d'isotype mIgG1 (Ghetie et al., 1997). Des constructions biologiques déplétantes peuvent être obtenues par la fusion de nanobodies à un fragment Fc d'isotype IgG2a permettant d'engager les mécanismes effecteurs après fixation.

Le format dimHLE a été utilisé pour le nanobody modulateur allostérique positif de P2X7 (clone 14D5) et le nanobody inhibiteur d'ARTC2.2 (clone s+16a), tandis que le nanobody inhibiteur de P2X7 13A7 a été recomposé en HcAb (13A7-IgG1^{LSF}) (Figure 25). Ce choix est fondé sur des expériences préliminaires menées au laboratoire qui ont comparé l'efficacité de chaque format. Pour les constructions biologiques déplétantes, les nanobodies intégrés aux constructions ont été choisis pour leur capacité à se fixer sur P2X7 (clone 7E2) ou ARTC2.2 (clone s-14) sans moduler leur activité fonctionnelle, de façon à éviter des biais liés à une activité fonctionnelle dans l'évaluation de la déplétion cellulaire.

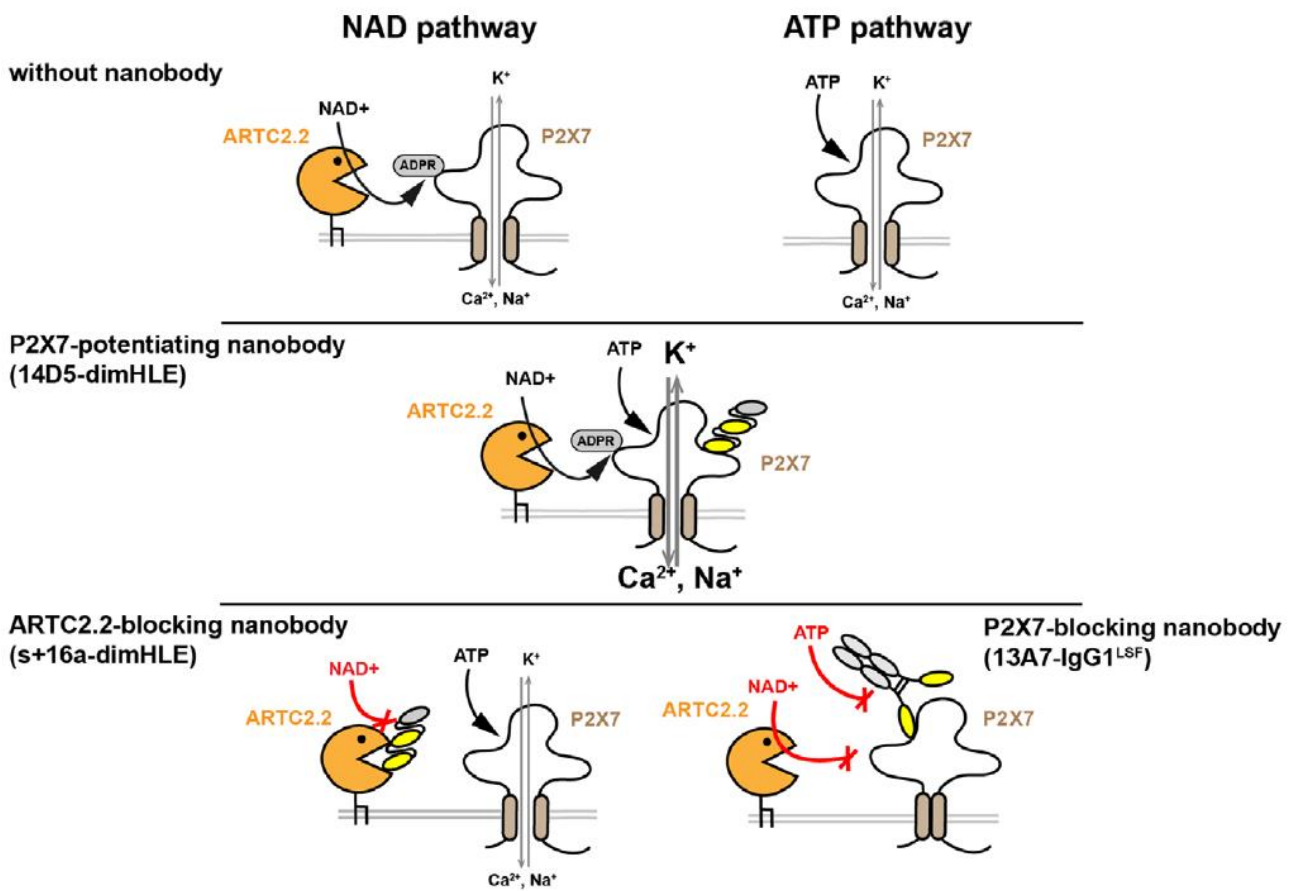


Figure 25 : Modulation de l'activité d'ARTC2.2 et de P2X7 par des constructions biologiques basées sur les nanobodies. La construction 14D5-dimHLE se lie sur un site allostérique de P2X7 et potentialise son activation par l'ATP ou le NAD⁺. La construction s+16a-dimHLE bloque l'activité enzymatique d'ARTC2.2, inhibant l'activation de P2X7 par le NAD⁺. La construction 13A7-IgG1LSF inhibe l'activation de P2X7 par l'ATP ou le NAD⁺.

V. La méthodologie AAV nanobodies

1. Les vecteurs AAV

Les virus adéno-associés (« *Adeno-associated virus* », AAV) appartiennent à la famille des *Parvoviridae* et au genre des Dependoparvovirus, dont le cycle de réplication est dépendant de virus auxiliaires tels que les Adénovirus.

Les AAV sauvages sont composés d'une capsidie icosaédrique de 20 nm de diamètre contenant une séquence d'ADN simple brin d'environ 4,8 kb. Ce génome contient les gènes *Rep* (réplication), *Cap* (capsidie) et *aap* (assemblage). Trois cadres de lecture permettent de coder 8 protéines. Le gène *Rep* code les protéines Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40 nécessaires à la réplication du génome. *Cap* code les 3 protéines de la capsidie (VP1, VP2 et VP3), pour un total de 60 protéines VP dans la capsidie de l'AAV avec un rapport 1:1:10 (VP1:VP2:VP3). Le gène *aap* code la protéine accessoire AAP (« Assembly-activating protein ») qui favorise l'assemblage des virions. Ces séquences codantes sont encadrées par les séquences ITR (« inverted terminal repeat ») qui sont nécessaires à la réplication du génome et son encapsidation (Naso *et al.*, 2017).

Les AAV recombinants (rAAV) sont utilisés pour le transfert de gènes en raison de leur absence de pathogénicité, de leur large tropisme et de leur capacité à permettre une expression de protéines à long terme. Dans le génome des rAAV, les gènes *Rep*, *Cap* et *aap* sont remplacés par le transgène codant pour la protéine d'intérêt, encadré par les séquences ITR (Naso *et al.*, 2017).

L'interaction entre les rAAV et leurs récepteurs et corécepteurs à la surface de la cellule cible provoque leur internalisation par endocytose (Figure 26). Dans les endosomes, la capsidie des rAAV subit des modifications structurales nécessaires à leur libération, notamment l'exposition de la partie N-terminale de VP1 et VP2. Après sortie des endosomes, les virions s'accumulent dans la région périnucléaire de la cellule, où ils peuvent pénétrer dans le noyau par les pores nucléaires. Après une étape de décapsidation, les rAAV libèrent leur ADN simple brin, qui va être converti en ADN double brin, puis transcrit en ARNm qui sera traduit pour exprimer la protéine d'intérêt (Li and Samulski, 2020).

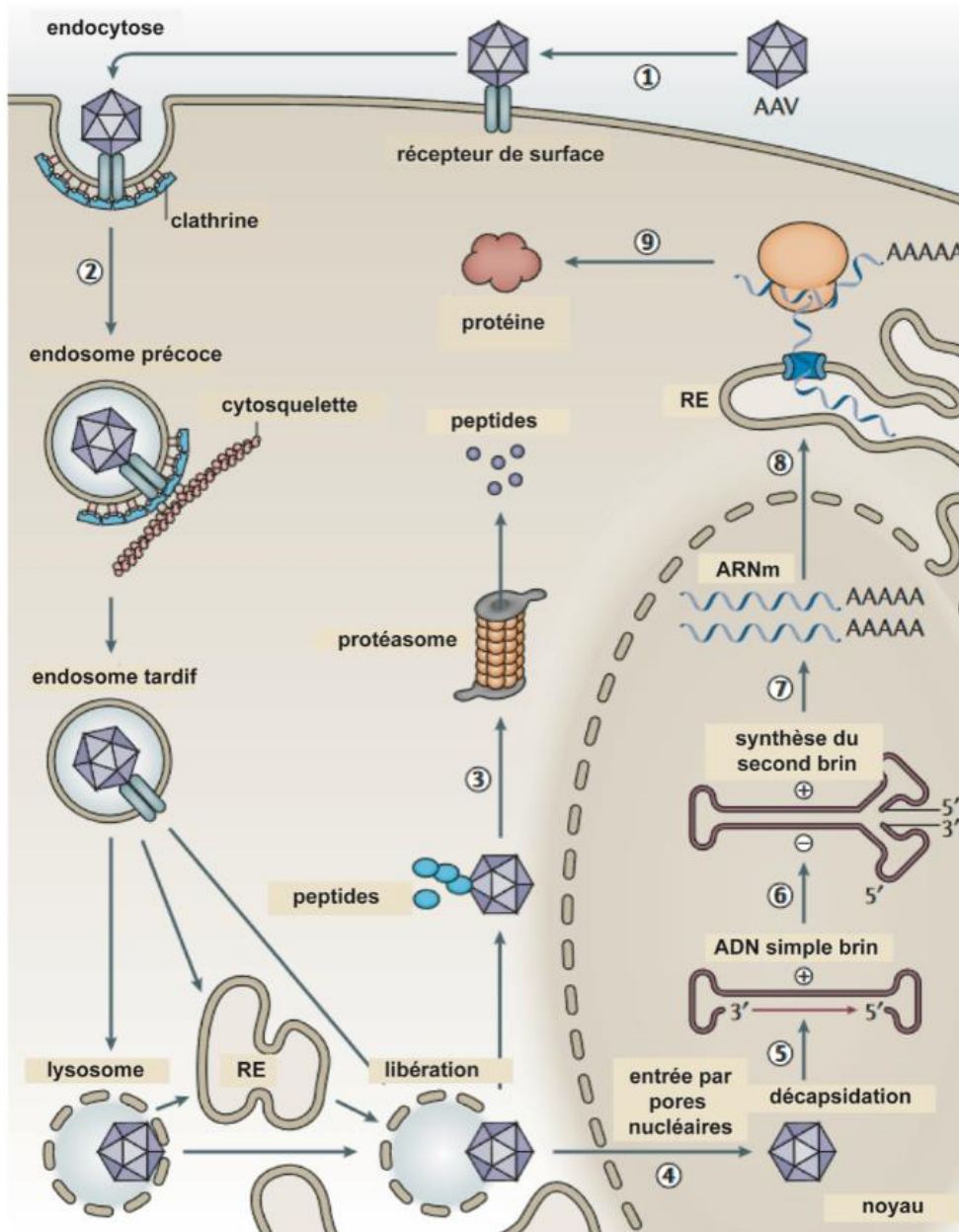


Figure 26 : Mécanisme de transduction des rAAV. Les rAAV se lient à des récepteurs et corécepteurs à la surface des cellules cibles (étape 1) et sont internalisés dans les endosomes par endocytose (étape 2). Après leur libération des endosomes, les virions sont soit ubiquitylés et dirigés vers la dégradation par le protéasome (étape 3), soit transportés vers le noyau (étape 4). Une fois dans le noyau, les rAAV sont décapsidés et le génome est libéré (étape 5). Le génome d'ADN simple brin est converti en ADN double brin (étape 6), suivi par la transcription (étape 7) et la sortie de l'ARNm du noyau (étape 8) pour la traduction et l'expression du transgène (étape 9). Adapté de (Li and Samulski, 2020)

Actuellement 12 sérotypes naturels d'AAV (1-12) et plus d'une centaine de variants ont été isolés à partir de tissus humains et de primates non humains. Ces sérotypes diffèrent par leur efficacité de transduction ainsi que par leur tropisme en lien avec les récepteurs et corécepteurs avec lesquels ils interagissent préférentiellement (Li and Samulski, 2020).

2. La méthodologie AAVnano

Dans cette étude, nous avons utilisé des vecteurs rAAV codant pour des nanobodies ciblant P2X7 et/ou ART2, permettant la production *in situ* des nanobodies. Cette méthodologie repose sur une injection intramusculaire unique de rAAV permettant l'expression systémique à long terme des nanobodies, pendant au moins 120 jours. Cette approche a été dénommée AAVnano (Demeules *et al.*, 2020) ([Figure 27](#)).

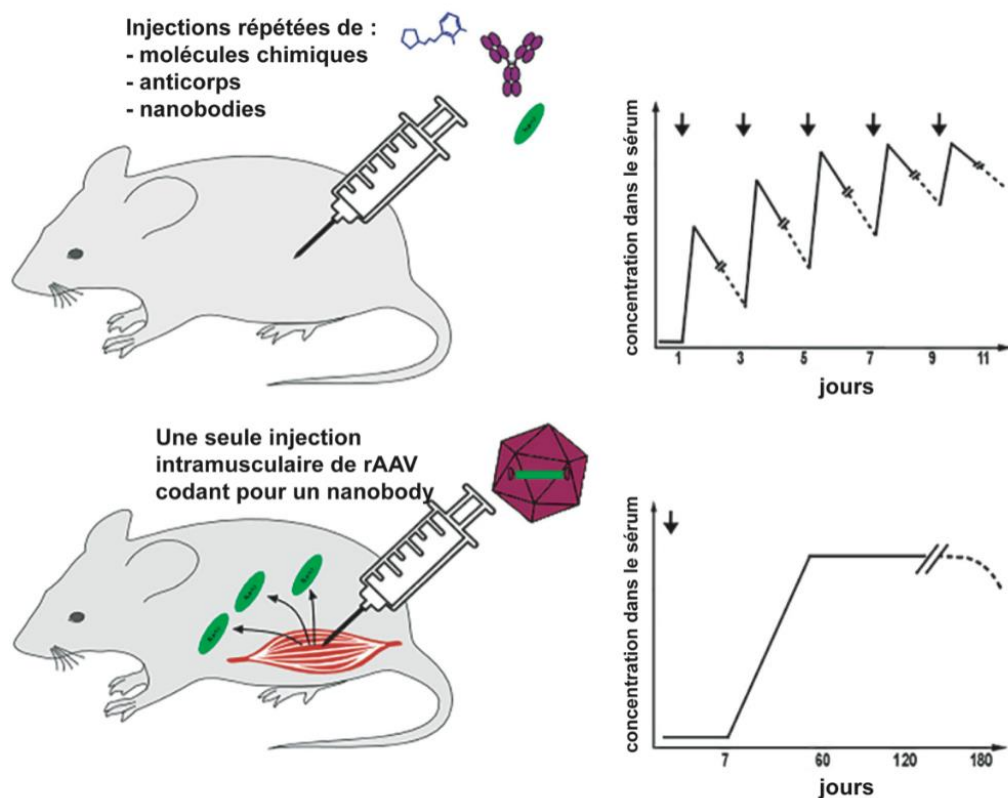


Figure 27 : Comparaison entre l’injection répétée de molécules chimiques ou d’anticorps/nanobodies et la méthodologie AAVnano. (A) Les petites molécules (bleu), les anticorps (violet) ou les nanobodies (vert) sont généralement injectées par voie intrapéritonéale ou intraveineuse et nécessitent des injections répétées tous les 1-2 jours. (B) En utilisant la méthodologie AAVnano, une seule injection intramusculaire d’un vecteur rAAV codant pour le nanobody est réalisée. Le nanobody est produit directement in vivo par les fibres musculaires transduites. Le nanobody est détectable dans le sérum 7-14 jours après l’injection de rAAV et la concentration augmente pour atteindre un plateau 30-60 jours après l’injection de rAAV. Adapté de (Demeules *et al.*, 2020).

Une stratégie similaire, dénommé immunoprophylaxie vectorisée, permet après une seule injection intramusculaire de rAAV codant pour des IgG1 dirigées contre le VIH de prévenir l’infection intraveineuse et transmucoale de souris humanisées (Balazs *et al.*, 2014). Un rAAV (sérotipe 1) codant pour un anticorps anti-VIH est actuellement en phase clinique (Priddy *et al.*, 2019). L’administration de rAAV (sérotipe 8) codant pour un Fab anti-VEGF a été développé pour le traitement de la dégénérescence maculaire néovasculaire liée à l’âge (Liu *et al.*, 2018).

Ce modèle a l'avantage d'éviter les injections intrapéritonéales quotidiennes de nanobodies recombinants chez la souris, et est ainsi particulièrement adaptée à l'évaluation simultanée de plusieurs constructions. Un autre avantage est la production continue et stable des nanobodies, qui permet de supposer que les nanobodies sont à saturation *in vivo* du début à la fin de l'étude, permettant de s'affranchir d'éventuelles variations pharmacocinétiques.

Objectifs

Les objectifs de ce travail de thèse étaient d'exploiter les propriétés uniques des nanobodies pour développer et évaluer *in vivo* des constructions biologiques basées sur des nanobodies dans un modèle d'étude basé sur le récepteur P2X7 et sur l'ectoenzyme ARTC2.2.

Le premier axe de travail s'intéressait à la capacité des nanobodies à moduler des activités biologiques dans deux contextes, celui d'un récepteur canal (P2X7) et celui d'une enzyme membranaire (ARTC2.2).

Dans le second axe, la modularité des nanobodies a été mise à profit pour développer des constructions biologiques monospécifiques et bispécifiques capables d'induire la déplétion cellulaire.

Résultats

A. Article original: « A Methodological Approach Using rAAV Vectors Encoding Nanobody-Based Biologics to Evaluate ARTC2.2 and P2X7 *In Vivo.* »

Contexte de l'étude

A la surface des lymphocytes T murins, la mono-ADP ribosyltransférase ARTC2.2 catalyse l'ADP-ribosylation de diverses protéines de surface lorsque le NAD^+ est libéré dans le compartiment extracellulaire, incluant P2X7. L'ADP-ribosylation du récepteur P2X7 par l'ARTC2.2 constitue ainsi un mécanisme supplémentaire d'activation, complémentaire de son déclenchement par l'ATP extracellulaire. Dans cet article publié dans *Frontiers In Immunology*, nous avons évalué la capacité de constructions basées sur les nanobodies, vectorisées par des vecteurs AAV recombinants (rAAV), à moduler les activités biologiques de P2X7 et d'ARTC2.2 ou à induire la déplétion des cellules exprimant ces cibles.

Principaux résultats

- L'activation de P2X7 par l'ATP et le NAD^+ , évaluée par la perte de CD27 et CD62L à la surface des lymphocytes T, est bloquée après une injection unique du rAAV codant pour 13A7-IgG1^{LSF}. L'injection de rAAV codant pour s+16a-dimHLE bloquant l'ARTC2.2 inhibe complètement la perte de CD27 et CD62L induite par le NAD^+ mais pas par l'ATP. Après injection de rAAV codant pour 14D5-dimHLE, l'activation de P2X7 par l'ATP et le NAD^+ est potentialisée.
- La présence des nanobodies à la surface des lymphocytes T résidents CD69⁺ hépatiques est détectable 120 jours après l'injection de rAAV.
- L'injection de rAAV codant pour 13A7-IgG1^{LSF} ou s+16a-dimHLE protège les lymphocytes T résidents CD69⁺ et les lymphocytes NKT (exprimant fortement P2X7) de la mort cellulaire induite par le NAD^+ . Au contraire, après injection de rAAV codant pour 14D5-dimHLE, la mort cellulaire induite par le NAD^+ des lymphocytes T résidents CD69⁺ et des lymphocytes NKT est augmentée.

- Une injection de NAD⁺ *in vivo* entraîne la déplétion des lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺. La déplétion est augmentée après injection de rAAV codant pour 14D5-dimHLE alors que 13A7-IgG1^{LSF} protège de la déplétion induite par le NAD⁺.
- Dans une autre stratégie, basée sur la fusion de nanobodies à un fragment Fc de souris d'isotype IgG2a pour générer un format d'anticorps à chaînes lourdes, nous démontrons une déplétion durable. L'intensité de la déplétion cellulaire est plus importante pour les constructions anti-ARTC2.2 que pour les constructions anti-P2X7, en lien avec le niveau d'expression des deux cibles.



A Methodological Approach Using rAAV Vectors Encoding Nanobody-Based Biologics to Evaluate ARTC2.2 and P2X7 *In Vivo*

Henri Gondé^{1,2}, Mélanie Demeules¹, Romain Hardet¹, Allan Scarpitta¹, Marten Junge³, Carolina Pinto-Espinoza³, Rémi Varin^{1,2}, Friedrich Koch-Nolte³, Olivier Boyer^{1,4} and Sahil Adriouch^{1*}

¹ Normand University, UNIROUEN, INSERM U1234, Pathophysiology, Autoimmunity, Neuromuscular Diseases and Regenerative THERapies, Rouen, France, ² Rouen University Hospital, Department of Pharmacy, Rouen, France, ³ Institute of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ⁴ Rouen University Hospital, Department of Immunology and Biotherapy, Rouen, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Serge Muyldermans,
Vrije University Brussel, Belgium

Reviewed by:

Luciana D'Apice,
National Research Council (CNR), Italy
Arantazu Alfranca,
Hospital de la Princesa, Spain

*Correspondence:

Sahil Adriouch
sahil.adriouch@univ-rouen.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Cytokines and Soluble
Mediators in Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 02 May 2021

Accepted: 03 August 2021

Published: 19 August 2021

Citation:

Gondé H, Demeules M,
Hardet R, Scarpitta A, Junge M,
Pinto-Espinoza C, Varin R,
Koch-Nolte F, Boyer O and Adriouch S
(2021) A Methodological Approach
Using rAAV Vectors Encoding
Nanobody-Based Biologics to
Evaluate ARTC2.2 and P2X7 *In Vivo*.
Front. Immunol. 12:704408.
doi: 10.3389/fimmu.2021.704408

On murine T cells, mono-ADP ribosyltransferase ARTC2.2 catalyzes ADP-ribosylation of various surface proteins when nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) is released into the extracellular compartment. Covalent ADP-ribosylation of the P2X7 receptor by ARTC2.2 thereby represents an additional mechanism of activation, complementary to its triggering by extracellular ATP. P2X7 is a multifaceted receptor that may represent a potential target in inflammatory, and neurodegenerative diseases, as well as in cancer. We present herein an experimental approach using intramuscular injection of recombinant AAV vectors (rAAV) encoding nanobody-based biologics targeting ARTC2.2 or P2X7. We demonstrate the ability of these *in vivo* generated biologics to potently and durably block P2X7 or ARTC2.2 activities *in vivo*, or in contrast, to potentiate NAD⁺- or ATP-induced activation of P2X7. We additionally demonstrate the ability of rAAV-encoded functional heavy chain antibodies to elicit long-term depletion of T cells expressing high levels of ARTC2.2 or P2X7. Our approach of using rAAV to generate functional nanobody-based biologics *in vivo* appears promising to evaluate the role of ARTC2.2 and P2X7 in murine acute as well as chronic disease models.

Keywords: P2X7 (purino) receptor, AAV vectors, nanobodies (V_{HH}), animal models, extracellular ATP (eATP), extracellular NAD⁺, methodological approach

INTRODUCTION

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) is a key molecule in cellular metabolism and acts as an intermediate in several essential enzymatic reactions (1). In addition, in response to cellular stress, intracellular NAD⁺ is released into the extracellular compartment and serves as a substrate for various ectoenzymes (2, 3). Mono-ADP ribosyl transferases (ART) represent a family of ectoenzymes that use extracellular NAD⁺ to catalyze posttranslational modification of cell surface proteins by the transfer of ADP-ribose to specific amino-acid residues (4, 5). In mice, the ART

family comprises six members: ARTC1-5, including two isoforms of ARTC2, termed ARTC2.1 and ARTC2.2 (6). While ARTC2.1 is enzymatically inactive in the absence of reducing agents, ARTC2.2 is active in standard conditions and is able to ADP-ribosylate multiple cell-surface protein-targets when NAD^+ is present in the extracellular space (7, 8). ARTC2.2 is localized predominantly on the surface of murine T cells as a 35 kDa GPI-anchored ectoenzyme. Although its levels of expression varies depending on mouse strain and cell-activation status, membrane expression of ARTC2 remains overall higher on CD8^+ T cells as compared to CD4^+ T cells (9). When murine T cells are exposed to micromolar levels of extracellular NAD^+ , ARTC2.2 catalyzes the ADP-ribosylation of exposed arginines in several cell surface protein targets, including the purinergic P2X7, a well described protein expressed by immune cells and involved in immune regulation (10, 11).

P2X7 assembles at the cell surface as a homo-trimeric receptor that forms a nonselective ion channel upon gating with high extracellular ATP concentrations (*i.e.*, in the hundreds micromolar range). Depending on ATP concentration and on the extent of cell exposition, activation of P2X7 receptor can lead to multiple cellular events starting by the rapid activation of surface metalloproteases (leading to shedding for instance of CD62L and CD27) and by the externalization of phosphatidylserine (11). Prolonged P2X7 receptor activation induces the formation of nonselective pores and to massive membrane depolarization, ultimately leading to cell death (3). Interestingly, prolonged P2X7 activation can also be triggered by brief exposition to extracellular NAD^+ . Indeed, in the presence of extracellular NAD^+ , ARTC2.2 catalyzes covalent ADP-ribosylation of P2X7 at the arginine residue 125, located in the vicinity of the ATP-binding site, and thereby triggers the activation of P2X7 receptor (10). Remarkably, much lower concentrations of extracellular NAD^+ (*i.e.*, in the micromolar range) are sufficient to activate P2X7 receptor and to induce cell death (12, 13). This process was termed NAD-induced cell death (NICD) and demonstrated to play a major role *in vivo* in the fate and regulation of immune cells that express high levels of ARTC2.2 and P2X7, including regulatory T cells (Treg), invariant NKT cells, follicular helper T cells (Tfh), and tissue-resident memory T cells (T_{RM}) (12, 14–18).

Nanobodies are derived from unconventional natural antibodies devoid of light chains that are found in llamas and other camelids (19–21). The single-chain variable fragment of the so-called heavy-chain antibodies is termed V_{HH} or nanobody. Nanobodies exhibit similar specificities and affinities than conventional antibodies but are smaller in size (15 kDa) and present a complementary determining region 3 (CDR3) that is usually longer, with the remarkable propensity to reach protein cavities that are otherwise difficult to target with conventional antibodies, offering opportunities to engineer these molecules into original biologics (22). Such cavities often

correspond to functional regions and allosteric sites, conferring to nanobodies the ability to act as modulators of enzyme and receptor activities (*e.g.*, potentiating or blocking). Anti-ARTC2.2 nanobodies have been isolated by phage display from llamas immunized with cDNA expression vectors encoding full-length ARTC2.2 (23). Nanobodies s-14, s+16a, s+16b and l-17 are able to bind with high specificity cell line stably transfected to express ARTC2.2. In addition, T cells can be protected from NICD by ARTC2.2-blocking nanobodies s+16a, s+16b and l-17, but not s-14 (23). In additional studies, intravenous (*i.v.*) injection of the ARTC2.2-blocking nanobody s+16a prevented NICD in cells co-expressing ARTC2.2 and P2X7 *ex vivo* as well as *in vivo*. ARTC2.2 antagonism has hence been recognized as a crucial step for the functional studies of Treg, NKT and T_{RM} subsets (14–16, 24). Anti-P2X7 nanobodies were generated in a similar manner (25, 26). Taking advantage of the single-chain structure of nanobodies, we derived highly specific P2X7-potentiating nanobody 14D5 and P2X7-blocking nanobody 13A7 either as homodimers fused to the Alb8 albumin-binding nanobody (*i.e.*, to provide improved half-life *in vivo*) or fused to the Fc-region of mouse conventional antibody to reconstitute the bivalent heavy chain antibody (hcAb) format of camelids (25, 27). Nanobody-based hcAb therefore offer the possibility not only to increase their half-life *in vivo* but also to provide effector functions related to the Fc-region that can bind to Fc-receptors (FcR) at the surface of immune cells or activate the classical complement cascade (26). Depending on the isotype, it is then possible to promote antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC), complement-dependent cell cytotoxicity (CDC) and antibody-dependent phagocytosis (ADCP). Interestingly, hinge and/or Fc-region engineering can further enhance Fc-fused nanobody half-life or fine tune effector properties by enhancing or abolishing Fc γ R and/or complement related effector functions (28).

In this study, we report two different strategies for manipulating the ARTC2.2/P2X7 pathway *in vivo*, with the aim of better addressing the versatile role of NAD^+ and ATP in immune cells. For that, we developed a methodology that rely on nanobody-based biologics expressed directly *in vivo* upon a single intramuscular (*i.m.*) administration of recombinant AAV vectors (rAAV) encoding the biological constructs. We demonstrated here the ability to durably block the activity of ARTC2.2 enzyme or of the P2X7 ion channel *in vivo* upon a single *i.m.* injection of the rAAV encoding a construct containing the ARTC2.2-blocking nanobody s+16a, or a construct containing the P2X7-blocking nanobody 13A7. In addition, we provide evidence that P2X7 can be potentiated *in vivo* using an rAAV encoding a construct containing the P2X7-potentiating nanobody 14D5. In another strategy, based on the fusion of specific nanobodies to mouse IgG2a, to generate a heavy chain antibody (hcAb) format, we demonstrate durable depletion of cells expressing high levels of ARTC2.2 *in vivo*. These methodologies represent valuable tools that might be used in future studies to better delineate the role of the NAD^+ /ARTC2.2/P2X7 pathway *in vivo* in various pathophysiological situations including inflammatory diseases, and immune responses to infectious pathogens or to tumor cells.

Abbreviations: NAD^+ , nicotinamide adenine dinucleotide; ART, ADP-ribosyltransferase; hcAb, heavy chain antibody; dimHLE, dimer half-life extended; rAAV, recombinant adeno-associated virus used as a vector; AAVnano, methodological approach based on the injection of rAAV encoding for nanobody-based biologics.

MATERIAL AND METHODS

Mice, Reagents, Antibodies

C57BL/6 wild-type mice obtained from Janvier Labs were used for all experiments. Mice were housed in a specific pathogen-free facility and were aged of 8 weeks at the beginning of experiments. All animal experiments were approved by the local institutional ethic committee.

Adenosine 5'-tri-phosphate disodium salt (A2383) and β -nicotinamide adenine dinucleotide hydrate (N7004) were purchased from Sigma Aldrich. Red blood cell (RBC) lysis/fixation Solution, True-Nuclear transcription factor buffer set, fluorochrome-conjugated streptavidin, and antibodies to CD45 (clone 30-F11), CD4 (RM4-5), CD8 (53-6.7), CD25 (PC-61), CD19 (1D3/CD19), B220 (RA3-6B2), FoxP3 (MF-14), CD27 (LG.3A10), CD62L (MEL-14), CD69 (H1.2F3) or P2X7R (1F11), and purified CD16/CD32 (TruStain FcX) were obtained from Biolegend or Sony Biotechnology. Rabbit polyclonal antibody K1G, specific to mouse P2X7, was described in our previous studies (12, 13). K1G was used to stain P2X7 at the surface of blood myeloid cells as illustrated in **Supplemental Figure 3**, using a secondary donkey anti-rabbit IgG from Jackson ImmunoResearch. Biotinylated polyclonal antibody specific to mouse IgG_a was obtained from Jackson ImmunoResearch and monoclonal antibody to ARTC2.2 (Nika102) from Novus Biologicals.

Flow Cytometry Analyses

For evaluation of P2X7 and ARTC2.2 expression on T cells, splenocytes were collected and single-cell suspensions were prepared and washed using standard procedures. Cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies, including anti-P2X7 and anti-ARTC2.2 or related isotype controls before fixation and red blood cell lysis using the RBC lysis/fixation Solution (Sony biotechnology).

For evaluation of P2X7-dependent shedding of CD27 and CD62L upon *ex vivo* exposition to NAD⁺ or ATP, blood samples were collected, washed, resuspended into PBS (without Ca²⁺ and Mg²⁺), and divided into 4 tubes. Cells were then treated with 30 μ M ATP, 150 μ M ATP, or 30 μ M NAD⁺, or left untreated. After incubation for 15 min at 37°C, cells were washed in cold D-PBS containing 10% FBS, and stained on ice with fluorochrome-conjugated antibodies before fixation and RBC lysis. The percentages of cells co-expressing CD27 and CD62L were then evaluated by flow cytometry.

For evaluation of the binding of the dimHLE constructs on liver NKT cells and liver T_{RM}, single cells suspension were prepared and stained with a mouse IgG1 mAb that specifically recognizes the Alb8 nanobody (kindly provided by Dr. Catelijne Stortelers, Ablynx nv, Zwijnarde, Belgium), followed by a secondary mouse IgG1-specific mAb. To evaluate the levels of occupation of the target protein, cells were incubated *in vitro* with a saturating concentration of the same recombinant nanobody construct as the one produced *in vivo*, followed by the same secondary detection reagents. This allowed estimation of signal saturation that correlates with target occupation by bounded biologics. Similar MFI were obtained with or without

addition *in vitro* of the corresponding recombinant nanobody construct, confirming that target occupancy reached saturation *in vivo* (data not shown). To distinguish vascular T cells from liver parenchyma cells, a fluorochrome-conjugated CD45-specific mAb has been injected i.v. (CD45iv) 3 min before sacrifice and preparation of liver lymphocytes. This procedure allowed the staining of vascular T cells *in vivo* (CD45iv^{high}) while liver resident T cells remained mostly unstained (CD45iv^{low}). Untransduced mice additionally received 50 μ g of recombinant s+16a-dim construct (i.e., a dimer of s+16a that does not contain the Alb8 nanobody, and that cannot be detected by the anti-Alb8 mAb77 detection system) 30 min before organ collection to prevent NICD and cell loss *ex vivo* during cell preparation, as described earlier (15, 18). All cells were counterstained with mAbs directed against CD45 (coupled to a different fluorochrome than CD45iv), CD4, and CD69 (marker of tissue resident lymphocytes). To distinguish the NKT subset, cells were stained with PE-conjugated CD1d-tetramer loaded with, an analogue of α -galatosylceramide (α Gal/Cer), kindly provided by the NIH tetramer core facility.

For evaluation of the binding capacity of the nanobody-based hcAb on T cells surface, samples were collected, washed, resuspended into FACS buffer and stained with isotype specific secondary antibodies, i.e. Ab directed against mouse IgG1 (to detect 13A7-IgG1^{LSF} hcAb), or Ab directed against mouse IgG2a (for detection of 7E2-IgG2a or s-14-IgG2a hcAb). Cells were washed and counterstained with fluorochrome-conjugated antibodies directed against the indicated cell surface markers.

Flow cytometry measurements were performed using a LSRFortessa or a FACSCanto-I (BD Biosciences) apparatus and subsequent analyses were performed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Nanobody Constructs

Some of the constructs used in this study were based on nanobody dimers ("dim" format) fused to the Alb8 anti-albumin nanobody (half-life extended "HLE" format) (25, 29). 14D5-dimHLE and s+16a-dimHLE were constructed by fusing the coding sequences of two 14D5 nanobodies or two s+16a nanobodies using a 35-GS linker (GGGGGS)₇. These homodimeric bivalent constructs were then fused to the anti-albumin nanobody Alb8 *via* a 9-GS linker (GGGGSGGG) (25). The P2X7-blocking 13A7-IgG1^{LSF} hcAb was constructed by fusing the nanobody 13A7 to the hinge region and Fc region of a mutated mouse IgG1 antibody carrying the "LSF" mutations (T252L, T254S, T256F) (30). For the design of the depleting hcAb constructs 7E2-IgG2a and s-14-IgG2a, anti-P2X7 nanobody 7E2 or anti-ARTC2.2 nanobody s-14, were fused to the hinge and Fc-region of a mouse IgG2a using 5-GS linker (GGGGGS).

Production of rAAV and Muscle Transduction

For the production of rAAV, all constructs were cloned into a pFB plasmid under the control of either a CBA promoter (for rAAV1 constructs encoding 14D5-dimHLE, 13A7-IgG1^{LSF} and s+16a-dimHLE) or under the related CASI promoter (for rAAV8

constructs encoding 7E2-IgG2a and s-14-IgG2a) (31, 32). Production, purification, and titration of rAAV1 and rAAV8 were performed by Virovek (Hayward, California, USA) using the baculovirus expression system in Sf9 insect cells (31). For muscle transduction, mice hind legs were shaved under anesthesia and 100 μ L diluted rAAV were injected into 4 gastrocnemius muscle sites to reach a total dose of 10^{11} viral genomes (vg) per mouse.

NAD⁺ Treatment *In Vivo*

Injections of rAAV encoding either 13A7-IgG1^{LSF} hcAb or 14D5-dimHLE were performed i.m. on day 0 and followed 28 days later by the i.v. injection of 30 mg NAD⁺ diluted in 200 μ L PBS (pH adjusted to 7.4) as described earlier (24). Splenocytes were collected 24 h later and single-cell suspensions were prepared on ice and stained with fluorochrome-coupled antibodies. After fixation, RBC lysis, permeabilization and intracellular staining, single cell suspensions were analyzed by flow cytometry. Absolute cell numbers collected for each spleen was evaluated by direct enumeration using an automated cell counter (ADAM-MC apparatus). Percentages of CD4⁺ and CD8⁺ T cells were determined by flow cytometry and compared to CD19⁺ B cells taken as an NAD⁺-insensitive reference population.

Statistical Analysis

All data are shown as mean values and error bars represent standard error of the mean (SEM). Statistical comparison between experimental groups was performed using one-way analysis of variance (ANOVA). Differences were considered statistically significant when p values were less than 0.05 (*), 0.01 (**), or 0.001 (***). All calculations were performed using the Prism software (Graphpad, La Jolla, CA).

RESULTS

Nanobody Constructs and rAAV Used to Study the Role of ARTC2.2 and P2X7 *In Vivo*

The ARTC2.2/P2X7 axis regulates murine T cell function, differentiation and cell fate. Both proteins are expressed on T cell subsets but at different cell surface levels. Consistent with previous studies (12, 13, 24), P2X7 and ARTC2.2 were detected on CD4⁺CD25⁺ Treg, CD4⁺CD25⁻ conventional CD4⁺ T cells (Tconv), and on CD8⁺ T cells. P2X7 is expressed at higher level on the surface of Treg and to a lesser extent on CD4⁺ Tconv and on CD8⁺ T cells (**Figure 1A**, upper panels). ARTC2.2 is expressed at higher levels on CD8⁺ T cells as compared to CD4⁺ T cell subsets (**Figure 1A**, lower panels). To explore the role of P2X7 and ARTC2.2 *in vivo*, we developed a methodological approach based on rAAV encoding various formats of P2X7-specific or ARTC2.2-specific nanobody-based constructs. To increase their half-life and avidity, we developed bivalent nanobodies fused to the albumin-specific nanobody Alb8 (dimer Half-Life Extended format, termed “dimHLE”

(**Figure 1B**). In a second approach, we fused nanobodies to the hinge and Fc region of conventional IgG antibodies (heavy-chain antibodies format, “hcAb”) (**Figure 1B**). Mouse IgG1 Fc subclass is known to only mediate low, if any, effector functions as it binds to the inhibitory Fc γ RIIB and to only one member of the activating receptors, the low affinity Fc γ RIII (33). IgG1 also binds to the neonatal FcRn involved in antibody recycling and persistence *in vivo*. To further increase the half-life of our constructs, we took advantage of the described “LSF” point mutations (*i.e.*, T252L, T254S, T256F), known to further ameliorate *in vivo* persistence by increasing the binding to FcRn (30), to generate the mIgG1^{LSF} hcAb construct (**Figure 1B**). In contrast to mouse IgG1, mIgG2a subclass binds all mouse activating Fc γ R and triggers Fc-related effector functions (**Figure 1B**) (33).

In our methodological approach to target ARTC2.2 and P2X7 on T cells *in vivo*, implemented and evaluated here, we injected rAAV1 or rAAV8 encoding nanobody-based constructs instead of the corresponding purified recombinant proteins. Both rAAV1 and rAAV8 serotypes are known to efficiently transduced muscle cells upon i.m. injection. We aimed at eliciting directly *in situ* the long-term and stable production of the selected construct following a single administration of the corresponding rAAV. This approach was termed AAVnano (**Figure 1C**).

We explored here two complementary strategies for manipulating *in vivo* the NAD⁺ pathway dependent on ARTC2.2 and P2X7. (**Figure 2**). The first strategy relies on the propensity of nanobodies to bind to functional sites and thereby modulate their enzymatic activity or receptor functions. We used constructs based on nanobodies selected for their remarkable ability to block ARTC2.2 enzymatic activity (nanobody s+16a, used here as a dimHLE format), to inhibit gating of the P2X7 ion channel (nanobody 13A7, used as IgG1^{LSF} hcAb format), or to potentiate P2X7 activity (nanobody 14D5, used as dimHLE format) (**Figure 2A**). The choice of the format for each biological construct (*i.e.*, dimHLE, or IgG1^{LSF} hcAb formats) was based on preliminary experiments comparing the efficacy of each formats (data not shown). The second strategy relies on the possibility to deplete target cells expressing high levels of ARTC2.2 or P2X7. For that, we used hcAb engineered to contain the mIg2a Fc-region, known to promote binding to FcR on immune cells and to promote ADCC by NK cells, ADCC by macrophages, and to facilitate CDC upon engagement on the classical complement pathway (**Figure 2B**). To facilitate the interpretation of their effect *in vivo*, these latter constructs were based on other nanobodies that do not modulate the functional activity of their target (*i.e.*, ARTC2.2-specific nanobody s-14 (23) and P2X7-specific nanobody 7E2 (25)) that were fused to the hinge and Fc-region of mouse IgG2a (**Figures 1B, C**).

Functional Modulation of ARTC2.2 or P2X7 Using rAAV Coding for Biologics With Blocking or Potentiating Properties

To evaluate our AAVnano approach and the ability of our constructs to modulate their target proteins, we first indirectly studied the activity of P2X7 and ARTC2.2 on T cells harvested

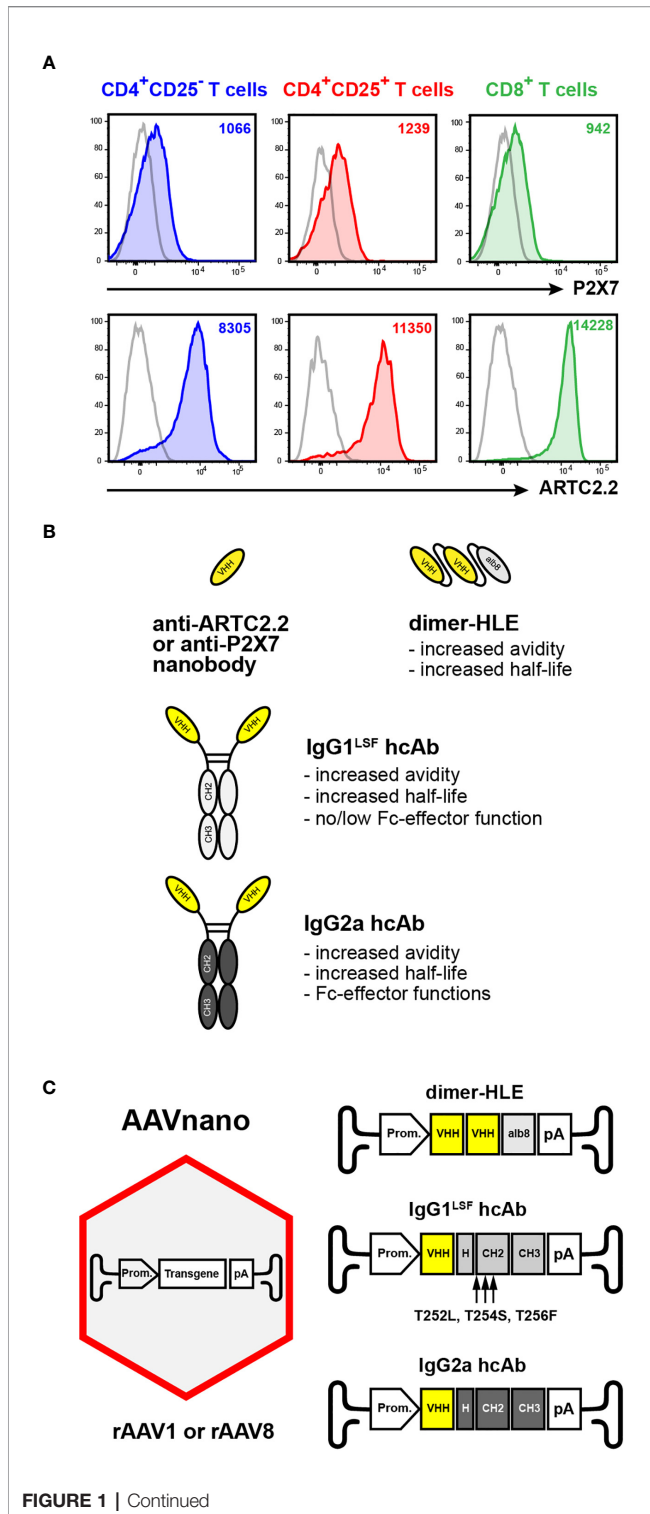


FIGURE 1 | AAVnano methodological approach to study the role of P2X7 or ARTC2.2 *in vivo*. **(A)** Expression of ARTC2.2 and P2X7 T cell subsets.

Splenocytes from C57BL/6 mice were stained with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies directed against P2X7 (clone 1F11), or ARTC2.2 (clone Nika102), or with the corresponding isotype controls (grey), and were analyzed by flow cytometry. Cells were gated on CD4⁺CD25⁻ T cells (Tconv, depicted in blue), on CD4⁺CD25⁺ (Treg, depicted in red), or on CD8⁺ T cells (depicted in green) to evaluate the cell surface levels of P2X7 or ARTC2.2 on each subset. The numbers in the upper right quadrants indicate the mean fluorescence intensity (MFI). Staining was performed using fluorochrome conjugated antibodies specific to CD45 (coupled to BV510), CD4 (BV786), CD8 (BV605), CD25 (PE-Cy7), P2X7 (BV421) and ARTC2.2 (AF647).

(B) Schematic representation of nanobody-based constructs. ARTC2.2-specific and P2X7-specific nanobodies (V_{H+H}) are engineered either as bivalent dimers fused to the albumin-specific nanobody Alb8 (dimer half-life extended, termed "dimHLE"), or as heavy-chain antibodies (termed hcAb) when fused to the hinge and Fc-region of conventional mouse IgG antibodies. For the latter, nanobodies were fused to either a mouse IgG1 hinge/Fc-region bearing the LSF mutations (*i.e.*, T252L, T254S, T256F) to produce hcAb with no/low Fc-effector functions, or to the hinge/Fc-region of mouse IgG2a to generate cell-depleting hcAb. **(C)** Schematic representation of the AAVnano methodological approach and the structure of the transgenes incorporated in the rAAV (of serotype 1 or 8). The illustrated transgenes encode the nanobody-based constructs depicted in **(B)** Upon a single i.m. injection of the rAAV, the nanobody-based biologics are produced *in vivo* by the transduced muscle cells under the control of a CBA (rAAV1) or a CASI (rAAV8) promoter (Prom.).

rAAV1 encoding 13A7-IgG1^{LSF} hcAb (*i.e.*, to inhibit P2X7), 14D5-dimHLE (*i.e.*, to potentiate P2X7), or s+16a-dimHLE (*i.e.*, to inhibit ARTC2.2). Blood cells were collected 17-120 days after rAAV injection, incubated at 37°C in the absence or in the presence of NAD⁺ (30 μM) or ATP (30 μM or 150 μM) to assay *ex vivo* P2X7-dependent shedding of CD27 and CD62L. Representative data obtained 30 days after AAVnano injection are shown in **Figure 3**. Comparable results were obtained from the earliest studied time point at day 17 to the last time point of the study at day 120. The results show that T cells from untransduced mice displayed P2X7-dependent shedding of CD27 and CD62L within 15 min after incubation with ATP or NAD⁺ (**Figures 3A, B**). This was noticeably more pronounced on CD4⁺CD25⁺ Treg that express higher levels of P2X7 as compared to Tconv and to CD8⁺ T cells (**Figure 3B**). Injection of AAVnano coding for 14D5-dimHLE sensitized T cells to P2X7-dependent shedding, notably also on the T cell subsets that express the lowest levels of P2X7 (*i.e.*, Tconv and CD8⁺ T cells) as compared to untransduced control mice. In contrast, mice injected with the AAVnano coding for 13A7-IgG1^{LSF} hcAb were almost completely protected from NAD⁺- and ATP-induced P2X7 activation, and only Treg cells displayed limited CD27 and CD62L shedding when incubated with the highest dose of ATP (**Figure 3B**). T cells from mice injected with the AAVnano coding for s+16a-dimHLE were protected from NAD⁺-induced, but not from ATP-induced shedding of CD27 and CD62L, as expected from a nanobody construct that inhibits ARTC2.2 activity (**Figure 3B**). For comparison, we also evaluated the effects mediated by recombinant nanobody-based biologics added directly *in vitro* on cells from untreated animals (**Supplemental Figure 1**). We observed in dose-response experiments that each recombinant construct used at

from AAVnano injected mice. Exposure of T cells to ATP or NAD⁺ induces the shedding of CD27 and CD62L by metalloproteases and this can be used as a sensitive assay to monitor P2X7 receptor activation (13, 24). For that, we injected

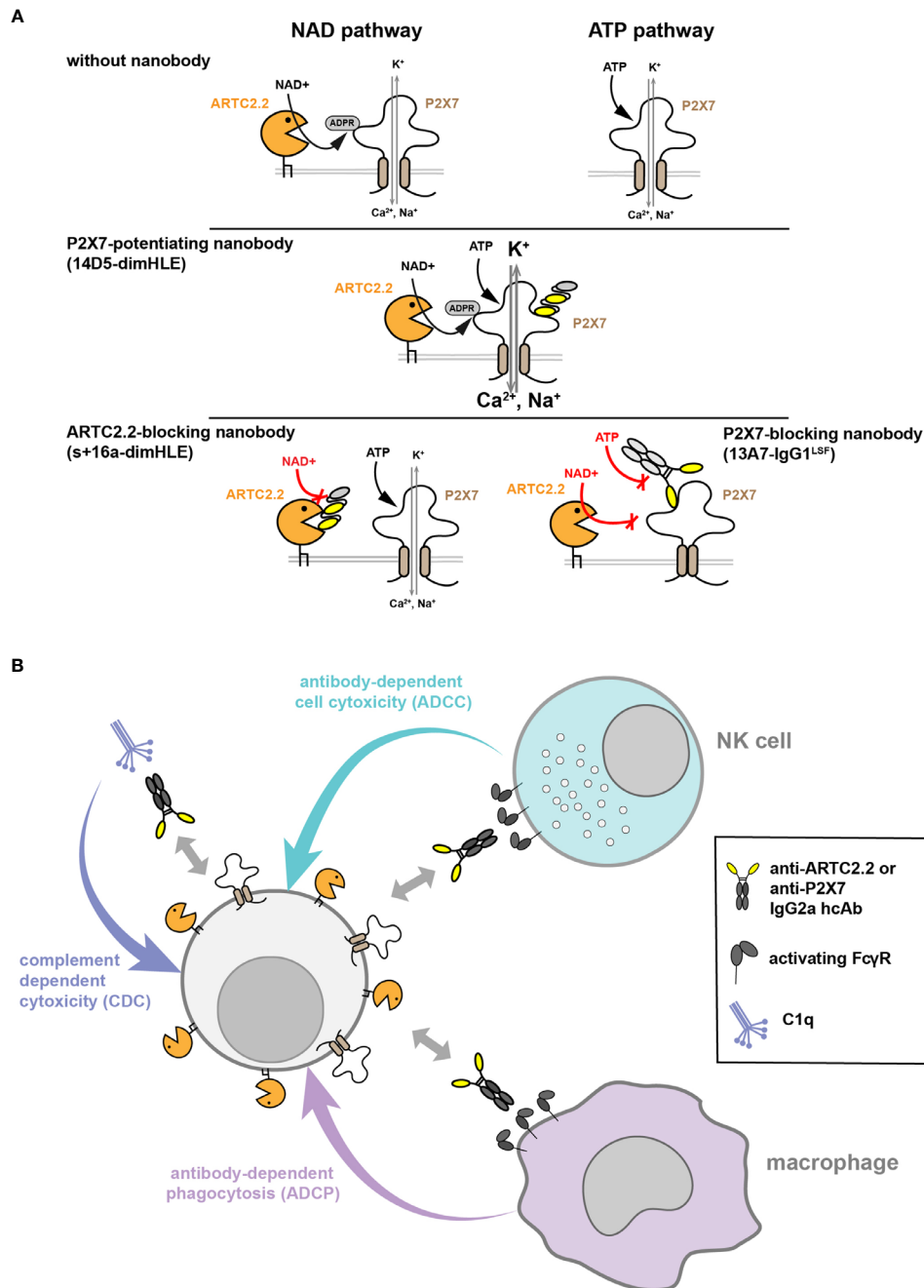


FIGURE 2 | Strategies used to manipulate ARTC2.2 or P2X7 functions *in vivo* or to deplete T cells expressing these proteins. **(A)** Modulation of ARTC2.2 and P2X7 activity using nanobody-based constructs. Two pathways can lead to the activation of P2X7 at the surface of mouse T cells. The ATP pathway involves direct gating of P2X7 ion channel by extracellular ATP. The NAD⁺ pathway involves a post-translational modification of P2X7 catalyzed by the ectoenzyme ARTC2.2 resulting in its covalent ADP-ribosylation. The 14D5-dimHLE construct probably binds to an allosteric site on P2X7 and potentiates gating of the ion channel triggered by either ATP or NAD⁺. The s+16a-dimHLE construct was designed to block ARTC2.2 enzymatic activity *in vivo* and thereby to inhibit activation of P2X7 by the NAD⁺ pathway (but not the ATP pathway). The 13A7-IgG1^{LSF} hcAb construct inhibits P2X7 gating and can be used to inhibit both ATP and NAD⁺ pathways. **(B)** Other nanobody-based constructs were designed to favor depletion of their target cells *in vivo*. For that, nanobodies s-14 and 7E2, that bind respectively to ARTC2.2 and P2X7 but do not modulate their functions, were fused to the hinge and Fc-region of mlgG2a. The resulting mlgG2a hcAb could mediate cell depletion through different mechanisms such as complement-dependent cytotoxicity (CDC), antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) that rely on NK cells, and antibody-dependent cell phagocytosis (ADCP) involving macrophages.

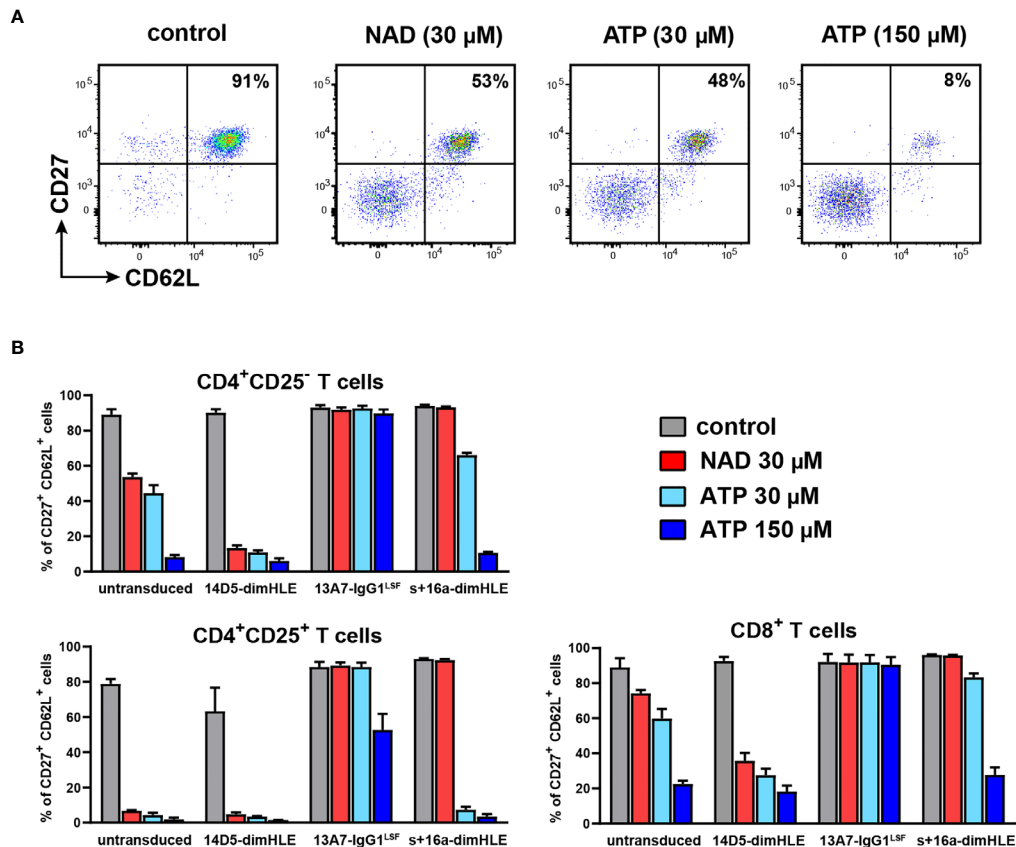


FIGURE 3 | AAVnano modulate P2X7-dependent shedding of CD27 and CD62L *ex vivo*. C57BL/6 mice were injected i.m. with PBS (control) or with rAAV1 encoding P2X7-potentiating 14D5-dimHLE, P2X7-blocking 13A7-IgG1^{LSF} hcAb or ARTC2.2-blocking s+16a-dimHLE. Blood samples were collected at different time points ranging from day 17 to day 120 after rAAV injections. Cells were then incubated for 15 min at 37°C with PBS, 30 μM ATP, 150 μM ATP or 30 μM NAD⁺ to induce P2X7-dependent shedding of CD27 and CD62L on T cells. Representative results obtained 30 days after rAAV injection are shown. **(A)** Representative flow cytometry plots illustrating shedding of CD27 and CD62L on gated CD4⁺CD25⁺ T cells harvested from control mice. Numbers indicate percentages of CD27⁺CD62L⁺ cells. **(B)** Mean percentages of CD27⁺CD62L⁺ cells among gated CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺ and CD8⁺ T cells after incubation with PBS (grey), 30 μM NAD⁺ (red), 30 μM ATP (cyan) or 150 μM ATP (blue). Staining was performed using fluorochrome conjugated antibodies specific to CD45 (coupled to APC-Cy7), CD4 (FITC), CD8 (PE-Cy7), CD25 (PE), CD27 (PerCP-Cy5.5) and CD62L (APC). Errors bars represent the SEM, n=3.

saturation doses *in vitro* induced a comparable effect that the one observed *ex vivo* on cells collected from AAVnano transduced mice. These data hence suggest that i.m. injection of AAVnano induce *in vivo* production of each encoded construct in sufficient quantity to substantially inhibit or potentiate the functional activity of their target, at a level that appears to be similar to the one obtained *in vitro* with saturating doses of each given recombinant nanobody construct.

Evaluation of Tissue Resident T Cells *In Vivo* Following Administration of rAAV Coding for Biologics

To determine whether our methodological approach could be used to reach ARTC2.2 and P2X7 on tissue resident T cells, we next sought to detect the presence of the biologics on resident liver T cells 120 days after rAAV injection. For that, we focused at the end of the experiment (*i.e.*, upon sacrifice of animals) on

liver tissue-resident memory T cells (T_{RM}) and for comparison on liver vascular T cells as well. Liver T_{RM} co-express higher levels of ARTC2.2 and P2X7 than conventional T cells (18) (**Figure 4**). In order to discriminate tissue resident from vascular lymphocytes, we intravenously injected a fluorochrome-conjugated CD45-specific mAb 3 min before sacrifice. In this short period of time, the injected antibody stains vascular, but not tissue resident lymphocytes (34). In order to detect the rAAV-encoded s+16a-dimHLE or 14D5-dimHLE, we used a monoclonal antibody (mAb77) that specifically recognizes the Alb8 nanobody, and for detection of 13A7-IgG1^{LSF}, we used a mouse IgG1-specific secondary antibody. We further stained cells with a CD4-specific mAb and an αGal/Cer-loaded CD1d tetramer to distinguish NKT cells from other CD4⁺ T cells. NKT cells are also known to co-express high levels of ARTC2.2 and P2X7 and to be highly sensitive to NAD⁺ induced cell death (NICD) (18). Cells were counterstained with a fluorochrome-

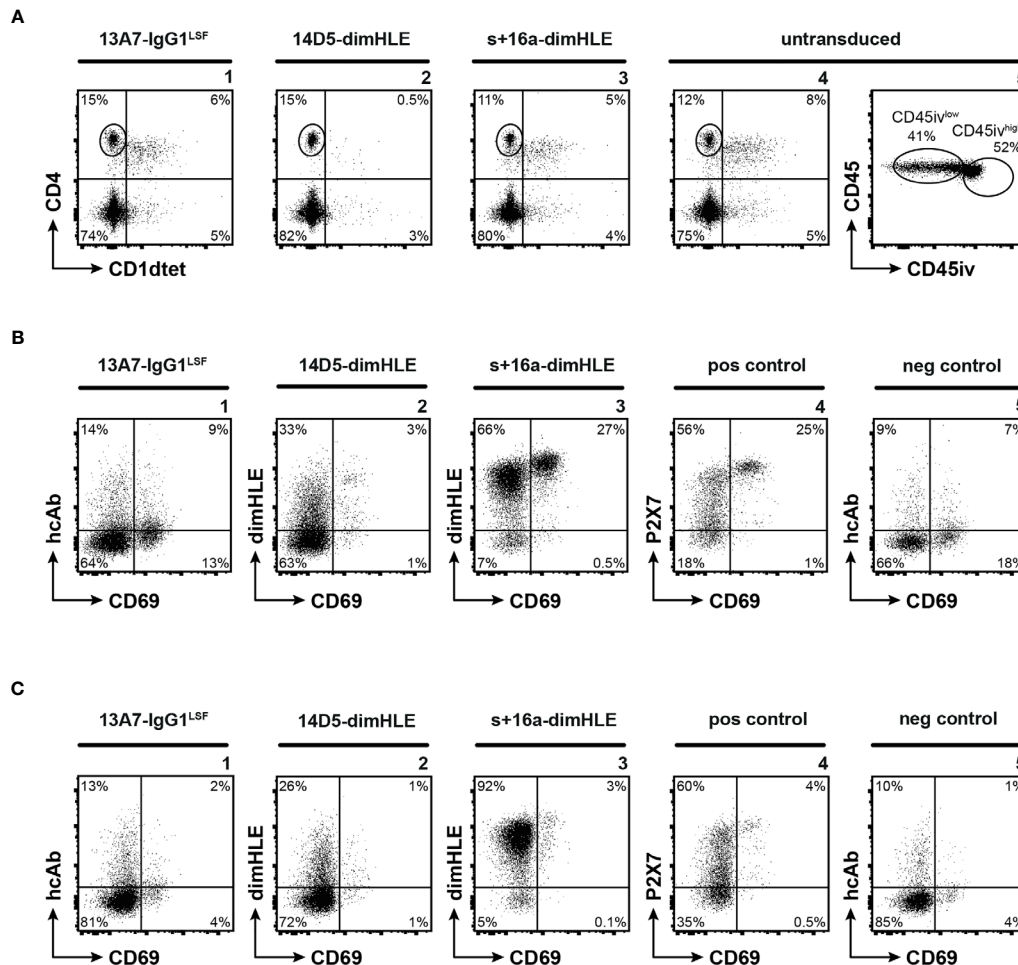


FIGURE 4 | Nanobody-based biologics produced *in vivo* following rAAV injection reach ARTC2.2 and P2X7 expressed at high levels by T_{RM} located in the liver parenchyma. C57BL/6 mice were injected i.m. with rAAV1 encoding P2X7-blocking 13A7-IgG1^{LSF} hcAb, P2X7-potentiating 14D5-dimHLE, or ARTC2.2-blocking s+16a-dimHLE, or with PBS (untransduced). 120 days after rAAV injection mice received an intravenous injection of fluorochrome-conjugated CD45-specific mAb (CD45iv) 3 min before sacrifice. Untransduced mice additionally received 50 μ g of recombinant s+16a-dim construct 30 min before organ collection to prevent NICD and cell loss *ex vivo* during cell preparation, as described earlier (15, 18). Cells extracted from the liver were then counterstained with mAbs directed against CD45, CD4, and CD69 (i.e., a marker of tissue resident lymphocytes) and with a CD1d-tetramer (CD1dtet) loaded with α Gal/Cer (specifically labels the invariant T cell receptor of NKT cells). **(A)** Representative flow cytometry plots illustrating liver CD4⁺ T cells and CD4⁺CD1dtet⁺ NKT cells (panels 1-4), and the gating of parenchymal (CD45iv^{low}) and vascular (CD45iv^{high}) CD4⁺CD1dtet⁺ lymphocytes (panel 5). **(B, C)** Representative flow cytometry plots illustrating the detection of the nanobody-based constructs on the cell surface of tissue resident CD45iv^{low} **(B)** and vascular CD45iv^{high} **(C)** CD4⁺CD1dtet⁺ T cells. To detect cell surface bound dimHLE constructs, cells were stained with Alb8-specific mAb77 (mouse IgG1) followed by an mIgG1-specific secondary mAb. To detect cell surface bound 13A7-IgG1^{LSF}, cells were stained directly with the secondary mIgG1-specific mAb. Positive (pos) control staining was performed with liver cells from untransduced mice using the P2X7-specific 13A7-dimHLE, mAb77, and the mIgG1-specific secondary mAb. Negative (neg) control staining was performed with the secondary detection reagents alone. Numbers indicate the percentages of cells in the respective quadrants or gates **(A)**, panel 5). Staining was performed using fluorochrome conjugated antibodies specific to CD45 (coupled to PerCP-Cy5.5 for the one injected *i.v.* and to AF700 for the one added *in vitro*), CD4 (APC), CD69 (FITC), mouse IgG1 (BV421) and CD1dtet (coupled to PE).

conjugated mAb against CD69, a marker that is highly expressed by many tissue resident T cells but by only few if any vascular T cells (35, 36). Untransduced mice were used as control and were given recombinant s+16a-dim 30 min before sacrifice to prevent NICD and cell loss during preparation as described before (15, 18). The results confirmed the higher level of ARTC2.2-specific s+16a-dimHLE bound at the surface of CD69⁺ T_{RM} as compared to tissue resident CD69⁻ CD4⁺ T cells and to vascular CD4⁺ T cells **(Figures 4B, C, panels 3)**. Also, higher expression of P2X7

was detected at the surface of CD69⁺ T_{RM} compared to other CD4⁺ subsets **(Figures 4B, C panels 4)**. In mice injected with rAAV1 encoding the ARTC2.2-specific s+16a-dimHLE, we observed high proportions of NKT cells and CD69⁺ T_{RM} as expected from an ARTC2.2-blocking biologics that protect from NICD that occurs during cells preparation **(Figures 4A, B, panels 3)**. In contrast, liver lymphocytes obtained from mice injected with rAAV1 encoding the P2X7-potentiating 14D5-dimHLE show markedly reduced percentages of tetramer-

stained NKT cells and of CD69⁺ T_{RM} (Figures 4A, B, panels 2), *i.e.* a cell populations that display high cell surface level of P2X7 (Figure 4B, panel 4). This likely reflects 14D5-dimHLE enhanced cell death of these subsets due to NAD⁺ released during liver collection and cell preparation (34). Liver lymphocytes recovered from mice injected 120 days earlier with rAAV1 encoding the P2X7-blocking 13A7-IgG1^{LSF}, contained high proportion of NKT cells (Figure 4A, panel 1) and of CD69⁺ T_{RM} (Figure 4B, panel 1), indicating that binding of 13A7-IgG1^{LSF} rendered these subpopulations resistant to NICD during cell preparation. However, the low level of staining with the IgG1-specific secondary antibody (Figure 4B, panel 1) suggests that this hcAb induced down modulation of cell surface P2X7, possibly by hcAb-induced endocytosis. This was not due to low binding of 13A7-IgG1^{LSF} at the surface of these cells as incubation of the cells *ex vivo* with a saturating dose of recombinant 13A7-IgG1^{LSF} followed by IgG1-specific secondary antibody did not increased the staining (data not shown). Similarly, in mice injected with rAAV1 encoding 14D5-dimHLE or s+16a-dimHLE, incubation of cells *ex vivo* with a saturating dose of the corresponding recombinant protein, followed by the appropriate secondary detection reagent, did not increased the staining intensity (not shown). This data indicate that each of these nanobody-based constructs produced *in vivo* achieved full occupancy of their respective target proteins expressed on vascular and tissue resident CD4⁺ T cells, as expected from their continuous endogenous production mediated by rAAV1 injection 120 days earlier.

Functional *In Vivo* Modulation of ARTC2.2 or P2X7 by rAAV Encoded Biologics

We next evaluated the effect of these biological constructs *in vivo*. First, we confirmed the absence of cell depletion using these AAVnano by evaluating the percentages of CD4⁺CD25⁺ Treg, CD4⁺CD25⁻ Tconv, and CD8⁺ T cells, throughout the study (data not shown). We then injected NAD⁺ *i.v.* and evaluated *in vivo* the modulating effect of the P2X7-specific constructs. As we previously demonstrated that the injection of 60 mg NAD⁺ provokes the depletion of 80% of Treg (24), we injected here a limited dose of 30 mg of NAD⁺ in order to evaluate the potentiating effect of 14D5-dimHLE. For that, mice were injected again with each AAVnano, followed 28 days after by the *i.v.* injection of 30 mg NAD⁺. Depletion of cell subsets was evaluated by collection and analyses of splenocytes one day after. As expected, untransduced mice showed a limited yet significant depletion of splenic Treg (Figures 5A, B), but not of other T cell subsets that express lower levels of P2X7. In contrast, mice injected with the AAVnano encoding 13A7-IgG1^{LSF} hcAb were protected from NAD⁺-induced Treg depletion. Remarkably, mice injected with the vector encoding the P2X7-potentiating construct 14D5-dimHLE showed significantly enhanced cell depletion, not only for Treg but also for the less sensitive Tconv and CD8⁺ T cell subsets, confirming the potentiating effect observed *ex vivo* (Figures 3B, 5B). These data provide evidence that P2X7 activity at the surface of T cell subsets can be modulated *in vivo* following a single injection of a rAAV1

encoding blocking or potentiating anti-P2X7 nanobody-based biologics.

Depletion *In Vivo* of Cells Expressing ARTC2.2 or P2X7 Using rAAV Coding for Nanobody-Based hcAb

Upon binding, conventional antibodies can promote target cell depletion through their Fc-related effector functions. We aimed here at evaluating P2X7-specific and ARTC2.2-specific hcAb that contain a neutral nanobody (*i.e.*, a nanobody that bind to its target but does not modulate its function) fused to the mouse IgG2a Fc-region, for their capacity to promote cell depletion *in vivo*. For that, we used again rAAV coding for these constructs that we termed 7E2-IgG2a hcAb for the one targeting P2X7, and s-14-IgG2a hcAb for the one directed against ARTC2.2. First, we evaluated the binding of each of these constructs to the surface of mouse T cell subsets. For that, serum from mice injected 63 days earlier with hcAb-encoding rAAV8 were collected and used as a source of hcAb. These sera were then incubated with splenocytes harvested from untreated naive mice and bound hcAb were detected by a IgG2a-specific secondary antibody (Figure 6A). Results confirmed higher binding of s-14-IgG2a hcAb on the surface of the CD8⁺ T cell subsets in agreement with the higher expression of its ARTC2.2 target on this subset (Figure 1A). 7E2-IgG2a hcAb was found to bind at lower levels than s-14-IgG2a hcAb at the surface of each studied T cell subsets, in agreement with the lower expression of P2X7 as compared to ARTC2.2 on these cell populations. Yet, 7E2-IgG2a hcAb was found to bind better on Treg than on Tconv and CD8⁺ T cells (Figure 6A), in agreement with the higher expression of P2X7 on Treg (Figure 1A). Titration analyses indicated that around 1 μl of serum contained saturating amounts of hcAb (Figure 6B). These results indicate that 7E2-IgG2a and s-14-IgG2a hcAb are produced in saturating amounts *in vivo* at least 63 days following a single *i.m.* injection of rAAV.

For comparison, and to evaluate the kinetic and relative abundance of hcAb production *in vivo*, we also used sera (or plasma) collected at different time points from another experiment to stain HEK293-ARTC2.2 or HEK293-P2X7 cell lines expressing high and stable levels of surface ARTC2.2 or P2X7, obtained by retroviral transduction of the parental HEK-293 cell line (Supplemental Figure 2). The data confirm that 7E2-IgG2a hcAb and s-14-IgG2a hcAb are detectable in the circulation at the earlier time point studied (*i.e.*, at day 13 post rAAV8 *i.m.* injection), are produced in all animals that were studied at a rather similar level, and slowly accumulate to reach a maximum concentration between 45 and 66 days post rAAV8 injection and remains stable thereafter (Supplemental Figure 2).

We next analyzed the level of target cell depletion overtime induced by the production of ARTC2.2-specific or P2X7-specific hcAb *in vivo*. Results obtained with the P2X7-specific 7E2-IgG2a hcAb showed a modest depletion of Treg, reaching 18 ± 4% at day 25 post rAAV injection. The proportions of CD4⁺CD25⁻ Tconv and CD8⁺ T cells were only slightly decreased in mice producing 7E2-IgG2a hcAb, consistent with lower levels of P2X7 on these subsets (Figures 6A–C). In contrast, in mice producing

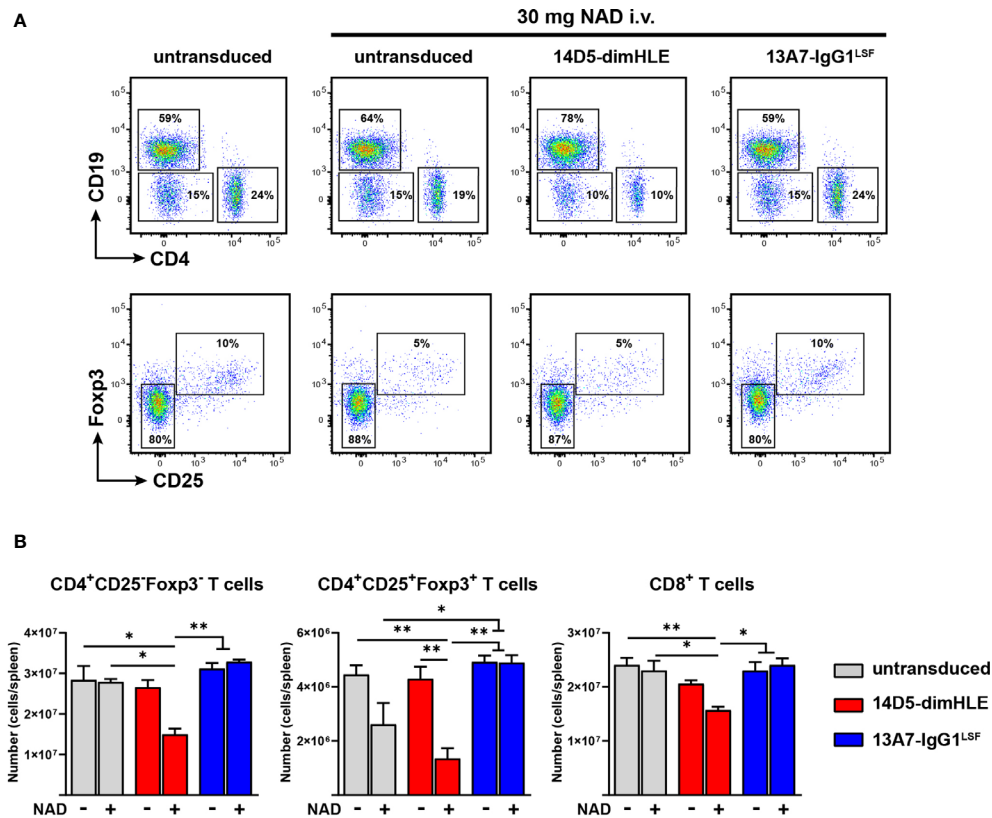


FIGURE 5 | AAVnano modulate *in vivo* the sensitivity to NAD⁺-induced cell death. C57BL/6 mice were injected i.m. with PBS (control) or with rAAV1 encoding the P2X7-potentiating 14D5-dimHLE construct or the P2X7-blocking 13A7-IgG1^{LSF} hcAb construct. 28 days later mice were injected i.v. with PBS or 30 mg NAD⁺. Splenocytes were collected one day after and analyzed by flow cytometry to evaluate the levels of P2X7-dependent T cell depletion induced by NAD⁺ injection. **(A)** Representative flow cytometry plots showing the relative percentages of cells in each group. In the upper panels, CD4⁺, CD8⁺ and CD19⁺ lymphocytes were concatenated in the same subpopulation and analyzed together to visualize the level of depletion of CD4⁺ and CD8⁺ (CD4⁺/CD19⁺) T cells as compared to NAD⁺-insensitive CD19⁺ B cells. In the lower panels, the gated CD4⁺ cells were analyzed for both, expression of Fopx3 and CD25 to evaluate the percentages of Treg depletion in each group. Numbers indicate the percentage of cells in each indicated gate. **(B)** Absolute numbers of cells collected from spleen of untransduced control mice (grey) or from mice injected with rAAV encoding 14D5-dimHLE (red) or for 13A7-IgG1^{LSF} hcAb (blue). Each group was injected i.v. either with PBS (-) or with 30 mg of NAD⁺ (+). Error bars represent the SEM. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA (n=3 in each group, *p < 0.05, **p < 0.01). Staining was performed using fluorochrome conjugated antibodies specific to CD45 (coupled to BV510), CD4 (APC-Cy7), CD8 (BV605), CD19 (PerCP-Cy5.5), CD25 (PE) and Fopx3 (BV421).

ARTC2.2-specific s-14-IgG2a hcAb, we found a substantial depletion of the three T cell subsets analyzed. Depletion was most pronounced for CD8⁺ that express the highest level of ARTC2.2. This construct was indeed found to deplete 85 ± 3% of CD8⁺ T cells, 65 ± 6% of Tconv, and 66 ± 5% of Treg 25 days post rAAV8 injection. The level of depletion was slightly higher at day 82 post rAAV8 injection (**Figure 6C**). For comparison, CD19⁺ B cells (that do not express P2X7 nor ARTC2.2) and myeloid non-granulocytic CD11b⁺ cells (that do express very little, if any, ARTC2.2 and low level of P2X7) were also enumerated in the blood at the same time point. Data demonstrated the absence of depletion of these subsets in agreement with their absence of expression or low expression of ARTC2.2 and/or P2X7 (**Supplemental Figure 3**). These findings illustrate the long-term and stable depleting effects of the target T cells elicited by these IgG2a hcAb upon a single i.m. injection of the corresponding hcAb-encoding rAAV8.

DISCUSSION

Surface expression of the ectoenzyme ARTC2.2 is restricted to T cells and is found at higher levels on murine CD8⁺ T cells as compared to CD4⁺CD25⁺ Treg or CD4⁺CD25⁻ Tconv (**Figure 1A**) (9). P2X7 is expressed by multiple cells, including immune cells of the myeloid and lymphoid compartments. On murine T cells, P2X7 is differentially expressed on T cell subsets, and was found to be expressed at higher levels on NKT cells, Treg, Tfh, and T_{RM} (12, 14–18). The homotrimeric P2X7 receptor is known to form an ATP-gated ion-channel connected to multiple signaling pathways that regulate cell phenotype, functions, differentiation and survival (11). For murine T cells, P2X7 activation can be triggered by two complementary pathways. As in myeloid and non-immune cells, the P2X7 receptor can be gated by the presence of relatively high concentrations of extracellular ATP (*i.e.*, 30 to

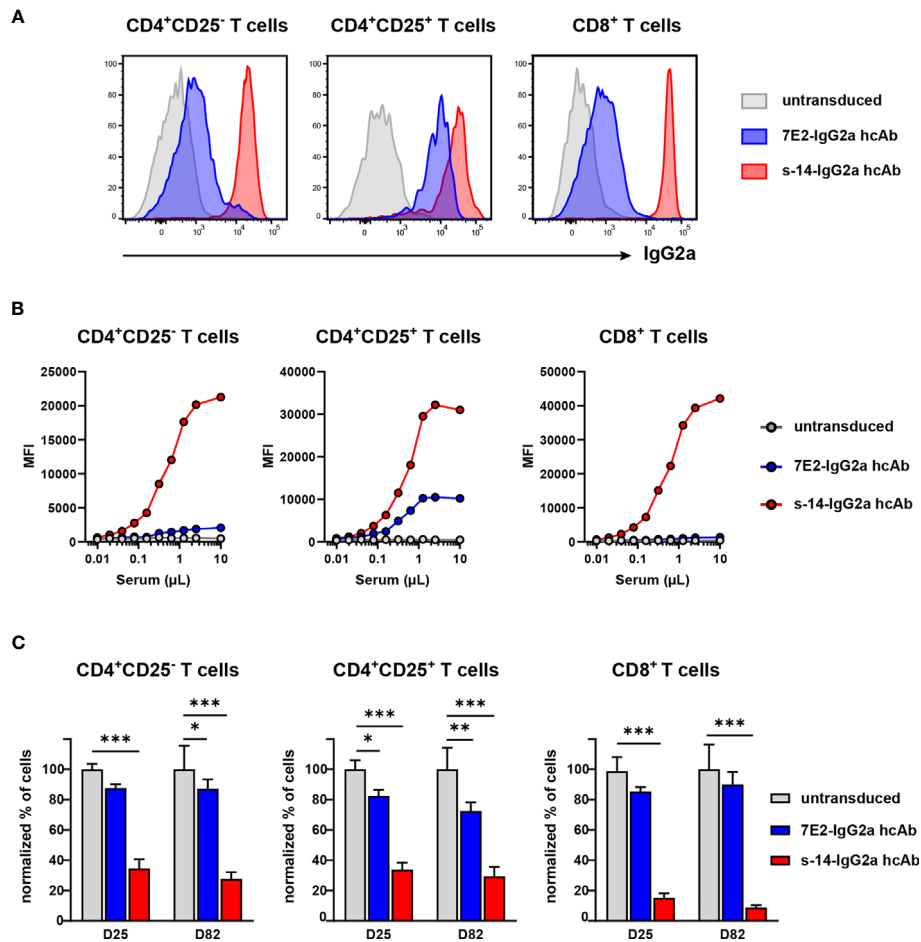


FIGURE 6 | AAVnano encoding nanobody-based IgG2a hcAb mediate depletion of cells expressing high levels of P2X7 or ARTC2.2. C57BL/6 mice were injected with PBS (untransduced, grey) or with rAAV8 encoding 7E2-IgG2a (blue) or s-14-IgG2a (red) hcAb. **(A, B)** Sera were collected 63 days post rAAV8 i.m. injection. To monitor the levels of hcAb in serum, splenocytes from an untreated naive C57BL/6 mouse were incubated with diluted sera, washed and bound hcAb were detected with an IgG2a-specific secondary antibody. **(A)** Flow cytometry analyses illustrating the binding of each nanobody-based IgG2a hcAb on the indicated subset of splenic cells from an untreated mouse when using 10 µl of pooled sera collected from rAAV injected mice. **(B)** Splenocytes from an untreated mouse were incubated with serial dilutions of sera to titrate the relative abundance of the two hcAb. For both hcAb, serum volumes between 1-10 µL were enough to saturate the signal. **(C)** To evaluate depletion of T cell subsets *in vivo*, blood samples were collected 25 days and 82 days after i.m. injection of rAAV encoding the indicated IgG2a hcAb. Cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies and analyzed by flow cytometry. Normalized percentage of CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺ and CD8⁺ T cells are shown, as compared to the percentages of cells found in the control group taken as 100%. Staining was performed using fluorochrome conjugated antibodies specific to CD45 (coupled to PerCP-Cy5.5), CD4 (APC-Cy7), CD8 (PE-Cy7), CD25 (PE) and biotinylated antibody to mouse IgGα and streptavidin-APC. Errors bars represent the SEM and statistical analyses were performed using one-way ANOVA (n=7 in each group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

300 µM range) that can be released from dying or stressed cells. In addition, in murine T cells, extracellular NAD⁺ was found to trigger activation of the P2X7 receptor at low micromolar concentrations (12, 24). The mechanism involves the ARTC2.2 catalyzed covalent ADP-ribosylation of P2X7 on R125 in the vicinity of the ATP-binding site (23). Although much was learnt during the last years on the multifaceted P2X7 receptor, the relative contribution of the ATP and NAD⁺ pathways their activation *in vivo*, their precise immunoregulatory roles, and their contribution in pathophysiological conditions, remain to be better addressed and studied. The AAVnano approach described here uses rAAV for durable production of nanobody-containing

biologics *in vivo*. This could be used in future studies to better delineate ARTC2.2 and/or P2X7 functions in animal models of acute as well as chronic diseases.

Our results show that a single injection of rAAV1 or rAAV8 encoding P2X7-specific or ARTC2.2-specific nanobody-based constructs (**Figure 1**) can inhibit or in contrast potentiate ATP- or NAD⁺-induced activation of P2X7 *ex vivo* on splenic T cells harvested from these mice. As one hallmark associated with P2X7 receptor activation, we used a sensitive *ex vivo* assay based on metalloprotease-dependent shedding of CD27 and CD62L from the T cell surface. Our data demonstrate that a single injection of a rAAV encoding the P2X7-blocking 13A7-

IgG1^{LSF} hcAb protects T cells from NAD⁺- as well as ATP-induced CD27 and CD62L shedding (**Figure 3B**). Similarly, injection of a rAAV encoding the ARTC2.2-blocking s+16a-dimHLE completely inhibits NAD⁺- but not ATP-induced shedding of CD27 and CD62L (**Figure 3B**). Remarkably, the P2X7-potentiating 14D5-dimHLE sensitized T cells to NAD⁺- as well as ATP-induced shedding of CD27 and CD62L. This is noticeable also for Tconv and CD8⁺ T cells that express low levels of P2X7 and are therefore less sensitive to activation of P2X7 than Treg (**Figure 3B**).

Analysis of vascular and tissue resident liver T cells from mice sacrificed 120 days after injection of AAVnano revealed full occupancy of ARTC2.2 by s+16a-dimHLE on CD4⁺ T cells in the vasculature and liver parenchyma (**Figures 4B, C** and data not shown). Moreover, the high recovery of CD69⁺ T_{RM} indicates that this cell population is fully protected from NAD-induced cell death (NICD) during cell preparation in these mice (**Figure 4B**). Much lower numbers of NKT cells and CD69⁺ T_{RM} (*i.e.*, the cell populations with the highest cell surface levels of P2X7) were recovered from mice injected with the rAAV1 encoding 14D5-dimHLE, consistent with its P2X7-potentiating activity that might enhance cell death *in vivo* and/or during cell preparation. High numbers of liver T_{RM} were recovered from mice expressing *in vivo* the P2X7-blocking 13A7-IgG1^{LSF} hcAb, consistent with its protective role on NICD. The low staining of these cells with the IgG1-specific secondary Ab, possibly reflects hcAb induced endocytosis of P2X7 by these cells.

We next evaluated directly *in vivo* the potential of these endogenously produced constructs to modulate P2X7 receptor activation. We previously reported that a single *i.v.* injection of 60 mg NAD⁺ depletes about 80% of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg following ARTC2.2-dependent activation of P2X7 (24). We injected here a lower dose of 30 mg NAD⁺ to better evaluate the potentiating effect of 14D5-dimHLE. The results indeed demonstrate that this dose depletes 41 ± 18% of the Treg cells in untransduced control mice, while 68 ± 9% Treg cells are depleted by the same treatment in animals whose muscle cells had been transduced with rAAV1 coding for 14D5-dimHLE (**Figure 5B**). Even the less sensitive Tconv and CD8⁺ T cells, which were not affected by 30 mg NAD⁺ in untransduced mice, were significantly depleted in animals expressing 14D5-dimHLE (although to a lesser degree than Treg). These results are consistent with the data obtained *ex vivo*, that 14D5-dimHLE potentiates P2X7 function also in T cell subsets that display lower P2X7 surface expression. Taken together, these data demonstrate that the AAVnano approach described here is a feasible approach to reproducibly modulate ARTC2.2 or P2X7 functional activities *in vivo*.

Several small molecules P2X7 blockers have been developed by pharmaceutical and biotechnology companies in the past years since P2X7 is a potential target in inflammatory diseases and in cancer (37–41). Several studies have indeed evidenced that pharmacological blockade of P2X7 is associated with therapeutic benefits in pre-clinical animal models of inflammation, pain, autoimmune and neurodegenerative diseases, and cancer.

Given that many cancer cells express high levels of P2X7 receptors (notably mutated, truncated, or splice variants that are not able to trigger P2X7-dependent cell death), and that its tonic activation in the tumor microenvironment is associated with tumor proliferation and invasiveness, P2X7-blockade was envisioned as a possible cancer therapy. This was demonstrated in several animal studies (42, 43). Using our AAVnano approach, coding for the P2X7-blocking 13A7-IgG1^{LSF} hcAb, we recently reported a similar finding (44). This suggests that the AAVnano methodological approach, in addition to knock-out models and small molecule inhibitors, represents an alternative and complementary possibility to validate *in vivo* the importance of P2X7 target in various animal models.

In addition to P2X7-blockers, some compounds were recently identified as positive allosteric modulators of P2X7 activation (45–47). As for the 14D5-dimHLE biologics described here, these molecules offer the interesting perspective to potentiate P2X7 only in the microenvironment *in vivo* where NAD⁺ and/or ATP are present in the extracellular space in sufficient quantities to trigger P2X7-gating, as for instance in the tumor microenvironment (48). One such small-molecule positive allosteric modulator of P2X7, named HEI3090, has recently shown promising results in mouse models of non-small cell lung cancer and melanoma (49). Interestingly, the mechanism involves the stimulation of immune cells (*i.e.*, dendritic cells, NK cells, and CD4⁺ effector T cells), and production of IL-18. This finding underscores the notion that P2X7 stimulation may indeed be beneficial in certain circumstances. Since both, blocking or potentiating P2X7 seems to be beneficial in some cancer models, the AAVnano approach described here, allowing both modalities to be studied using the same approach, might be used in future studies as a tool to extend our knowledge on the positive and negative functions of P2X7 in different disease models.

Another potential application that we explored here is the development and use of nanobody-based hcAb to promote cell depletion *in vivo*. We exploited the natural ability of Fc-region to bind to FcR on immune cells and to mediate Fc-related effector functions and/or to induce the activation of the classical complement pathway. For that, we fused P2X7-specific or ARTC2.2-specific nanobodies to the hinge and Fc region of mouse IgG2a to generate nanobody-based hcAb. We then evaluated the capacity of these biologics to mediate the depletion of target-expressing cells *in vivo* following *i.m.* injection of rAAV8 that encode these constructs. In line with the cell surface levels of ARTC2.2 and P2X7 on T cell subsets, our results revealed that the ARTC2.2-specific s-14-IgG2a hcAb mediated considerably higher cell depletion than the P2X7-specific 7E2-IgG2a hcAb (**Figure 6C**). Also, when considering each construct individually, the relative level of cell depletion of each T cell subset was found to correlate with the relative abundance of the target protein at the cell surface. Thus, the ARTC2.2-specific s-14-IgG2a hcAb depleted the CD8⁺ subset more efficiently than the other two subsets (**Figures 6A, B**). Similarly, although at lower levels, the P2X7-specific 7E2-IgG2a

hcAb depleted Treg more efficiently than the other two subsets (Figures 6A–C). Hence, cell depletion appeared in our models to depend on the level of the target antigen at the surface of each T cell subset. Higher target antigen levels might indeed promote higher FcγR cross-linking on the surface of effector cells, as well as a higher propensity to bind C1q and to activate the complement cascade. However, we cannot exclude that other factors may contribute to the differences observed in the level of depletion with these two hcAb. Factors such as the location of the epitope recognized by the nanobody, the lateral mobility of the target protein at the cell surface (*i.e.*, ARTC2.2 is GPI-anchored protein while P2X7 is a two-transmembrane domain protein), its degree of oligomerization (ARTC2.2 is a monomer while P2X7 forms a homotrimeric ion channel), may also influence the level of cell depletion. Nonetheless, high levels of cell depletion that reached up to 85% of CD8⁺ cells were reproducibly obtained *in vivo* using the rAAV coding the ARTC2.2-specific s-14-IgG2a hcAb and this level of depletion was remarkably maintained throughout the study until the latest time point studied (Figure 6C). We propose that this strategy may be used to deplete cells that express the highest levels of ARTC2.2 *in vivo* and provides a tool for studying the NAD⁺/ARTC2.2 signaling pathways. In parallel, increasing the depleting efficiency of P2X7-specific hcAb may also be of interest for translational preclinical cancer studies. As mentioned earlier, P2X7 is expressed at the surface of many cancer cells. Depleting P2X7-specific hcAb may thus be used directly to eliminate tumor cells and additionally to deplete Treg (*i.e.*, T cells expressing higher levels of P2X7) potentially resulting in the induction of two synergistic anti-tumor mechanisms.

In this proof-of-principle study, we illustrated the potential of two methodological approaches to study ARTC2.2 and P2X7 function in animal model using rAAV. The aim of AAVnano is to bypass the need to produce and characterize recombinant proteins *in vitro*, to avoid protein injections every 1–2 days, and to favor a stable concentration and bioavailability. We demonstrate that a single i.m. injection of a rAAV encoding a nanobody-based biologic was sufficient to elicit long-term modulation of ARTC2.2 or P2X7 activity, or depletion of the cells expressing these proteins at high cell density. We propose that the AAVnano methodology may be used in future studies for further evaluating the role of ARTC2.2 and/or P2X7 in animal models of various diseases where these proteins have been implicated.

Although this methodological approach have many advantages, including the possibility to explore in parallel potential long-term side effects *in vivo* (*i.e.*, on-target long-term effects as well as off-target effects), AAVnano have also some limitations. Considering the potential long-term side effects, animals remained healthy in our studies during the entire observation period (until day 120) and we did not observed any conspicuous signs of disease or side effects. We cannot however ruled-out that the biologics that were evaluated here induce other effects that we did not fully explored. The P2X7-specific hcAb that we evaluated here may for instance deplete or influence other cells than the studied T cells as for instance

myeloid cells or microglial cells known to also express P2X7. Even if we did not notice any significant depletion of CD11b⁺ myeloid cells in blood during our analyses (Supplemental Figure 3), more detailed investigations will be required in future studies to evaluate this possibility, notably in tissue-resident cells as well as in diseased animal models. Apart from unanticipated side effects, one obvious limitation of our AAVnano approach is the difficulty to evaluate the candidate nanobody-based biologics in therapeutic schemes. Indeed, AAV-based transgenic expression *in vivo* usually require 10 to 14 days before the biologics can be significantly produced and detected in the circulation. This period can however be reduced to 2 to 4 days using a “self-complementary” (sc) transgene instead of the “single-stranded” (ss) transgene packaged in classical rAAV vectors. Production and use of scAAV may represent therefore an interesting alternative to the ssAAV used in this study when rapid production of the biologics is required (as in therapeutic protocols or for treating tumors). Hence, AAVnano represents at least a method of choice in chronic situations and as a first *in vivo* approach to evaluate efficacy and absence of long-term side effects before evaluation of the corresponding selected recombinant biologics in therapeutic and translational models.

Interestingly, the rAAV encoding P2X7-specific constructs described here represent to our knowledge the first tools that can be used *in vivo* to either inhibit or potentiate the P2X7 receptor durably, offering the possibility of evaluating the role of P2X7 in various pathophysiological animal models. This methodical approach may be particularly promising for the reevaluation of the role of P2X7 in cancer as well as in inflammatory and neurodegenerative diseases where conflicting results have been obtained so far using knock-out models and/or repetitive administration of small-molecule inhibitors.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Comité d’Ethique NORmandie en Matière d’EXpérimentation Animale (CENOMEXA).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FK-N and SA, conceptualization. HG, MD, RH, AS, MJ, CP-E, FK-N, and SA, methodology. HG, MD, RH, AS, MJ, CP-E, and SA, investigation. HG, FK-N, and SA, writing – original draft. HG, MD, RH, AS, FK-N, OB, and SA, writing – review and

editing. FK-N and SA, funding acquisition. RV, OB, FK-N, and SA, resources. FK-N and SA, supervision. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) to FK-N (No310/13, No310/14, and SFB1192-B5), by a stipend from the Werner-Otto

Foundation to MJ, and by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) to SA (ANR-18-CE92-0046).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.704408/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Koch-Nolte F, Haag F, Guse AH, Lund F, Ziegler M. Emerging Roles of NAD⁺ and its Metabolites in Cell Signaling. *Sci Signal* (2009) 2:mr1. doi: 10.1126/scisignal.257mr1
- Linden J, Koch-Nolte F, Dahl G. Purine Release, Metabolism, and Signaling in the Inflammatory Response. *Annu Rev Immunol* (2019) 37:325–47. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052406
- Adriouch S, Haag F, Boyer O, Seman M, Koch-Nolte F. Extracellular NAD⁺: A Danger Signal Hinder Regulatory T Cells. *Microbes Infect* (2012) 14:1284–92. doi: 10.1016/j.micinf.2012.05.011
- Koch-Nolte F, Kernstock S, Mueller-Dieckmann C, Weiss MS, Haag F. Mammalian ADP-Ribosyltransferases and ADP-Ribosylhydrolases. *Front Biosci* (2008) 13:6716–29. doi: 10.2741/3184
- Bazan JF, Koch-Nolte F. Sequence and Structural Links Between Distant ADP-Ribosyltransferase Families. *Adv Exp Med Biol* (1997) 419:99–107. doi: 10.1007/978-1-4419-8632-0_12
- Glowacki G, Braren R, Firner K, Nissen M, Kühl M, Reche P, et al. The Family of Toxin-Related Ecto-ADP-Ribosyltransferases in Humans and the Mouse. *Protein Sci* (2009) 11:1657–70. doi: 10.1110/ps.0200602
- Koch-Nolte F, Petersen D, Balasubramanian S, Haag F, Kahlke D, Willer T, et al. Mouse T Cell Membrane Proteins Rt6-1 and Rt6-2 are Arginine/Protein Mono(ADPribose)transferases and Share Secondary Structure Motifs With ADP-Ribosylating Bacterial Toxins. *J Biol Chem* (1996) 271:7686–93. doi: 10.1074/jbc.271.13.7686
- Hong S, Brass A, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F, Dubyak GR. Basal and Inducible Expression of the Thiol-Sensitive ART2.1 Ecto-ADP-Ribosyltransferase in Myeloid and Lymphoid Leukocytes. *Purinergic Signal* (2009) 5:369–83. doi: 10.1007/s11302-009-9162-2
- Koch-Nolte F, Duffy T, Nissen M, Kahl S, Killeen N, Ablamunits V, et al. A New Monoclonal Antibody Detects a Developmentally Regulated Mouse Ecto-ADP-Ribosyltransferase on T Cells: Subset Distribution, Inbred Strain Variation, and Modulation Upon T Cell Activation. *J Immunol* (1999) 163:6014–22.
- Adriouch S, Bannas P, Schwarz N, Fliegert R, Guse AH, Seman M, et al. ADP-Ribosylation at R125 Gates the P2X7 Ion Channel by Presenting a Covalent Ligand to its Nucleotide Binding Site. *FASEB J* (2008) 22:861–9. doi: 10.1096/fj.07-9294com
- Rissiek B, Haag F, Boyer O, Koch-Nolte F, Adriouch S. P2X7 on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions. *Front Immunol* (2015) 6:204. doi: 10.3389/fimmu.2015.00204
- Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, Glowacki G, et al. NAD-Induced T Cell Death: ADP-Ribosylation of Cell Surface Proteins by ART2 Activates the Cytolytic P2X7 Purinoceptor. *Immunity* (2003) 19:571–82. doi: 10.1016/s1074-7613(03)00266-8
- Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Krebs C, Bannas P, Rissiek B, et al. NAD⁺ and ATP Released From Injured Cells Induce P2X7-Dependent Shedding of CD62L and Externalization of Phosphatidylserine by Murine T Cells. *J Immunol* (2009) 182:2898–908. doi: 10.4049/jimmunol.0801711
- Rissiek B, Danquah W, Haag F, Koch-Nolte F. Technical Advance: A New Cell Preparation Strategy That Greatly Improves the Yield of Vital and Functional Tregs and NKT Cells. *J Leukocyte Biol* (2014) 95:543–9. doi: 10.1189/jlb.0713407
- Stark R, Wesselink TH, Behr FM, Kragten NAM, Arens R, Koch-Nolte F, et al. TRM Maintenance is Regulated by Tissue Damage via P2RX7. *Sci Immunol* (2018) 3. doi: 10.1126/sciimmunol.aau1022
- Borges da Silva H, Wang H, Qian LJ, Hogquist KA, Jameson SC. ARTC2.2/P2RX7 Signaling During Cell Isolation Distorts Function and Quantification of Tissue-Resident CD8⁺ T Cell and Invariant NKT Subsets. *Ji* (2019) 202:2153–63. doi: 10.4049/jimmunol.1801613
- Georgiev H, Ravens I, Papadogianni G, Malissen B, Förster R, Bernhardt G. Blocking the ART2.2/P2X7-System Is Essential to Avoid a Detrimental Bias in Functional CD4⁺ T Cell Studies. *Eur J Immunol* (2018) 48:1078–81. doi: 10.1002/eji.201747420
- Rissiek B, Lukowiak M, Raczkowski F, Magnus T, Mittrücker H-W, Koch-Nolte F. *In Vivo* Blockade of Murine ARTC2.2 During Cell Preparation Preserves the Vitality and Function of Liver Tissue-Resident Memory T Cells. *Front Immunol* (2018) 9:1580. doi: 10.3389/fimmu.2018.01580
- Muyldermans S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu Rev Biochem* (2013) 82:775–97. doi: 10.1146/annurev-biochem-063011-092449
- Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, et al. Single Domain Antibodies: Promising Experimental and Therapeutic Tools in Infection and Immunity. *Med Microbiol Immunol* (2009) 198:157–74. doi: 10.1007/s00430-009-0116-7
- Ingram JR, Schmidt FI, Ploegh HL. Exploiting Nanobodies' Singular Traits. *Annu Rev Immunol* (2018) 36:695–715. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053327
- De Genst E, Silence K, Decanniere K, Conrath K, Loris R, Kinne J, et al. Molecular Basis for the Preferential Cleft Recognition by Dromedary Heavy-Chain Antibodies. *Proc Natl Acad Sci* (2006) 103:4586–91. doi: 10.1073/pnas.0505379103
- Koch-Nolte F, Reyelt J, Schößow B, Schwarz N, Scheuplein F, Rothenburg S, et al. Single Domain Antibodies From Llama Effectively and Specifically Block T Cell Ecto-ADP-Ribosyltransferase ART2.2 *In Vivo*. *FASEB J* (2007) 21:3490–8. doi: 10.1096/fj.07-8661com
- Hubert S, Rissiek B, Klages K, Huehn J, Sparwasser T, Haag F, et al. Extracellular NAD⁺ Shapes the Foxp3⁺ Regulatory T Cell Compartment Through the ART2–P2X7 Pathway. *J Exp Med* (2010) 207:2561–8. doi: 10.1084/jem.20091154
- Danquah W, Meyer-Schwesinger C, Rissiek B, Pinto C, Serracant-Prat A, Amadi M, et al. Nanobodies That Block Gating of the P2X7 Ion Channel Ameliorate Inflammation. *Sci Transl Med* (2016) 8:366ra162. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf8463
- Koch-Nolte F, Eichhoff A, Pinto-Espinoza C, Schwarz N, Schäfer T, Menzel S, et al. Novel Biologics Targeting the P2X7 Ion Channel. *Curr Opin Pharmacol* (2019) 47:110–8. doi: 10.1016/j.coph.2019.03.001
- Kaczmarek-Hajek K, Zhang J, Kopp R, Grosche A, Rissiek B, Saul A, et al. Re-Evaluation of Neuronal P2X7 Expression Using Novel Mouse Models and a P2X7-Specific Nanobody. *eLife* (2018) 7:e36217. doi: 10.7554/eLife.36217
- Saunders KO. Conceptual Approaches to Modulating Antibody Effector Functions and Circulation Half-Life. *Front Immunol* (2019) 10:1296. doi: 10.3389/fimmu.2019.01296
- Tijink BM, Laeremans T, Budde M, Stigter-van Walsum M, Dreier T, de Haard HJ, et al. Improved Tumor Targeting of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Nanobodies Through Albumin Binding: Taking Advantage of Modular Nanobody Technology. *Mol Cancer Ther* (2008) 7:2288–97. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-2384

30. Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, et al. Increasing the Serum Persistence of an IgG Fragment by Random Mutagenesis. *Nat Biotechnol* (1997) 15:637–40. doi: 10.1038/nbt0797-637
31. Chen H. Manufacturing of Adeno-Associated Viruses, for Example: AAV2. *Methods Mol Biol* (2011) 737:235–46. doi: 10.1007/978-1-61779-095-9_10
32. Balazs AB, Chen J, Hong CM, Rao DS, Yang L, Baltimore D. Antibody-Based Protection Against HIV Infection by Vectored Immunoprophylaxis. *Nature* (2011) 481:81–4. doi: 10.1038/nature10660
33. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Divergent Immunoglobulin G Subclass Activity Through Selective Fc Receptor Binding. *Science* (2005) 310:1510–2. doi: 10.1126/science.1118948
34. Anderson KG, Mayer-Barber K, Sung H, Beura L, James BR, Taylor JJ, et al. Intravascular Staining for Discrimination of Vascular and Tissue Leukocytes. *Nat Protoc* (2014) 9:209–22. doi: 10.1038/nprot.2014.005
35. Schenkel JM, Masopust D. Tissue-Resident Memory T Cells. *Immunity* (2014) 41:886–97. doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.007
36. Mueller SN, Mackay LK. Tissue-Resident Memory T Cells: Local Specialists in Immune Defence. *Nat Rev Immunol* (2016) 16:79–89. doi: 10.1038/nri.2015.3
37. Jacobson KA, Müller CE. Medicinal Chemistry of Adenosine, P2Y and P2X Receptors. *Neuropharmacology* (2016) 104:31–49. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.12.001
38. Burnstock G, Knight GE. The Potential of P2X7 Receptors as a Therapeutic Target, Including Inflammation and Tumour Progression. *Purinergic Signal* (2018) 14:1–18. doi: 10.1007/s11302-017-9593-0
39. Sluyter R. The P2X7 Receptor. *Adv Exp Med Biol* (2017) 1051:17–53. doi: 10.1007/5584_2017_59
40. De Marchi E, Orioli E, Dal Ben D, Adinolfi E. P2X7 Receptor as a Therapeutic Target. *Adv Protein Chem Struct Biol* (2016) 104:39–79. doi: 10.1016/bs.apcsb.2015.11.004
41. Di Virgilio F, Sarti AC, Falzoni S, De Marchi E, Adinolfi E. Extracellular ATP and P2 Purinergic Signalling in the Tumour Microenvironment. *Nat Rev Cancer* (2018) 18:601–18. doi: 10.1038/s41568-018-0037-0
42. De Marchi E, Orioli E, Pegoraro A, Sangaletti S, Portararo P, Curti A, et al. The P2X7 Receptor Modulates Immune Cells Infiltration, Ectonucleotidases Expression and Extracellular ATP Levels in the Tumor Microenvironment. *Oncogene* (2019) 38:3636–50. doi: 10.1038/s41388-019-0684-y
43. Adinolfi E, Raffaghello L, Giuliani AL, Cavazzini L, Capece M, Chiozzi P, et al. Expression of P2X7 Receptor Increases *In Vivo* Tumor Growth. *Cancer Res* (2012) 72:2957–69. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1947
44. Demeules M, Scarpitta A, Abad C, Gondé H, Harget R, Pinto-Espinoza C, et al. Evaluation of P2X7 Receptor Function in Tumor Contexts Using rAAV Vector and Nanobodies (AAVnano). *Front Oncol* (2020) 10:1699. doi: 10.3389/fonc.2020.01699
45. Bartlett R, Stokes L, Sluyter R. The P2X7 Receptor Channel: Recent Developments and the Use of P2X7 Antagonists in Models of Disease. *Pharmacol Rev* (2014) 66:638–75. doi: 10.1124/pr.113.008003
46. Di Virgilio F, Giuliani AL, Vultaggio-Poma V, Falzoni S, Sarti AC. Non-Nucleotide Agonists Triggering P2X7 Receptor Activation and Pore Formation. *Front Pharmacol* (2018) 9:39. doi: 10.3389/fphar.2018.00039
47. Stokes L, Bidula S, Bibič L, Allum E. To Inhibit or Enhance? Is There a Benefit to Positive Allosteric Modulation of P2X Receptors? *Front Pharmacol* (2020) 11:627. doi: 10.3389/fphar.2020.00627
48. Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* (2017) 47:15–31. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.020
49. Douguet L, Janho Dit Hreich S, Benzaquen J, Seguin L, Juhel T, Dezitter X, et al. A Small-Molecule P2RX7 Activator Promotes Anti-Tumor Immune Responses and Sensitizes Lung Tumor to Immunotherapy. *Nat Commun* (2021) 12:653. doi: 10.1038/s41467-021-20912-2

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Gondé, Demeules, Harget, Scarpitta, Junge, Pinto-Espinoza, Varin, Koch-Nolte, Boyer and Adriouch. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

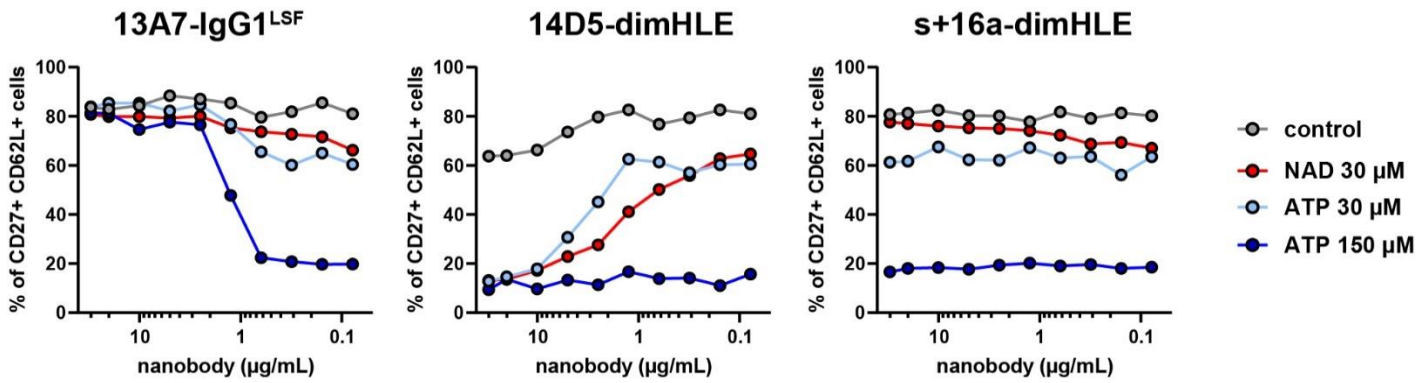
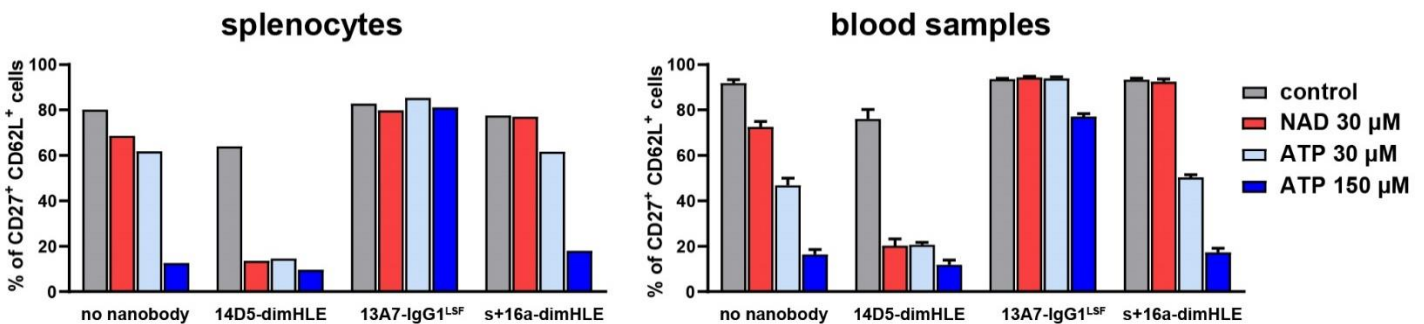
A**B**

Figure S1: Recombinant nanobody constructs modulate P2X7-dependent shedding of CD27 and CD62L *in vitro*

(A) Splenocytes for untransduced mice were collected and incubated for 60 min at 4°C without recombinant nanobodies (control) or with decreasing concentrations of the indicated recombinant 13A7-IgG1^{LSF}, 14D5-dimHLE or s+16a-dimHLE nanobody-constructs. Cells were then incubated for 15 min at 37°C after addition of PBS (grey), 30 μM NAD (red), 30 μM ATP (cyan) or 150 μM ATP (blue). Dose-responses curves indicate the percentages of CD27⁺CD62L⁺ cells among the gated CD4⁺CD25⁻ T cells. (B) Splenocytes (left) or pooled blood samples (right) from untransduced C57BL/6 mice were collected and incubated for 60 min at 4°C with or without the indicated recombinant nanobody-construct 13A7-IgG1^{LSF}, 14D5-dimHLE or s+16a-dimHLE added at a saturating concentration of 20 μg/ml. Cells were then incubated for 15 min at 37°C after addition of PBS (grey), 30 μM NAD⁺ (red), 30 μM ATP (cyan) or 150 μM ATP (blue). Bar graphs represent mean percentages of CD27⁺CD62L⁺ cells among the gated CD4⁺CD25⁻ T cells and errors bars represent SEM, (n=1 for splenocytes and n=3 for blood samples).

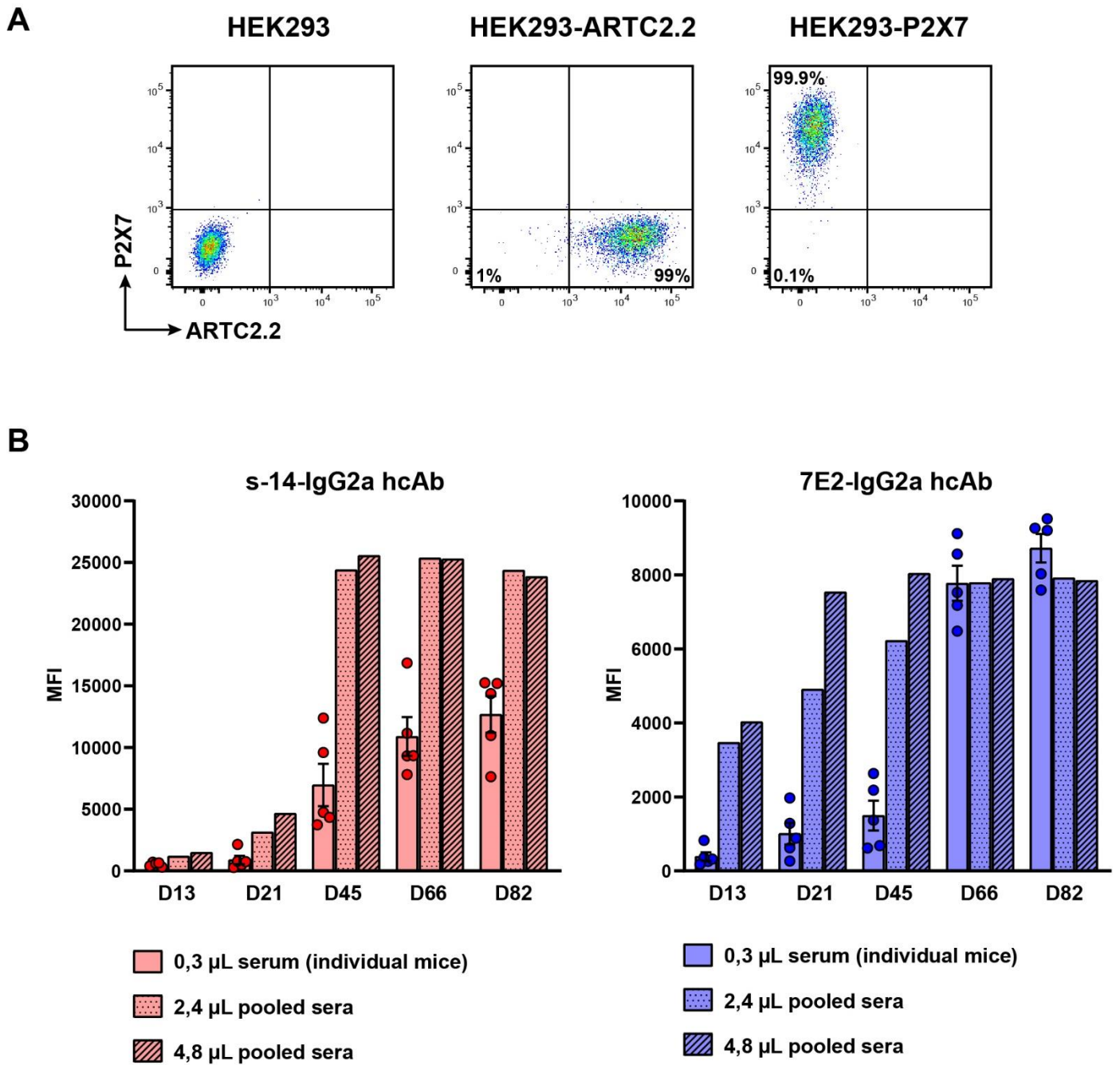


Figure S2: Kinetic and relative abundance in the circulation of the nanobody constructs produced *in vivo* following a single injection of the corresponding AAVnano

(A) HEK-293 cells were transduced by a retroviral vector to express ARTC2.2 (HEK293-ARTC2.2) or P2X7 (HEK293-P2X7), these cells were further used here to analyze the relative abundance of 7E2-IgG2a hcAb or s-14-IgG2a hcAb in the sera or plasma of transduced mice overtime. (B) C57BL/6 mice were injected with PBS or with rAAV8 encoding 7E2-IgG2a or s-14-IgG2a hcAb. Plasma or sera were collected on days 13, 21, 45,

66 and 82 post rAAV8 i.m. injection. To monitor the kinetic and to estimate the relative abundance of hcAb production in the circulation, HEK293-ARTC2.2 cells (for detection of s-14-IgG2a hcAb, in red) or HEK293-P2X7 cells (for detection of 7E2-IgG2a, in blue) were incubated with 0.3 μ L of serum collected from each individual mouse or with the corresponding quantity of plasma. In addition, cells were also incubated with higher quantities of pooled sera (or corresponding quantity of plasma) to estimate the level of saturation at each time point of the kinetic. For that, sera (or equivalent quantities of plasma) collected from individual mouse at each time point were pooled, and 2.4 μ L (dotted pattern), or 4.8 μ L (hatched pattern) were used to stain the cells. After washing, bound hcAbs were detected using a biotinylated IgG2a-specific secondary antibody followed with streptavidin-PE. Closed circles correspond to the mean fluorescence intensity (MFI) staining obtained from the sera (or equivalent quantities of plasma) of each individual mouse (n=5). Bar graphs and errors bars represent respectively the mean and SEM values at each analyzed time points. For negative control, sera (or corresponding quantity of plasma) collected from untransduced mice were pooled and used. Resulting background levels were estimated to correspond to a MFI of 243 ± 8 for detection of s-14-IgG2a hcAb (left histograms) and to a MFI of 168 ± 23 for detection of 7E2-IgG2a hcAb (blue histograms).

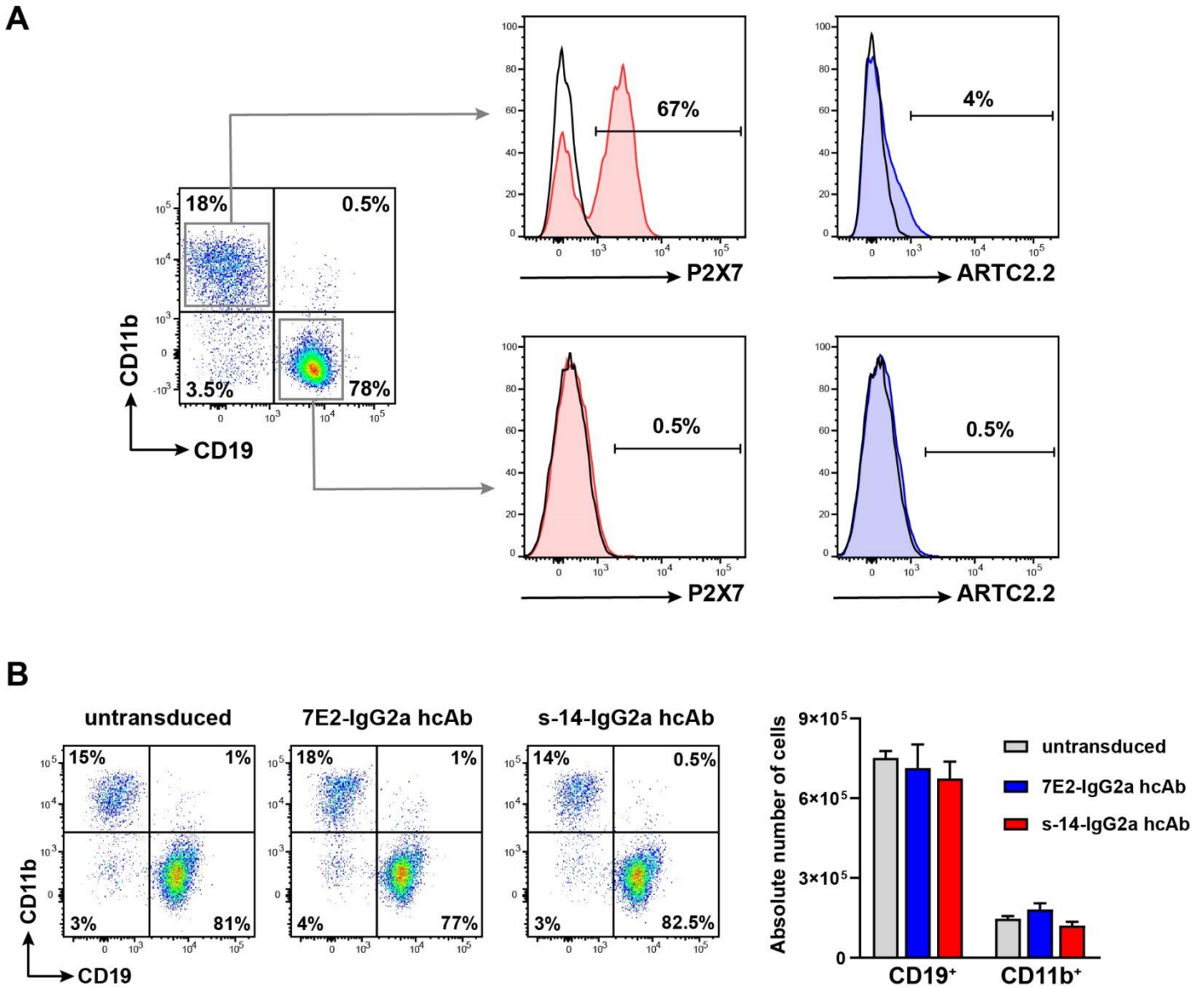


Figure S3: Blood $CD19^+$ B cells and myeloid non-granulocytic $CD11b^+$ cells are unaffected by nanobody-based IgG2a hcAb constructs

(A) Flow cytometry analyses illustrating the level of expression of P2X7 and ARTC2.2 on the surface of blood $CD19^+$ B cells and on non-granulocytic $CD11b^+$ cells of untreated mice. Cells were gated on $CD45^+CD4^+CD8^-$ cells, and dead cells and granulocytes were excluded based on the scatters. Flow cytometry histograms represent staining of P2X7 (red) or ARTC2.2 (blue) or negative controls (black line) corresponding to isotype control (for ARTC2.2 staining), or to secondary antibody alone (for P2X7 staining). Numbers correspond to the percentage of cells in each indicated gate. Staining was performed using fluorochrome

conjugated antibodies specific to CD45 (coupled to BV510), CD11b (FITC), CD19 (PerCP-Cy5.5), or ARTC2.2 (AF647). Staining for P2X7 was performed using polyclonal rabbit antibody K1G followed by a polyclonal secondary anti-rabbit IgG coupled to APC. **(B)** C57BL/6 mice were injected with PBS (untransduced, grey) or with rAAV8 encoding 7E2-IgG2a (blue) or s-14-IgG2a (red) hcAb. On day 82, blood samples were collected and stained using fluorochrome conjugated antibodies specific to CD45 (coupled to BV510), CD11b (FITC), CD19 (PerCP-Cy5.5). Representative flow cytometry dot plots were gated on CD45⁺CD4⁻CD8⁻ cells, and dead cells and granulocytes were excluded based on the scatters. Numbers correspond to the percentage of cells in each indicated quadrant. Histogram graphs represent the absolute numbers of CD11b⁻CD19⁺ B cells (CD19⁺) and the absolute numbers of myeloid non-granulocytic CD11b⁺CD19⁻ cells (CD11b⁺) in each indicated group of mice. Errors bars represent the SEM, n=5.

B. Manuscrit: « Nanobody-based biologics induce specific and efficient *in vivo* depletion of cells expression P2X7 and/or ARTC2.2. »

Contexte de l'étude

Les anticorps déplétant sont largement utilisés dans le traitement du cancer et des maladies auto-immunes pour leur capacité à engager les mécanismes effecteurs (ADCC, ADCP et CDC) après fixation. Dans ce manuscrit, nous relatons l'évaluation *in vivo* d'anticorps à chaîne lourde (HcAbs) basés sur la fusion de nanobodies à un fragment Fc de sous-classe IgG2a ou IgG2c, comme format alternatif aux anticorps déplétant conventionnels. Nous avons utilisé un modèle d'étude basé sur P2X7 et ARTC2.2, qui sont exprimés sur différentes sous-populations de lymphocytes T et pour lequel nous disposons de plusieurs clones de nanobodies.

Principaux résultats

- Une injection unique intramusculaire de rAAV codant pour les constructions HcAbs permet d'induire une déplétion stable à long terme des lymphocytes T cibles.
- La construction anti-ARTC2.2 déplete efficacement les lymphocytes T CD8+ exprimant ARTC2.2 à un niveau élevé.
- La construction anti-P2X7 déplete 40-50% des lymphocytes T régulateurs exprimant P2X7 à un niveau élevé.
- La déplétion cellulaire est corrélée à la densité antigénique dans chaque sous-population de lymphocytes T, même si d'autres facteurs semblent moduler l'efficacité de la déplétion cellulaire, dont le clone de nanobody et les facteurs génétiques.
- Une déplétion sélective pour les cellules exprimant des niveaux élevés des deux cibles peut être obtenue avec la construction bispécifique en réduisant les doses.

Nanobody-based biologics induce specific and efficient *in vivo* depletion of cells expressing P2X7 and/or ARTC2.2

Henri Gondé^{1,2}, Romain Harget¹, Mélanie Demeules¹, Allan Scarpitta¹, Marine Blandin¹,
Wäldemar Schäffer³, Friedrich Koch-Nolte³, Olivier Boyer^{1,4} and Sahil Adriouch¹

¹ University of Rouen, INSERM, U1234, Pathophysiology Autoimmunity and Immunotherapy (PANTHER), Normandie Univ, Rouen, France.

² Rouen University Hospital, Department of Pharmacy, Rouen, France.

³ Institute of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany.

⁴ Rouen University Hospital, Department of Immunology and Biotherapy, Rouen, France.

Correspondence to

Prof. Sahil ADRIOUCH

Université de Rouen Normandie

Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (iRiB)

22 Boulevard Gambetta

76183 Rouen Cedex 1, France

Phone: +33 2 35 14 85 43

e-mail: sahil.adriouch@univ-rouen.fr

Short title: nanobody-based biologics evaluated for cell-depletion

Abstract:

Depleting antibodies are used to treat malignancies and autoimmune diseases by engaging antibody-dependent cell cytotoxicity and phagocytosis, and activation of the complement pathway. Here, we developed and evaluated nanobody-based heavy chain antibodies (HcAbs) by fusing nanobodies to the Fc-region of IgG, as an alternative and versatile format of depleting biologics. For rapid *in vivo* screening of the designed constructs, we developed a method based on recombinant AAV vectors (rAAV) encoding either the mono- or the bi-specific biologics. As a model, we used here nanobody-based biologics targeting the ARTC2.2 or P2X7 targets, expressed on different murine T cell subsets, and for which several nanobody clones have been previously generated and characterized. A single injection of rAAV elicited stable cell depletion of the cell subsets expressing the targets. Overall, cell depletion mediated by mono-specific HcAbs correlated with antigen density but other factors likely accounted for the level of cell depletion. The bispecific HcAb induced lower level of depletion of the cells expressing both ARTC2.2 and P2X7, with no obvious increase in selectivity towards the cells expressing the highest levels of the targeted molecules. However, lowering the doses of the bispecific biologics resulted in slightly enhanced selectivity for the cells expressing both targets. This may suggest that high affinity of each individual nanobody for their cognate target may limit selectivity of the bispecific biologic by enhancing dispersion to multiple cell subsets. Taken together, this study demonstrates the efficacy and versatility of nanobody-based biologics to induce cell depletion and provides insights on the factors governing cell depletion *in vivo*.

INTRODUCTION

During the last decades, monoclonal antibodies have become essential therapeutic tools and among them, depleting antibodies (*e.g.*, anti-CD20 rituximab, anti-CD52 alemtuzumab and anti-CD38 daratumumab) are widely used to treat malignancies and auto-immune diseases, given their ability to engage effector mechanisms upon binding to Fc gamma receptors (FcγR), to promote antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC), antibody-dependent phagocytosis (ADCP), and to activate the classical complement pathway promoting complement-dependent cell cytotoxicity (CDC) (1–3). Despite the therapeutic importance of antibodies, still little is known about the different factors that influence cell depletion, and their value to predict cell depletion *in vivo*. However some common factors have been reported to contribute to cell depletion. For instance, high antigen density at the cell surface have been suggested to favour CDC and ADCC (4–6). However, antibody targeting the same antigen often display variable efficacy to induce cell depletion, highlighting the contribution of other factors. For instance, as discovered in the context of the development of therapeutics anti-CD20 monoclonal antibodies, depending on the recognized epitope monoclonal antibodies can either engage effectors functions and trigger cell depletion or can trigger direct cell apoptosis through homotypic adhesion and contribute to limited target cells elimination independently of antibody effector functions (7,8). Not only its density at the cell surface, but also antigen size influence efficacy of CDC and ADCC. Reportedly binding to short antigens, or to epitopes located nearby the plasma membrane, favour CDC and ADCC whereas ADCP require a certain distance between the antigen and the plasma membrane (9). Also, CDC had been associated with the clustering of target proteins in cholesterol-enriched lipid rafts (10) suggesting that lipid composition as well as posttranslational protein modification (*e.g.*, glycosylphosphatidylinositol anchors, or protein lipidation by palmitoylation or myristoylation for instance) may influence depletion efficiency. However, cell depletion by conventional antibodies can be sometimes hindered by

several poorly characterized factors, including antigen internalisation leading to so-called antigenic modulation (11).

In the early 1990s, non-conventional immunoglobulin G (IgG) antibodies were serendipitously discovered in the sera of camelids. In addition to conventional antibodies, camelids naturally produce heavy chain antibodies (HcAbs) that are devoid of light chains and C_{H1} regions but exhibit similar specificity and affinity than conventional antibodies (12,13). The antigen binding single-chain variable fragments of HcAbs, termed V_HH or nanobodies, are linked directly to the hinge and Fc-regions of IgG heavy chains. The general structure of nanobodies is similar to that of V_H domains of conventional antibodies, forming a classical immunoglobulin fold, except that some hydrophobic residues found at the interface between V_H and V_L are replaced by residues bearing smaller and/or hydrophilic side chains, contributing to the better solubility and stability of nanobodies (14–16). The CDR3 of nanobodies is usually longer than in conventional antibodies and can form a prominent loop, providing nanobodies with the ability to form convex paratopes and thus interact with protein cavities that are otherwise difficult to target with conventional antibodies (17). Such cavities generally correspond to the functional regions of proteins (*e.g.*, the active site of enzymes, the ligand-binding site or allosteric sites), positioning nanobodies as potential modulating biologics (18).

Another interesting feature offered by single-chain nanobodies, is the possibility to be readily reformatted and/or combined (19). A bivalent molecule with a higher avidity for the antigen could be obtained by fusing two identical nanobodies connected by a peptide linker (*e.g.* a flexible glycine-serine linker) (20). Nanobodies could also be fused to the Fc-region of conventional antibody to reproduce naturally occurring HcAbs in camelids, resulting in a bivalent format with better *in vivo* half-life. Depending on the isotype of the Fc-region, this type of biologic can promote engagement of effector functions with the aim to develop depleting HcAbs as an alternative format to conventional depleting antibodies (21). Bispecific or

biparatopic biologics can also be easily obtained by fusion of two monomers targeting two different antigens or paratopes (22–25).

In our previous studies, modulating nanobody-based biologics targeting ARTC2.2 and P2X7 have been characterized and evaluated (18,26–28). ARTC2.2 is a 35 kDa GPI-anchored monomeric ectoenzyme predominantly expressed on the surface of murine T cells (29,30). In presence of extracellular NAD^+ , ARTC2.2 catalyzes the ADP-ribosylation of several cell surface proteins, including P2X7, a 195 kDa protein that assemble in a homotrimeric purinergic receptor. Activation of P2X7 on T cells, by extracellular ATP or by ARTC2.2-mediated ADP-ribosylation, triggers formation of a nonselective cation channel resulting in membrane depolarization, calcium influx, metalloproteases activation, phosphatidylserine exposure, and ultimately to cell death (31–35). We previously demonstrated that biologics based on the modulating nanobodies s+16a or 13A7 respectively inhibits ARTC2.2 and P2X7(1,28,36). In contrast, biologics based on nanobody 14D5 potentiate activation of P2X7 by its ligands, behaving as an allosteric modulator (1,28,36).

In the present study, we aimed to develop and evaluate nanobody-based biologics depleting cells expressing ARTC2.2 and/or P2X7. For that, we made used of other available nanobody clones that bind to P2X7 (nanobody clones 7E2, 8G11, 1C81) or that bind to ARTC2.2 (clone s-14) (26,28). Nanobody 7E2 and 8G11 binds mouse P2X7 and display little if any effect on P2X7 functional activity. Nanobodies 1C81 and 13A7 are potent blocker of P2X7 activation by both extracellular ATP and NAD^+ (28,37).

We generated mono- and bi-specific HcAbs targeting ARTC2.2 and/or P2X7 by fusing these nanobodies to murine IgG2a or IgG2c Fc-regions and evaluated their capacity to deplete cells *in vivo*. For rapid and comparative evaluation of their cell depleting efficiency *in vivo*, we generated rAAV vectors coding for each of these available nanobody-based biologics to promote they direct *in vivo* production. Using this screening method, we demonstrated that a

single intramuscular injection of rAAV8 coding for these biologics was sufficient to elicit long-term and stable cell depletion of their target T cell subsets, albeit at different levels. Nanobody-based biologic derived from s-14, targeting ARTC2.2, very efficiently depletes up to 90% of CD8⁺ T cells which express high levels of ARTC2.2 at the cell surface. In contrast, nanobody-based biologic targeting P2X7 deplete at most up to 40-50% of the Tregs subset, expressing the highest target level at the cell surface. Hence, in line with other studies, cell depletion correlated with the antigen density in each T cell subset, even if other factors appear to modulate cell depletion efficacy including nanobody clone and genetic factors. The bi-specific biologics did not show specificity for cell expressing the highest levels of both targets, but selectivity could be increased by reducing the doses. Overall, the present study paves the way for the development of mono-specific as well as bi-specific nanobody-based biologic harbouring the Fc-region of classical IgG depleting antibodies. Moreover, the tools developed in the present study could of interest in the study of the biological roles of ARTC2.2 and P2X7, as well as in the study of T cells subsets.

MATERIAL AND METHODS

Mice

C57BL/6 and BALB/c wild-type mice obtained from Janvier Labs were housed in a specific pathogen-free facility. Female mice aged of 8 weeks, at the beginning of the experiments, were used. All animal experiments were approved by the local institutional committee.

Reagents and antibodies

Red blood cell (RBC) lysis and intracellular staining permeabilization wash buffer were purchased from Sony Biotechnology. Fluorochrome-conjugated streptavidin and antibodies to CD45 (clone 30-F11), CD4 (RM4-5), CD8 (53-6.7), CD25 (PC-61), CD19 (1D3/CD19), FoxP3 (MF-14), and purified CD16/CD32 (TruStain FcX) were obtained from Biolegend or Sony Biotechnology. Biotinylated polyclonal antibody specific to mouse IgG_a was obtained from Jackson ImmunoResearch and monoclonal antibody to ARTC2.2 (Nika102) from Novus Biologicals. P2X7-specific polyclonal rabbit antibodies K1G (33) was used to stain P2X7 at the surface of T cells, followed by a secondary donkey anti-rabbit IgG from Jackson ImmunoResearch. Purified anti-CD47 monoclonal antibody (MIAP410), and relative mouse IgG1 κ isotype control (MOPC-21), were obtained from Bioxcell.

Generation and design of nanobody-based mono- and bi-specific constructs

Amino acid sequences of HcAb constructs are depicted in [Supplemental Table 1](#). Monospecific HcAbs were constructed by fusing anti-P2X7 (7E2, 8G11, 1C81, 14D5 and 13A7) (28) or anti-ARTC2.2 (s-14) (26) to the hinge region of mouse subclass IgG2a using a 5-GS linker (GGGGS). For the design of bispecific HcAbs, C-terminal part of anti-ARTC2.2 nanobody s-14 was linked to N-terminal part of anti-P2X7 nanobody 7E2 using a 35-GS linker (GGGGS)⁷. Using an additional 5-GS linker, C-terminal part of 7E2 was fused to the Fc-region

of mouse subclass IgG2a, or IgG2c. As a negative control, 7E2 was fused to a mutated IgG2a Fc-region bearing the effector-attenuating mutations L234A, L235A, and P329G (IgG2a^{LALAPG}) (38).

Production of recombinant nanobody-based HcAbs biologics

HEK293-EBNA1-6E cells (HEK-6E) were obtained from National Research Council Canada (CNRC). Cells were cultured according to supplier's recommendations in serum-free F17 medium (ThermoFisher Scientific) supplemented with Kolliphor P188 (Sigma) and L-Glutamine (ThermoFisher Scientific). Transient transfection was performed using polyethylenimine hydrochloride (PEI MAX) obtained from Polysciences. Six days after, culture supernatant was collected and HcAbs were purified on HiTrap Protein G HP columns (Cytiva).

Production of rAAV8 vector and muscle transduction

All constructs were cloned in a pFB plasmid under the control of a CASI promoter, combining the CMV enhancer, the chicken β -actin promoter and the ubiquitin enhancer region flanked by splice donor/acceptor sites (39). Production, purification and titration of rAAV serotype 8 (rAAV8) were performed by Virovek (Hayward, California, USA) using the baculovirus expression system in SF9 insect cells (40). For muscle transduction, mice were anaesthetised, hind legs were shaved, and 100 μ L diluted rAAV8 were injected into 4 gastrocnemius muscle sites to reach a total dose of $1 \cdot 10^{11}$ viral genomes (vg) per mouse, except when otherwise indicated for experiments evaluating different doses of rAAV8.

Generation of HEK-293 cell lines expressing P2X7 and/or ARTC2.2

HEK-293 cells cultured in DMEM 5% FCS were transduced using a retrovirus encoding mutated variants of P2X7 (R294A) or ARTC2.2 (E209Q) displaying no biological activities

(29,41). Transduced HEK-293 cells were sorted using antibodies to P2X7 (1F11) and ARTC2.2 (Nika 102) using a BD FACSAriaII (Becton Dickinson). To obtain HEK-293 cells expressing both P2X7 and ARTC2.2, previously sorted HEK-P2X7 cells were transduced with the retrovirus encoding ARTC2.2 (E209Q) followed by an additional cell sorting (Supplemental S1)

Flow cytometry analyses

For evaluation of P2X7 and ARTC2.2 expression on T cell subsets, splenocytes were collected and single-cell suspensions were prepared and washed using standard procedures. Cells were stained using fluorochrome-conjugated anti-ARTC2.2 monoclonal antibody (Nika102, from Novus Biologicals), and/or using anti-P2X7 polyclonal rabbit antibodies K1G (33) counterstained with fluorochrome-conjugated donkey anti-rabbit IgG, or with related isotype controls.

For binding assays of nanobody-based HcAbs on HEK-293 cell lines, cells were incubated with serial dilutions of recombinant HcAbs, washed and stained with antibody against mouse IgG2a. For the evaluation of the binding of HcAbs on T cell subsets, splenocytes were collected, washed, resuspended in FACS buffer and stained with antibody against mouse IgG2a. Cells were washed and stained with fluorochrome-conjugated antibodies directed against the indicated cell surface markers.

For the evaluation of cell depletion, blood samples were collected on D-PBS containing 2.5 mM EDTA. Absolute numbers were obtained by weighting collection tubes before and after blood sampling followed by cell counting using ADAM-MC automated cell counter (NanoEntek). Cells were then stained with the indicated surface markers and analysed by flow cytometry to evaluate the percentages of each indicated cell subsets. Results were expressed as percent of cells normalised to the control groups, set as 100%.

Statistical analyses

All data are shown as mean values and errors bars represent standard error of the mean (SEM). Statistical comparisons between experimental groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparisons *post hoc* tests. Differences were considered statistically significant when p values were less than 0.05 (*), 0.01 (**), or 0.001 (***). All graphs and calculations were performed using the Prism software (Graphpad, La Jolla, CA).

RESULTS

Cell depletion mediated by different anti-P2X7 nanobody-based HcAbs depend on nanobody clones

We designed 5 different nanobody-based HcAbs biologics targeting P2X7, based on 5 different nanobodies named 7E2, 8G11, 1C81, 13A7 and 14D5 ([Figure 1A](#)). For their evaluation directly *in vivo*, we turned to a methodological approach that we have previously developed termed AAVnano (1,36,42). This method is based on the single injection of an rAAV vector coding for the designed nanobody-based biologics, with the aim to elicit its stable production directly *in vivo* for several weeks (1,36,42). rAAV8 vectors encoding for the five different anti-P2X7 HcAb biologics were produced and injected following the intramuscular (i.m.) route, at a dose of 10^{11} vg/mouse, in different group of mice ([Figure 1](#)). Cell depletion induced by anti-P2X7 HcAbs, were evaluated in two different genetic background, in C57BL/6 strain ([Figure 1B](#)) and in BALB/c strain ([Figure 1C](#)). Blood samples were collected at different time points post-rAAV8 injection, and the data showed remarkably a stable level of cell depletion overtime for each individual evaluated biologics from day 21 to day 120, suggesting a rather stable level of the biologics *in vivo* in line with our previous observations (data not shown, and (1,36,42)). The data are illustrated here using blood samples obtained 4-5 weeks post rAAV8 injections ([Figure 1B,C](#)). Some of the evaluated anti-P2X7 HcAbs were able to partially deplete P2X7-expressing CD8⁺ T cells, conventional CD4⁺CD25⁻ T cells (Tconvs), and/or CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Tregs), albeit to a variable extent ([Figure 1B,C](#)). In both mouse strains, the constructs 7E2-IgG2a and 8G11-IgG2a appear to represent the most potent biologics to deplete Tregs, while the construct 13A7-IgG2a display little if any effect ([Figure 1B,C, right panels](#)). Focusing on 7E2-IgG2a, one of the most potent biologic constructs on both mouse strain, data highlighted differences in the levels of cell depletion observed in the two different genetic background. Indeed, the Tregs were reduced to 71% (i.e.; equivalent to a 29

% depletion) in the C57BL/6 strain, while around 48% of the Treg cells were depleted by the same construct in the BALB/c strain (Figure 1B,C, right panels). Also, when comparing the depletion induced by 7E2-IgG2a in the different T cell subsets, only a slight 7-8% reduction of CD8⁺ T cells and Tconvs was observed in the C57BL/6 strain, while 28% of the CD8% cells and 44% Tconvs were depleted in the BALB/c strain. The differences on the levels of CD8⁺ T cells and Tconvs depletion between the two strains can be partially attributed to the expression of P2X7 at the cell surface in these different cell subsets (Figure 2B,E). However, as P2X7 is expressed at a similar level on Tregs of both mouse strains, the data suggest that other genetic factors contribute to depletion efficiency. Indeed, cell depletion appears to be overall more pronounced in BALB/c than in C57BL/6 mice (Figure 1 B,C). Altogether, these data suggest that cell depletion mediated by anti-P2X7 HcAbs depends on the nanobody clone included in the constructs and on the animal genetic background.

T cell depletion mediated by anti-P2X7 HcAb 7E2-IgG2a biologic correlates with antigen density at the cell surface of each T cell subset

As HcAbs based on 7E2 appears as one of the most potent constructs to deplete P2X7-expressing cells in C57BL/6 and BALB/c mice, we further evaluate this construct *in vitro* and *in vivo*. First, we aimed to evaluate the binding capacity of 7E2-IgG2a HcAb, on a cellular model *in vitro*. For that we generated HEK-293 cells transduced to stably express P2X7 at a stable level (HEK-P2X7), and incubated serial dilutions of recombinant 7E2-IgG2a to evaluate the its binding to P2X7 expressing cell by flow cytometry. Data confirm that 7E2-IgG2a bound specifically to HEK-P2X7, and not on the untransduced parental HEK-293 cells (data not shown). The binding curve, showed that half-maximum effective concentration (EC₅₀) is obtained around 22 nM, while saturation is obtained at 30-40 nM, as expected for a high affinity nanobody clone (Figure 2A). In the next steps, we thought to establish the binding curves to the T cells subsets, using the serum of the animal producing *in vivo* the HcAb 7E2-IgG2a upon

injection of the corresponding rAAV8 vector, with the aim to better compare cells depletion to binding levels. Before that, we first evaluated expression of P2X7 on the different T cells subsets, using a previously validated K1G polyclonal antibody and confirmed in line with our previous results (33) that in C57BL/6 mice, P2X7 is mainly expressed on Tregs (MFI: 27,379) and to a lesser extent on Tconvs (MFI: 13,194) and CD8⁺ T cells (MFI: 5,178) (Figure 2B). We then collected and pooled serum from mice injected 9 weeks earlier with rAAV encoding 7E2-IgG2a, and incubated splenocytes from an untreated C57BL/6 mouse with different dilution of these serums. Evaluation of the presence and binding of 7E2-IgG2a to the T cell surface was then performed using flow cytometry. Results indicated that the *in vivo* produced 7E2-IgG2a was present in the collected serums at high level, as 1 μ L of serum was enough to achieve saturation of the binding at the surface of each T cell subsets (Figure 2C). Expectedly, binding levels correlated with the level of expression of P2X7 on each T cell subsets. Indeed, higher binding of 7E2-IgG2a at the cell surface was observed on Tregs, expressing the highest cell surface level of P2X7, whereas binding on Tconvs and CD8⁺ T cells was weaker but detectable compared to the control staining (Figure 2C). Of notes, the levels of binding of the *in vivo* produced 7E2-IgG2a biologic at the surface of each T cells subsets, correlates with the level of cell depletion observed in the previous experiments suggesting that antigen density and binding level constitute important factors to achieve cell depletion *in vivo* (Figure 1B compared to Figure 2B,C).

We next evaluated again cell depletion induced by injection of the rAAV8 coding for 7E2-IgG2a HcAb, comparing this time an early (3-4 weeks) and a late time point (13-14 weeks) post rAAV injections. In line with the previous results (Figure 1B), 18 days after the single injection of the corresponding rAAV, the *in vivo* produced 7E2-IgG2a induced a modest decrease of Tregs ($28 \pm 7\%$ depletion) and only a slight decrease of CD8⁺ T cells ($13 \pm 5\%$) and of Tconvs ($16 \pm 3\%$) (Figure 2D). Interestingly, cell depletion was maintained overtime as

the data obtained at day 92 post of rAAV injection are comparable to those obtained at the earlier time points. Indeed, at day 92, Tregs remained the most affected subset ($27 \pm 3\%$ cell depletion), while CD8⁺ T cells and Tconvs remained less affected ($14 \pm 3\%$, and $13 \pm 3\%$ cell depletion, respectively) ([Figure 2D](#)).

As observed in C57BL/6 mice, P2X7 in BALB/c mice was also expressed at the highest level on the Tregs subsets (MFI: 27202, [Figure 2E](#)). However, compared to C57BL/6 mice, P2X7 in BALB/c mice was found at relatively higher levels on Tconvs (MFI: 18394) and CD8⁺ T cells (MFI: 10136). The hierarchical differences between the subsets remained however conserved in BALB/c mice, with CD8⁺ T cells expressing the lowest level of P2X7, Tconvs showing intermediate level, and Tregs displaying the highest P2X7 expression. As before, we evaluated again cell depletion induced 7E2-IgG2a HcAb *in vivo* at an early (3-4 weeks) and a late time point (13-14 weeks) post rAAV injections. At day 27 post rAAV8 injection, the level of CD8⁺ T cells decreased to reach 77% of the level observed in the control group ($23\% \pm 18\%$ depletion). In line with the P2X7 expression levels, an even more pronounced decrease was observed for Tconvs ($46 \pm 15\%$ depletion) and for Tregs ($52\% \pm 12\%$ depletion) ([Figure 2F](#)). Results obtained at the latest time point, at day 97 post rAAV8 injection, confirmed the results and show again a comparable pattern of depletion that correlated well with P2X7 expression on the different T cell subsets and demonstrated again long-term and stable level of cell depletion in our model system. Of notes, when comparing depletion of Tregs in the two mouse strains, Tregs appears to be more affected in BALB/c (around 50% depletion) than in C57BL/6 (around 27% depletion) while the levels of P2X7 expression at the surface of the Tregs appears rather similar in both strains ([Figure 2B, E](#)). Taken together, these data demonstrate that a single i.m. injection of rAAV8 vector coding for 7E2-IgG2a induces long-term and stable cell depletion of T cell that correlates with the target antigen density at the surface of each T cell subsets.

However, the level of Tregs cell depletion conspicuously differs in the two mouse strains suggesting that other genetic factor may influence cell depletion in addition to antigen density.

Anti-ARTC2.2 s-14-Ig2a HcAb very efficiently depletes CD8⁺ T cells

We next aimed to evaluate a nanobody-based biologic directed against another cell surface protein target, namely ARTC2.2 a 35 kDa GPI-anchored protein expressed at higher level than P2X7 on T cells and notably on CD8⁺ T cells. For that we designed an anti-ARTC2.2 HcAb based on nanobody s-14 fused to the hinge region of mouse IgG2a by a short 5 amino acid linker and termed this construct s-14-IgG2a ([Figure 3A](#)). Again, we first assayed binding of the recombinantly produced s-14-IgG2a HcAb on a cell model *in vitro*. For that, HEK-293 cells were retrovirally transduced to express ARTC2.2 (HEK-ARTC2.2) at relatively high level at the cell surface ([Supplemental S1](#)). Dose-response binding curve indicate that around 100 nM s-14-IgG2a was necessary to obtain a saturating level of binding of the biologic at the cell surface, while half-maximum saturation (EC₅₀) was obtained at around 33 nM ([Figure 3B](#)). Evaluation of the expression of ARTC2.2 at the surface of C57BL/6 T cell subsets, using a commercial monoclonal antibody, confirmed that ARTC2.2 is expressed at higher level on CD8⁺ T cells (MFI:26092), and to relatively lower level on Tregs (MFI:21918) and Tconv (MFI:18372) ([Figure 3C](#)).

Next, as for the previous target model, a rAAV8 vector coding for s-14-IgG2a was produced and injected i.m. to C57BL/6 mice. To confirm the biologic is produced *in vivo*, we collected serum from transduced animal 9 weeks post rAAV8 injections and assayed for the presence s-14-IgG2a in these serums. For that, serums were incubated at different dilutions with splenocytes from a naïve mice and binding of s-14-IgG2a to the surface of T cell surface was evaluated by flow cytometry. Results confirmed presence and binding of the biologic to the different T cells subsets, and absence of binding to other immune cells confirming specificity and expression of the ARTC2.2 target solely on T cells ([Figure 3D](#), and data not

shown). Data again suggested production of s-14-IgG2a at relatively high level *in vivo*, as 2-3 μL of serum was enough to achieve saturation of the binding at the surface of the T cell subsets. As expected from ARTC2.2 expression levels (Figure 3C), higher maximum binding of s-14-IgG2a was detected on CD8^+ T cells, followed by Tregs and lastly by Tconvs, confirming a direct relationship between ARTC2.2 density at the cell surface and maximum binding (Figure 3C,D). Hence, this data confirmed that s-14-IgG2a HcAb can be produced directly *in vivo* upon a single i.m. injection of the corresponding rAAV8 and can bind to its ARTC2.2 target at the surface of the T cell subsets at a level that depends on its density.

To evaluate the level of cell depletion induced by s-14-IgG2a HcAb *in vivo*, we injected rAAV8 vectors encoding this construct in C57BL/6 mice (Figure 3E), and in BALB/c mice (Figure 3F), and evaluated the percentages and total numbers of each T cell subset at an early (3-4 weeks) and a late time point (13-14 weeks) post rAAV injections. In C57BL/6 mice, *in vivo* produced s-14-IgG2a induced a profound and stable depletion of CD8^+ T cells expressing the highest levels of ARTC2.2 ($86\% \pm 1\%$ at day 18, and $85 \pm 3\%$ at day 92). The depletion of Tconvs ($70\% \pm 3\%$ at day 18, and $65 \pm 3\%$ at day 92) and Tregs were also significant ($62\% \pm 4\%$ at day 18, and $67\% \pm 5\%$ at day 92). In BALB/c mice, ARTC2.2 is mainly expressed on CD8^+ T cells and poorly on Tconvs and Tregs (Figure 3F). Accordingly, Tconvs and Tregs were not affected by the *in vivo* produced s-14-IgG2a, and only the CD8^+ T cell subset was partially depleted ($28 \pm 6\%$ depletion observed at day 27 and 97) (Figure 3G). The lower level of depletion of CD8^+ cells in BALB/c, as compared to C57BL/6, is in line with the lower and relatively more heterogenous expression of ARTC2.2 on the surface of these cells (Figure 3C,F). These data thus confirmed efficient and specific depletion of ARTC2.2 expressing target cells, at levels that depend relatively well on density of the target antigen at their cell surface.

Evaluation in vivo of a bispecific nanobody-based HcAb targeting ARTC2.2 and P2X7

In the next step, we thought to make use of the modularity and versatility offered by the single-chain structure of nanobodies to develop a bispecific HcAb with the aim to more selectively deplete cells expressing high levels of two protein targets, mainly Tregs from C57BL/6 mice in our ARTC2.2/P2X7 model. For that, we designed the bispecific biologic termed s-14-7E2-IgG2a using anti-ARTC2.2 nanobody s-14 linked to anti-P2X7 nanobody 7E2 using a 35-amino acid flexible linker, and fused as before the construct to the Fc-region of IgG2a and ([Figure 4A](#)). We first aimed to evaluate the binding profiles of s-14-7E2-IgG2a HcAb on cells expressing only P2X7, only ARTC2.2, or both targets. For that we used again HEK-P2X7, HEK-ARTC2.2, or HEK-P2X7-ARTC2.2 (corresponding to HEK-293 cells transduced to express both targets, [Supplemental S2](#)). Cells were incubated *in vitro* with serial dilutions of recombinantly produced s-14-7E2-IgG2a or with the corresponding monospecific biologics for comparison and stained with a secondary antibody specific to IgG2a subclass to detect the bound molecules at the cell surface ([Figure 4B](#)). At saturating concentrations, on cells expressing only on target protein (i.e., HEK-ARTC2.2 or HEK-P2X7), the maximum numbers of bound bispecific s-14-7E2-IgG2a appears similar to that obtained with the monospecific counterparts, indicating that the bispecific construct can still bind to each target when expressed independently. However, as compared to the monospecific biologics, 2- to 3-fold higher concentrations were needed for the bispecific construct to reach maximum or half-maximum signals, possibly suggesting partial steric hindrance between the two fused nanobodies and/or partial loss of avidity ([Figure 4B](#), first two panels). When analysing the binding profiles on cells expressing both targets (i.e. HEK-P2X7-ARTC2.2), the maximum numbers of bound bispecific construct was slightly lower than observed with the monospecific s-14-IgG2a (targeting ARTC2.2 expressed at higher level than P2X7 in our cellular model). Similar results were observed when the sera of mice injected with rAAV vectors were incubated with naïve splenocytes ([Supplemental S2](#)). As compared the monospecific biologics, 2- to 3-fold higher

concentrations were needed for the bispecific construct to reach maximum or half-maximum signals. This was rather unexpected as each bispecific biologic is tetravalent, which should have increased avidity as compared to the bivalent monospecific biologics. This again suggested possibly steric hindrance and/or partial loss of affinity/avidity of the bispecific construct as compared to the monospecific counterparts. Yet, the data still demonstrate that the bispecific construct is able to bind to either one target, or possibly both, at the surface of the cells.

We next evaluated cell depletion *in vivo* induced following injection of rAAV8 coding for the bispecific s-14-7E2-IgG2a construct. For that, groups of C57BL/6 and BALB/c mice were injected with the rAAV8 coding for either the bispecific construct, for only one of the corresponding monospecific biologics, or for both monospecific biologics for comparisons ([Figure 4C,D](#)). In line with the binding profile of s-14-7E2-IgG2 on transfected HEK cell models, the bispecific construct induced equivalent or fewer depletion the monospecific counterparts, but not higher levels of cell depletion. Also, the bispecific did not show increased cell depletion efficiency as compared to conditions where both monospecific biologics are produced *in vivo*. This was somehow expected given that simultaneous incubation with both monospecific recombinant biologics on HEK-ARTC2.2-P2X7 resulted in a better binding profile and to a higher maximum signal as compared to the bispecific construct, reflecting cumulative binding on both targets at saturating concentrations ([Supplemental S3](#)). Also, the bispecific construct did not show a better selectivity profile for T cell subsets expressing higher levels of both target protein, and notably Tregs in the C57BL/6 background, as compared to the monospecific constructs taken independently or together ([Figure 4C](#)). Taken together, these data suggest that bispecific construct s-14-7E2-IgG2a binds less efficiently to cells expressing P2X7, ARTC2.2, or both, resulting in a lower level of cell depletion *in vivo* as compared to the

monospecific counterparts. Moreover, depletion was not more selective for cells expressing high levels of both ARTC2.2 and P2X7.

Enhanced cell depletion selectivity induced by the bispecific HcAb at lower concentrations

We finally explored strategies either to increase the level of cell depletion or to enhance selectivity of the bispecific s-14-7E2-IgG2a HcAb. Two allotypes of IgG2 exist in congenic mouse strains, differing notably in their hinge region. IgG2a is expressed in BALB/c mice whereas C57BL/6 mice express IgG2c (43). We evaluated in the next steps the influence of these allotypes in the level of cell depletion. For that, we designed an additional construct where we substituted the IgG2a Fc-region by the IgG2c Fc-region (s-14-7E2-IgG2c). We also included a “silent” variant of s-14-7E2-IgG2a as a control, bearing L234A, L235 and P327G mutations (LALA-PG) to attenuate effector functions (38). We then generated the corresponding rAAV8 coding for these additional constructs that were evaluated upon a single i.m. injections in C57BL/6 mice ([Figure 5A](#)). Evaluation of cell depletion in the different groups showed that s-14-7E2-IgG2c slightly improved Tregs depletion (evaluated to $57 \pm 5\%$) compared to s-14-7E2-IgG2a (evaluated to $42 \pm 6\%$), leading to a 1.35-fold increased depletion. As expected, the “silent-Fc” bearing s-14-7E2-IgG2a^{LALA-PG} taken as an additional control, did not induced cell depletion. These results indicate that substituting the Fc-region to an IgG2c slightly improves cell depletion of Tregs, but did not significantly ameliorate selectivity.

Next, we evaluated the effect *in vivo* of anti-CD47 antibody on cell depletion in our model. Indeed, the interaction of CD47, a ubiquitous cell surface protein, with signal regulatory α (SIRP α), on the surface of phagocytes provides an inhibitory “don’t eat me” signal that prevents ADCP. Hence, blocking SIRP α -CD47 axis has been reported to enhance cell depletion in some models (44). We thus evaluated the effects of the i.p. injection of anti-CD47 monoclonal antibody (or irrelevant control monoclonal antibody) on the depletion elicited upon injection of rAAV8 coding for the bispecific construct s-14-7E2-IgG2a ([Figure 5B](#)). One day

after injection of the anti-CD47 monoclonal antibody, blood samples were collected, and cell depletion was evaluated. The results did not show any significant improvement of cell depletion in these conditions, suggesting that SIRP α -CD47 axis is not a major limiting factor in our model.

Next, we posited that a lower concentration of bispecific HcAbs would result in a preferential binding to cells expressing high levels of both ARTC2.2 and P2X7 targets, and would thus enhance selectivity for Tregs. In an exploratory experiment, we evaluated the dose-response relationship, using decreasing doses of rAAV8 coding for s-14-7E2-IgG2a. Interestingly, the data demonstrate an almost linear correlation between CD8⁺ cell depletion and the injected rAAV8 doses, ranging from around 70% cell depletion at the highest rAAV8 dose of 10¹¹ vg/mouse to a gradual complete loss of the depleting effect at the lowest dose of 3.125x10⁹ vg (Supplemental S4, left panel). Of notes, CD8⁺ cells in C57BL/6 mice express high levels of ARTC2.2 but very low levels of P2X7, suggesting that ARTC2.2 is the major target of the bispecific HcAbs in this cell subset. In contrast, Tregs express both targets at their cell surface (Figures 2B, 3C). Remarkably, the results demonstrate that the dose-response relationship on this cell subset does not follow a linear gradual profile, and that depletion effect was relatively well maintained even at the lowest rAAV8 dose of 3.125x10⁹ vg (Supplemental S4, right panel). Hence, even if a partial loss of efficacy in the level of Tregs depletion is noticeable at the lowest doses (32 % cell depletion as compared 46% at the highest dose), the selectivity for Tregs is greatly increased in these conditions (Supplemental S4). Based on these resulted, we conducted a second experiments where we compared the highest dose of 10¹¹ vg to the two lowest doses 6.25x10⁹ vg or 3.125x10⁹ vg (Figure 5C). Remarkably, the data confirmed that the lowest doses allowed a selective depletion of Tregs (33 \pm 5%, and 27 \pm 6% depletion) without inducing any substantial depletion of CD8⁺ T cells nor Tconvs. However, the enhanced selectivity was accompanied by a moderate 1.8-fold attenuation of depletion

efficacy, as compared to the highest dose of 10^{11} vg that induces depletion of $47 \pm 6\%$ of the Tregs subsets (Figure 5C). Hence, these data demonstrate that selectivity of the bispecific construct towards target cells that express both protein targets can be achieved by lowering the bioavailability of the bispecific HcAb, albeit at the expense of cell depletion efficiency.

DISCUSSION

We demonstrated the ability of rAAV-encoded HcAbs to durably induce T cell depletion in a model based on P2X7 and ARTC2.2 as model antigens. Nanobody moieties were fused to a Fc-region of mouse IgG2a for its capacity to engage effector mechanisms in fully competent wild-type mice. In this model, it is unlikely that CDC plays a pivotal role in cell depletion since congenic mouse strains display only few activity of complement compared to humans (45). IgG2a isotype interacts with Fc γ Rs through the lower hinge and the upper CH2 regions. In mice, ADCC is mainly mediated by the Fc γ RIII on NK cells and ADCP is triggered by the engagement of Fc γ RIV on granulocytes, monocytes, and macrophages. ADCP seems to be the prominent effector mechanism in mouse models (46).

Recombinant AAV vectors are commonly used in gene therapy and represent an efficient and safe approach to transfer genes and to achieve long-term *in situ* systemic production of a transgenic protein (47,48). In our experiments, a single intramuscular injection of rAAV (1.10^{11} viral genomes) was sufficient to elicit effective stable cell depletion since the intensity of cell depletion was achieved on day 18 and was maintained for almost 100 days. Avoiding the need for repeated injections of the corresponding recombinant protein, this approach facilitates *in vivo* mouse experiments and may also represent a less invasive alternative to conventional antibody therapy schemes for patients in a translational perspective. This may also provide more favorable pharmacokinetics by maintaining a stable saturating concentration of the construct *in vivo* and avoiding peak/decline cycles achieved after repeated injections of the recombinant proteins.

This study was performed using P2X7 and/or ARTC2.2 specific HcAbs as model antigens. We hypothesised ARTC2.2 and P2X7 to be suitable model antigens to explore factors influencing cell depletion mediated by nanobody-based HcAbs. Their expression pattern is

variable among murine T cell subtypes and differ between wild-type C57Bl/6 and BALB/c mice, and the structures of ARTC2.2 and P2X7 on the cell surface are totally different. ARTC2.2 is a 35 kDa GPI-anchored monomeric protein whereas P2X7 is a 195 kDa homotrimeric protein containing three transmembrane domains. In addition, we benefited from the availability of different nanobodies targeting P2X7 to explore the effect of the epitope. P2X7 receptor form an ATP-gated ion-channel involved in multiple signaling pathways that regulate cell phenotype, differentiation and survival (35). P2X7 can be gated in the presence of high concentrations of extracellular ATP that can be released from dying or stressed cells. In addition, in murine T cells, P2X7 activation can be triggered by relatively low concentrations of extracellular NAD^+ (33). The mechanism involves the ADP-ribosyltransferase ARTC2.2 catalyzed ADP-ribosylation of P2X7 on R125 localized in the vicinity of the ATP-binding site (26). Anti-P2X7 nanobodies isolated from phage-display libraries constructed from immunized llamas were clustered in 18 families according to immunization strategy and length of their CDR3 (28). Depending on their family, anti-P2X7 nanobodies mediate different biological effects that can be related to a different epitope bound on P2X7. Nanobodies 8G11, 1C81 and 13A7 block activation of P2X7 by both extracellular ATP and NAD^+ indicating that their paratopes overlap both with the ATP-binding site as well as with the site of ADP-ribosylation. In contrast 14D5 potentiates activation of P2X7 and 7E2 displays no modulating properties proving their paratopes not to recognize the same epitope on P2X7. Five anti-P2X7 nanobodies were included in our depleting HcAb constructs. We observed that the intensity of cell depletion depended on the clone. The difference of the epitope they recognized may account for this difference, at least in part. Such a dependence of the epitope for the biological effect was illustrated in the model of anti-CD20 antibodies. Type I and type II anti-CD20 monoclonal antibodies differ by the epitope they bind, resulting in a different orientation of the Fc-regions.

In the case of type I antibodies, this orientation favours the engagement of effector mechanisms through improved interactions of the Fc-regions with C1q complex and activating Fc γ Rs (7,8).

Overall, anti-P2X7 7E2-IgG2a as well as anti-s-14-IgG2a mediated cell depletion correlated with the level of expression of the target. This is quite intuitive since higher levels of HcAbs bound on the cell surface leads to enhanced clustering of Fc favouring the interactions with Fc γ Rs at the surface of NK cells and phagocytes, as well as with C1q (4,6,49). Nevertheless, whereas P2X7 is expressed at similar levels on the surface of Tregs from C57BL/6 and BALB/c mice, cell depletion was more pronounced in BALB/c mice. We cannot exclude that effector mechanisms differ in both mouse strains. To our knowledge, such differences are not yet reported in the literature and thus remain to be evaluated. Another explanation may be attributable to the internalisation of P2X7 upon binding of HcAbs, similar to the antigenic modulation occurring with type I anti-CD20 monoclonal antibodies (11). Internalisation of P2X7 in C57BL/6 Tregs may result in its decrease at the surface of cells and consequently fewer cell depletion by HcAbs. The P2X7 receptors of BALB/c and C57Bl/6 mice differ in a single amino-acid at position 451 in the cytoplasmic tail (50) and one may suppose that this difference may account in antigenic modulation process.

Most therapeutic monoclonal antibodies are complete monospecific IgG molecules which consists of two heavy chains and two light chains. Alternatively, extensive research focused on developing bispecific and multispecific antibodies to target multiples antigens or epitopes present on a cell. Bispecific constructs are obtained by quadroma technology or Fc heterodimerization through introduction of point mutations favouring the association of Fc heterodimers (51–54). We benefited of the single-chain structure of nanobodies to engineer bispecific HcAbs. This approach allows to circumvent major bottlenecks faced with quadroma technology and Fc heterodimerization, notably mispairing of heavy chains and mispairing of heavy and light chains in the heterodimers (55). Bispecific HcAbs consisting of two identical

heavy chains may be produced more efficiently than conventional bispecific antibodies in cell lines as well as *in vivo* in the context of rAAV vectorization. Interestingly after a single injection rAAV, bispecific HcAbs are produced in similar amounts than monospecific HcAbs despite their difference in size, as reflected by the binding assays on naïve splenocytes from the serum sampled from treated mice. Results indicated that bispecific s-14-7E2-IgG2a HcAb was less effective in inducing cell depletion than monospecific s-14-IgG2a in C57BL/6 mice and 7E2-IgG2a in BALB/C mice. At saturating concentrations, conventional antibodies tend to bind target cells with only one Fab, which would likely be similar for HcAbs. However, the higher avidity provided by the four paratopes of the bispecific s-14-7E2-IgG2a probably results in a binding with the two arms of the molecule in the context of saturating amounts. This may lead to a decreased exposure of Fc-regions on the cell surface and thus a lower depletion of cells expressing both ARTC2.2 and P2X7 *in vivo*. The high avidity may also contribute to the absence of selectivity of the bispecific construct to deplete cells expressing high levels of ARTC2.2 and P2X7, *e.g.* Tregs in C57BL/6 mice. In binding assays, EC50 was higher than monospecific counterparts on both HEK models and naïve splenocytes, which could suggest a steric hindrance provided by one monomer relative to the other, *i.e.* the binding of one monomer hinders the binding of the other, despite the long 35 amino-acid linker separating both monomers in the bispecific construct. In line with this hypothesis, co-injection of rAAV encoding 7E2-IgG2a and s-14-IgG2a did not result in enhanced cell depletion of T cell subtypes despite a majored binding on HEK cells expressing both P2X7 and ARTC2.2. This discrepancy between the binding on HEK models and the intensity of cell depletion *in vivo* may be linked to the localization of the targets. On T cells, P2X7 and ARTC2.2 were found to colocalize in lipid rafts (56). It is conceivable that translocation in lipid rafts would be less prominent in HEK cells transduced to express high levels of P2X7 and ARTC2.2.

Finally, we explored strategies to optimize cell depletion mediated by bispecific HcAb including switching the Fc-region, co-injection of anti-CD47 monoclonal antibody and injection of decreased doses or rAAV. We observed a trend to a majored cell depletion induced by HcAbs fused to IgG2c, although no statistically significant as compared to HcAbs fused to IgG2a. IgG2a and IgG2c allotypes, expressed respectively in BALB/c and in C57BL/6 mice, differ mainly in the sequence and length of the hinge region separating Fabs and Fc-regions of the IgG molecule (43). Such differences may account in the engagement of effector mechanisms since the hinge region of IgG is involved in the interaction with Fc γ Rs and C1q (57,58). CD47 is a transmembrane protein expressed on various cell types, including T cells (59). The interaction of CD47 and its ligand SIRP α present on phagocytes provide a “don’t eat me signal” (44). Blockade of CD47-SIRP α through daily injections of anti-CD47 monoclonal antibody inhibited tumor growth in a mouse model of breast cancer (60). In our experiments, anti-CD47 monoclonal antibody injected 68 days after the injection of rAAV encoding bispecific HcAb failed to significantly enhance cell depletion. One can assume that a single injection of anti-CD47 monoclonal antibody may be less effective in boosting cell depletion than daily injections. Finally, we observed that injection of reduced doses of rAAV enhanced selectivity for cells expressing high levels of both P2X7 and ARTC2.2, namely Tregs of C57BL/6 mice. Depletion of Tregs is of interest in the field of oncology since it has been demonstrated to promote antitumor response and inhibit tumour growth (27,61). The four paratopes may provide bispecific s-14-7E2-IgGa with high avidity leading to the dispersion of the bispecific construct, *i.e.* binding to cells expressing ARTC2.2 and/or P2X7 with a lack of specificity for cells expressing both targets. Lesser amounts of bispecific HcAbs may then favour the binding on cells expressing both targets. However, the enhanced selectivity was accompanied by a decrease in the intensity of cell depletion, consistent with fewer Fc-regions exposed on the surface of targets cells. Combining the injection of reduced doses of rAAV and strategies to boost cell

depletion, including daily injections of anti-CD47 monoclonal antibody and/or fusing HcAbs to an IgG2c Fc-region could promote substantial depletion of Tregs by bispecific HcAb preferentially to other T cell subsets.

REFERENCES

1. Gondé H, Demeules M, Hardet R, Scarpitta A, Junge M, Pinto-Espinoza C, Varin R, Koch-Nolte F, Boyer O, Adriouch S. A Methodological Approach Using rAAV Vectors Encoding Nanobody-Based Biologics to Evaluate ARTC2.2 and P2X7 In Vivo. *Front Immunol* (2021) 12:704408. doi: 10.3389/fimmu.2021.704408
2. Bobkov V, Zarca AM, Van Hout A, Arimont M, Doijen J, Bialkowska M, Toffoli E, Klarenbeek A, van der Woning B, van der Vliet HJ, et al. Nanobody-Fc constructs targeting chemokine receptor CXCR4 potently inhibit signaling and CXCR4-mediated HIV-entry and induce antibody effector functions. *Biochem Pharmacol* (2018) 158:413–424. doi: 10.1016/j.bcp.2018.10.014
3. Tintelnot J, Baum N, Schultheiß C, Braig F, Trentmann M, Finter J, Fumey W, Bannas P, Fehse B, Riecken K, et al. Nanobody Targeting of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Ectodomain Variants Overcomes Resistance to Therapeutic EGFR Antibodies. *Mol Cancer Ther* (2019) 18:823–833. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-18-0849
4. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, Bernasconi S, Borleri G, Barbui T, Rambaldi A, Introna M. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood* (2001) 98:3383–3389. doi: 10.1182/blood.v98.12.3383
5. van Meerten T, van Rijn RS, Hol S, Hagenbeek A, Ebeling SB. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* (2006) 12:4027–4035. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0066
6. Temming AR, de Taeye SW, de Graaf EL, de Neef LA, Dekkers G, Bruggeman CW, Koers J, Ligthart P, Nagelkerke SQ, Zimring JC, et al. Functional Attributes of Antibodies, Effector Cells, and Target Cells Affecting NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *J Immunol Baltim Md 1950* (2019) 203:3126–3135. doi: 10.4049/jimmunol.1900985
7. Niederfellner G, Lammens A, Mundigl O, Georges GJ, Schaefer W, Schwaiger M, Franke A, Wiechmann K, Jenewein S, Slootstra JW, et al. Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. *Blood* (2011) 118:358–367. doi: 10.1182/blood-2010-09-305847
8. Teeling JL, French RR, Cragg MS, van den Brakel J, Pluyter M, Huang H, Chan C, Parren PWHI, Hack CE, Dechant M, et al. Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood* (2004) 104:1793–1800. doi: 10.1182/blood-2004-01-0039
9. Cleary KLS, Chan HTC, James S, Glennie MJ, Cragg MS. Antibody Distance from the Cell Membrane Regulates Antibody Effector Mechanisms. *J Immunol Baltim Md 1950* (2017) 198:3999–4011. doi: 10.4049/jimmunol.1601473
10. Cragg MS, Morgan SM, Chan HTC, Morgan BP, Filatov AV, Johnson PWM, French RR, Glennie MJ. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with

- segregation into lipid rafts. *Blood* (2003) 101:1045–1052. doi: 10.1182/blood-2002-06-1761
11. Beers SA, French RR, Chan HTC, Lim SH, Jarrett TC, Vidal RM, Wijayaweera SS, Dixon SV, Kim H, Cox KL, et al. Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood* (2010) 115:5191–5201. doi: 10.1182/blood-2010-01-263533
 12. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* (1993) 363:446–448. doi: 10.1038/363446a0
 13. Conrath KE, Wernery U, Muyldermans S, Nguyen VK. Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Dev Comp Immunol* (2003) 27:87–103. doi: 10.1016/s0145-305x(02)00071-x
 14. Davies J, Riechmann L. “Camelising” human antibody fragments: NMR studies on VH domains. *FEBS Lett* (1994) 339:285–290. doi: 10.1016/0014-5793(94)80432-x
 15. Vu KB, Ghahroudi MA, Wyns L, Muyldermans S. Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol* (1997) 34:1121–1131. doi: 10.1016/s0161-5890(97)00146-6
 16. Conrath K, Vincke C, Stijlemans B, Schymkowitz J, Decanniere K, Wyns L, Muyldermans S, Loris R. Antigen binding and solubility effects upon the veneering of a camel VHH in framework-2 to mimic a VH. *J Mol Biol* (2005) 350:112–125. doi: 10.1016/j.jmb.2005.04.050
 17. Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem* (2013) 82:775–797. doi: 10.1146/annurev-biochem-063011-092449
 18. Koch-Nolte F, Eichhoff A, Pinto-Espinoza C, Schwarz N, Schäfer T, Menzel S, Haag F, Demeules M, Gondé H, Adriouch S. Novel biologics targeting the P2X7 ion channel. *Curr Opin Pharmacol* (2019) 47:110–118. doi: 10.1016/j.coph.2019.03.001
 19. Muyldermans S. A guide to: generation and design of nanobodies. *FEBS J* (2021) 288:2084–2102. doi: 10.1111/febs.15515
 20. Els Conrath K, Lauwereys M, Wyns L, Muyldermans S. Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *J Biol Chem* (2001) 276:7346–7350. doi: 10.1074/jbc.M007734200
 21. Schriewer L, Schütze K, Petry K, Hambach J, Fumey W, Koenigsdorf J, Baum N, Menzel S, Rissiek B, Riecken K, et al. Nanobody-based CD38-specific heavy chain antibodies induce killing of multiple myeloma and other hematological malignancies. *Theranostics* (2020) 10:2645–2658. doi: 10.7150/thno.38533
 22. Hao S, Xu S, Li L, Li Y, Zhao M, Chen J, Zhu S, Xie Y, Jiang H, Zhu J, et al. Tumour inhibitory activity on pancreatic cancer by bispecific nanobody targeting PD-L1 and CXCR4. *BMC Cancer* (2022) 22:1092. doi: 10.1186/s12885-022-10165-7

23. Zhu Y, Bassoff N, Reinshagen C, Bhare D, Nowicki MO, Lawler SE, Roux J, Shah K. Bi-specific molecule against EGFR and death receptors simultaneously targets proliferation and death pathways in tumors. *Sci Rep* (2017) 7:2602. doi: 10.1038/s41598-017-02483-9
24. Roovers RC, Vosjan MJWD, Laeremans T, el Khoulati R, de Bruin RCG, Ferguson KM, Verkleij AJ, van Dongen GAMS, van Bergen en Henegouwen PMP. A biparatopic anti-EGFR nanobody efficiently inhibits solid tumour growth. *Int J Cancer* (2011) 129:2013–2024. doi: 10.1002/ijc.26145
25. Schütze K, Petry K, Hambach J, Schuster N, Fumey W, Schriewer L, Röckendorf J, Menzel S, Albrecht B, Haag F, et al. CD38-Specific Biparatopic Heavy Chain Antibodies Display Potent Complement-Dependent Cytotoxicity Against Multiple Myeloma Cells. *Front Immunol* (2018) 9:2553. doi: 10.3389/fimmu.2018.02553
26. Koch-Nolte F, Reyelt J, Schöbow B, Schwarz N, Scheuplein F, Rothenburg S, Haag F, Alzogaray V, Cauerhff A, Goldbaum FA. Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 *in vivo*. *FASEB J* (2007) 21:3490–3498. doi: 10.1096/fj.07-8661com
27. Hubert S, Rissiek B, Klages K, Huehn J, Sparwasser T, Haag F, Koch-Nolte F, Boyer O, Seman M, Adriouch S. Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2–P2X7 pathway. *J Exp Med* (2010) 207:2561–2568. doi: 10.1084/jem.20091154
28. Danquah W, Meyer-Schwesinger C, Rissiek B, Pinto C, Serracant-Prat A, Amadi M, Iacenda D, Knop J-H, Hammel A, Bergmann P, et al. Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Sci Transl Med* (2016) 8:366ra162-366ra162. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf8463
29. Glowacki G, Braren R, Firner K, Nissen M, Kühl M, Reche P, Bazan F, Cetkovic-Cvrlje M, Leiter E, Haag F, et al. The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse. *Protein Sci* (2009) 11:1657–1670. doi: 10.1110/ps.0200602
30. Koch-Nolte F, Duffy T, Nissen M, Kahl S, Killeen N, Ablamunits V, Haag F, Leiter EH. A new monoclonal antibody detects a developmentally regulated mouse ecto-ADP-ribosyltransferase on T cells: subset distribution, inbred strain variation, and modulation upon T cell activation. *J Immunol Baltim Md 1950* (1999) 163:6014–6022.
31. Adriouch S, Haag F, Boyer O, Seman M, Koch-Nolte F. Extracellular NAD⁺: a danger signal hindering regulatory T cells. *Microbes Infect* (2012) 14:1284–1292. doi: 10.1016/j.micinf.2012.05.011
32. Adriouch S, Bannas P, Schwarz N, Fliegert R, Guse AH, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F. ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* (2008) 22:861–869. doi: 10.1096/fj.07-9294com
33. Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, Glowacki G, Deterre P, Haag F, Koch-Nolte F. NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* (2003) 19:571–582. doi: 10.1016/s1074-7613(03)00266-8

34. Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Krebs C, Bannas P, Rissiek B, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F. NAD⁺ and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. *J Immunol Baltim Md 1950* (2009) 182:2898–2908. doi: 10.4049/jimmunol.0801711
35. Rissiek B, Haag F, Boyer O, Koch-Nolte F, Adriouch S. P2X7 on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions. *Front Immunol* (2015) 6: doi: 10.3389/fimmu.2015.00204
36. Demeules M, Scarpitta A, Harget R, Gondé H, Abad C, Blandin M, Menzel S, Duan Y, Rissiek B, Magnus T, et al. Evaluation of nanobody-based biologics targeting purinergic checkpoints in tumor models in vivo. *Front Immunol* (2022) 13:1012534. doi: 10.3389/fimmu.2022.1012534
37. Pinto-Espinoza C, Guillou C, Rissiek B, Wilmes M, Javidi E, Schwarz N, Junge M, Haag F, Lioukouskaya N, Wanner N, et al. Effective targeting of microglial P2X7 following intracerebroventricular delivery of nanobodies and nanobody-encoding AAVs. *Front Pharmacol* (2022) 13:1029236. doi: 10.3389/fphar.2022.1029236
38. Lo M, Kim HS, Tong RK, Bainbridge TW, Vernes J-M, Zhang Y, Lin YL, Chung S, Dennis MS, Zuchero YJY, et al. Effector-attenuating Substitutions That Maintain Antibody Stability and Reduce Toxicity in Mice. *J Biol Chem* (2017) 292:3900–3908. doi: 10.1074/jbc.M116.767749
39. Balazs AB, Chen J, Hong CM, Rao DS, Yang L, Baltimore D. Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis. *Nature* (2011) 481:81–84. doi: 10.1038/nature10660
40. Chen H. Manufacturing of adeno-associated viruses, for example: AAV2. *Methods Mol Biol Clifton NJ* (2011) 737:235–246. doi: 10.1007/978-1-61779-095-9_10
41. Adriouch S, Scheuplein F, Bähring R, Seman M, Boyer O, Koch-Nolte F, Haag F. Characterisation of the R276A gain-of-function mutation in the ectodomain of murine P2X7. *Purinergic Signal* (2009) 5:151–161. doi: 10.1007/s11302-009-9134-6
42. Demeules M, Scarpitta A, Abad C, Gondé H, Harget R, Pinto-Espinoza C, Eichhoff AM, Schäfer W, Haag F, Koch-Nolte F, et al. Evaluation of P2X7 Receptor Function in Tumor Contexts Using rAAV Vector and Nanobodies (AAVnano). *Front Oncol* (2020) 10:1699. doi: 10.3389/fonc.2020.01699
43. Zhang Z, Goldschmidt T, Salter H. Possible allelic structure of IgG2a and IgG2c in mice. *Mol Immunol* (2012) 50:169–171. doi: 10.1016/j.molimm.2011.11.006
44. Qu T, Li B, Wang Y. Targeting CD47/SIRP α as a therapeutic strategy, where we are and where we are headed. *Biomark Res* (2022) 10:20. doi: 10.1186/s40364-022-00373-5
45. Ong GL, Mattes MJ. Mouse strains with typical mammalian levels of complement activity. *J Immunol Methods* (1989) 125:147–158. doi: 10.1016/0022-1759(89)90088-4
46. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc γ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* (2008) 8:34–47. doi: 10.1038/nri2206

47. Russell S, Bennett J, Wellman JA, Chung DC, Yu Z-F, Tillman A, Wittes J, Pappas J, Elci O, McCague S, et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl* (2017) 390:849–860. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31868-8
48. Day JW, Finkel RS, Chiriboga CA, Connolly AM, Crawford TO, Darras BT, Iannaccone ST, Kuntz NL, Peña LDM, Shieh PB, et al. Onasemnogene abeparvovec gene therapy for symptomatic infantile-onset spinal muscular atrophy in patients with two copies of SMN2 (STRIVE): an open-label, single-arm, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Neurol* (2021) 20:284–293. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00001-6
49. Niwa R, Sakurada M, Kobayashi Y, Uehara A, Matsushima K, Ueda R, Nakamura K, Shitara K. Enhanced natural killer cell binding and activation by low-fucose IgG1 antibody results in potent antibody-dependent cellular cytotoxicity induction at lower antigen density. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* (2005) 11:2327–2336. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2263
50. Adriouch S, Dox C, Welge V, Seman M, Koch-Nolte F, Haag F. Cutting Edge: A Natural P451L Mutation in the Cytoplasmic Domain Impairs the Function of the Mouse P2X7 Receptor1. *J Immunol* (2002) 169:4108–4112. doi: 10.4049/jimmunol.169.8.4108
51. Milstein C, Cuello AC. Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature* (1983) 305:537–540. doi: 10.1038/305537a0
52. Ridgway JB, Presta LG, Carter P. “Knobs-into-holes” engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng* (1996) 9:617–621. doi: 10.1093/protein/9.7.617
53. Moore GL, Bautista C, Pong E, Nguyen D-HT, Jacinto J, Eivazi A, Muchhal US, Karki S, Chu SY, Lazar GA. A novel bispecific antibody format enables simultaneous bivalent and monovalent co-engagement of distinct target antigens. *mAbs* (2011) 3:546–557. doi: 10.4161/mabs.3.6.18123
54. Liu Z, Leng EC, Gunasekaran K, Pentony M, Shen M, Howard M, Stoops J, Manchulenko K, Razinkov V, Liu H, et al. A novel antibody engineering strategy for making monovalent bispecific heterodimeric IgG antibodies by electrostatic steering mechanism. *J Biol Chem* (2015) 290:7535–7562. doi: 10.1074/jbc.M114.620260
55. Liu H, Saxena A, Sidhu SS, Wu D. Fc Engineering for Developing Therapeutic Bispecific Antibodies and Novel Scaffolds. *Front Immunol* (2017) 8:38. doi: 10.3389/fimmu.2017.00038
56. Bannas P, Adriouch S, Kahl S, Braasch F, Haag F, Koch-Nolte F. Activity and specificity of toxin-related mouse T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 depends on its association with lipid rafts. *Blood* (2005) 105:3663–3670. doi: 10.1182/blood-2004-08-3325
57. Sondermann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U. The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature* (2000) 406:267–273. doi: 10.1038/35018508

58. Gaboriaud C, Juanhuix J, Gruez A, Lacroix M, Darnault C, Pignol D, Verger D, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ. The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties. *J Biol Chem* (2003) 278:46974–46982. doi: 10.1074/jbc.M307764200
59. Kong F, Gao F, Li H, Liu H, Zhang Y, Zheng R, Zhang Y, Chen J, Li X, Liu G, et al. CD47: a potential immunotherapy target for eliminating cancer cells. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex* (2016) 18:1051–1055. doi: 10.1007/s12094-016-1489-x
60. Willingham SB, Volkmer J-P, Gentles AJ, Sahoo D, Dalerba P, Mitra SS, Wang J, Contreras-Trujillo H, Martin R, Cohen JD, et al. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) 109:6662–6667. doi: 10.1073/pnas.1121623109
61. Onda M, Kobayashi K, Pastan I. Depletion of regulatory T cells in tumors with an anti-CD25 immunotoxin induces CD8 T cell-mediated systemic antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2019) 116:4575–4582. doi: 10.1073/pnas.1820388116

Supplemental Table 1 : Amino-acid sequences of nanobody-based biologics.

Nanobody-based construct	Amino acid sequence
s-14-IgG2a	<p>QVQLQQSGGGLVQAGGSLTSCRVSNGTHFPIRPLAWYRQAPGKERELVASISAGHVTNYNVAVEGRFIISRDNKYKDTVYLMNINVKPEDTAVYLCNLGPTMSTDFRPTDFWGQGTQVTVSSAA GGGGSE PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMIKSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQV YVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK</p>
7E2-IgG2a	<p>EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAPERTYSMGWFRQAPGKEREFVAGSGWDGIPTRYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMSGLKPEDTAIYYCATGTSVYHYQYWGGGTQVTVSSAA GGGGSEPRGPTIKP CPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMIKSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEE EMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK</p>
s-14-7E2-IgG2a	<p>QVQLQQSGGGLVQAGGSLTSCRVSNGTHFPIRPLAWYRQAPGKERELVASISAGHVTNYNVAVEGRFIISRDNKYKDTVYLMNINVKPEDTAVYLCNLGPTMSTDFRPTDFWGQGTQVTVSSAA GGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAPERTYSMGWFRQAPGKEREFVAGSGWDGIPTRYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMSGLKPEDTAIYYCATGTS VYHYQYWGGGTQVTVSSAA GGGGSEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMIKSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKC KVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK</p>
s-14-7E2-IgG2c	<p>QVQLQQSGGGLVQAGGSLTSCRVSNGTHFPIRPLAWYRQAPGKERELVASISAGHVTNYNVAVEGRFIISRDNKYKDTVYLMNINVKPEDTAVYLCNLGPTMSTDFRPTDFWGQGTQVTVSSAA GGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAPERTYSMGWFRQAPGKEREFVAGSGWDGIPTRYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMSGLKPEDTAIYYCATGTS VYHYQYWGGGTQVTVSSAA GGGGSEPRVPITQNPCPLKECPPCAAPDLLGGPSVFIFPPKIKDVLMIKSLPMVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDW MSGKEFKCKVNNRALPSPIEKTISKPRGPVRAPQVYVLPPEEEMTKKEFSLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGYSYFMYSKLRVQKSTWERGSLFACSVVHEVLHNHLTKTISRSLGK</p>

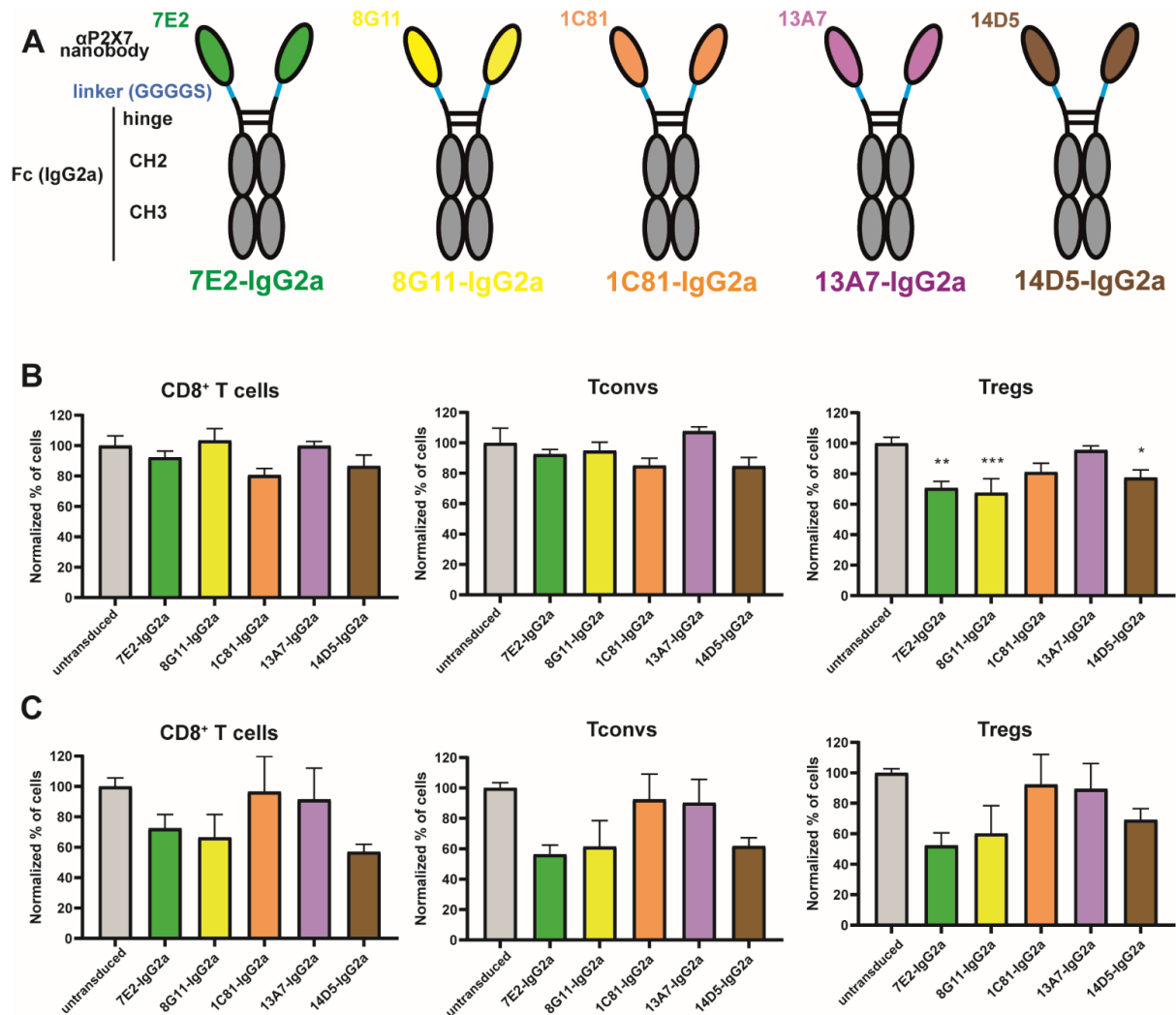


Figure 1: Cell depletion mediated by anti-P2X7 HcAbs depends on the clone.

(A) Schematic representation of the anti-P2X7 nanobody-based HcAbs tested in these experiments. Each colour referred to a different anti-P2X7 clone that was fused to the hinge of IgG2a Fc region using a 5-amino acid linker (GGGGS, pale blue). C57BL/6 (B) or BALB/c (C) mice were injected i.m. with PBS (untransduced, grey) or with rAAV encoding the indicated anti-P2X7 HcAb. Blood samples were collected 34 days (B) or 47 days (C) after injection of rAAV and cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies to be analysed by flow cytometry. Normalized percentages of CD8 + T cells (red), Tconv (green) and Tregs (blue) are expressed relative to the number of cells in the control group taken as 100%. Staining was performed using fluorochrome conjugated antibodies specific to CD45

(coupled to PerCP-Cy5.5), CD4 (APC-Cy7), CD8 (PE-Cy7) and CD25 (PE). Errors bars represent the SEM and statistical analyses were performed using one-way ANOVA (n=5 in each group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

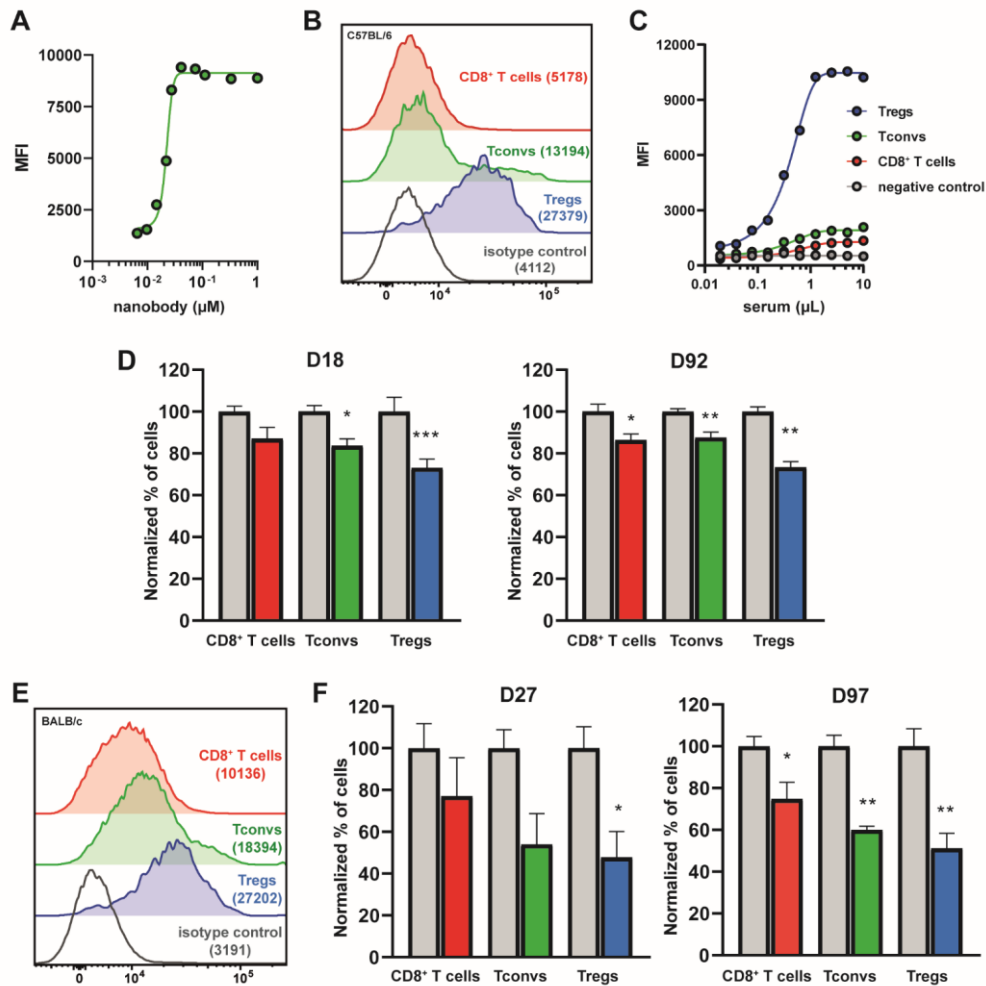


Figure 2: Anti-P2X7 7E2-IgG2a is able to bind P2X7 and to mediate cell depletion of cells expressing P2X7.

(A) HEK cells transduced to express P2X7 (HEK-P2X7) were incubated with serial dilution of recombinant 7E2-IgG2a that was counterstained with biotinylated antibody to mouse IgG2a and streptavidin APC. (B) P2X7 expression on CD8⁺ T cells (red), CD4⁺CD25⁻ (Tconvs, green) and CD4⁺CD25⁺ (Tregs, blue) from C57BL/6 mice compared to isotype control (grey). (C) Splenocytes from an untreated mouse were incubated with serial dilutions of serum collected on day 63 post-injection from C57BL/6 mice injected with rAAV8 encoding 7E2-IgG2a or with PBS (negative control). After washing, bound 7E2-IgG2a was detected using IgG2a-specific secondary antibody. (D) C57BL/6 mice were injected i.m. with

PBS (untransduced, grey) or rAAV encoding 7E2-IgG2a. Blood samples were collected 18 days and 92 days after injection and cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies to be analysed by flow cytometry. **(E)** P2X7 expression on CD8⁺ T cells (red), CD4⁺CD25⁻ (Tconvs, green) and CD4⁺CD25⁺ (Tregs, blue) from BALB/c mice compared to isotype control (grey) **(F)** To evaluate cell depletion, BALB/c mice were injected i.m. with PBS (untransduced, grey) or rAAV encoding 7E2-IgG2a. Blood samples were collected 27 days (middle panel) and 97 days (right panel) after injection and cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies to be analysed by flow cytometry. **(D)(F)** Normalized percentages of CD8 + T cells (red), Tconvs (green) and Tregs (blue) are expressed relative to the number of cells in the control group taken as 100%. Staining was performed using fluorochrome conjugated antibodies specific to CD45 (coupled to PerCP-Cy5.5), CD4 (APC-Cy7), CD8 (PE-Cy7), CD25 (PE), biotinylated antibody to mouse IgG and streptavidin-APC (A,C) or polyclonal K1G and secondary donkey anti-rabbit monoclonal antibody coupled to APC (B,E). Errors bars represent the SEM and statistical analyses were performed using one-way ANOVA (n=5 in each group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

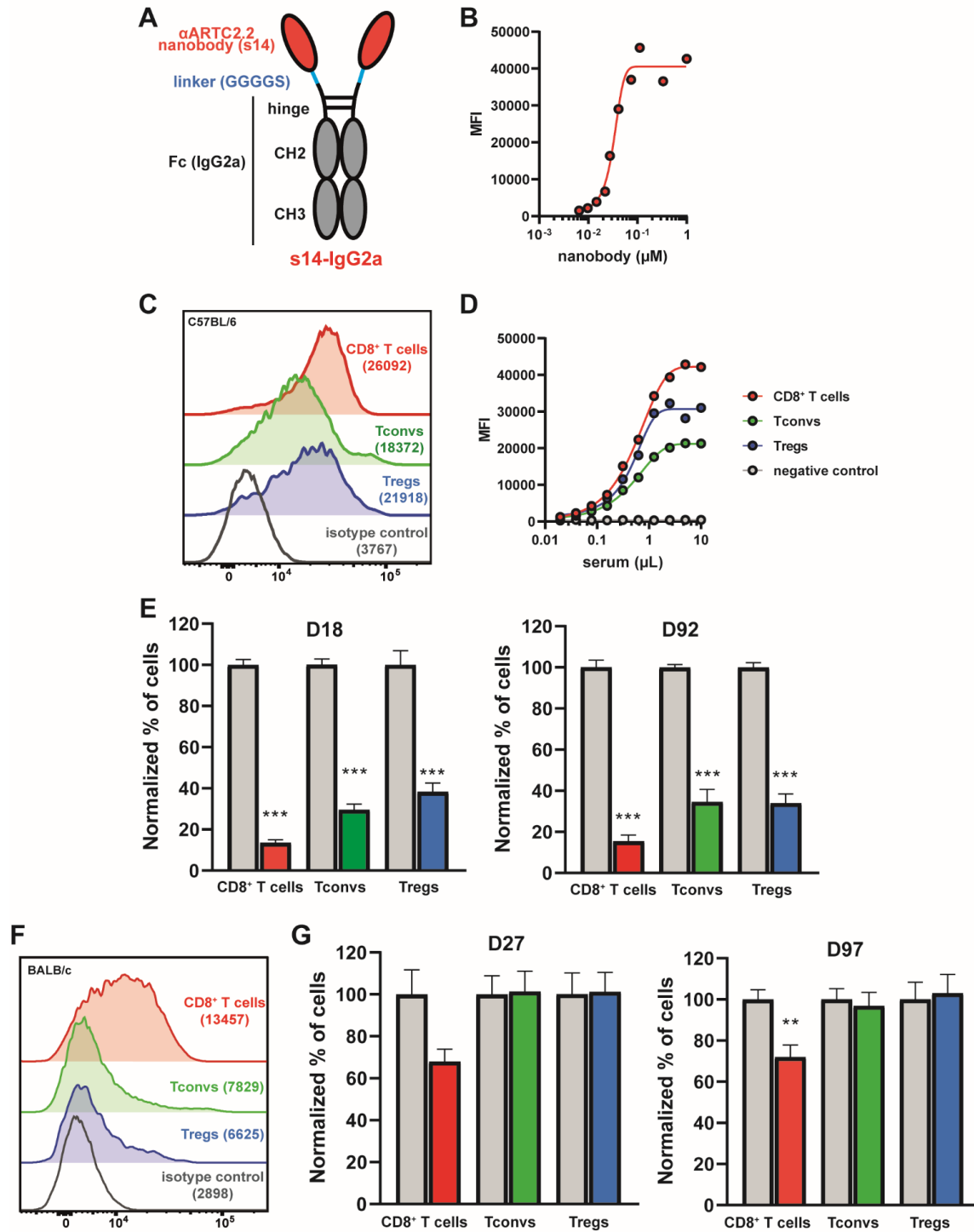


Figure 3: Anti-ARTC2.2 S14-IgG2a is able to bind ARTC2.2 and to mediate cell depletion of cells expressing ARTC2.2.

(A) Schematic representation of S14-IgG2a. **(B)** HEK cells transduced to express ARTC2.2 (HEK-ARTC2.2) were incubated with serial dilutions of recombinant S14-IgG2a that was counterstained with biotinylated antibody to mouse IgG2a and streptavidin APC. **(C)** ARTC2.2 expression on CD8⁺ T cells (red), CD4⁺CD25⁻ (Tconvs, green) and CD4⁺CD25⁺ (Tregs, blue) from C57BL/6 mice compared to isotype control (grey). **(D)** Splenocytes from an untreated mouse were incubated with serial dilutions of serum collected on day 63 post-injection from C57BL/6 mice injected with rAAV8 encoding S14-IgG2a or PBS (negative control). After washing, bound S14-IgG2a was detected using IgG2a-specific secondary antibody. **(E)** C57BL/6 mice were injected i.m. with PBS (untransduced, grey) or rAAV encoding S14-IgG2a. Blood samples were collected 18 days (middle panel) and 82 days (right panel) after injection and cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies to be analysed by flow cytometry. **(F)** ARTC2.2 expression on CD8⁺ T cells (red), CD4⁺CD25⁻ (Tconvs, green) and CD4⁺CD25⁺ (Tregs, blue) from BALB/c mice compared to isotype control (grey). **(G)** BALB/c mice were injected i.m. with PBS (untransduced, grey) or rAAV encoding S14-IgG2a. Blood samples were collected 27 days (middle panel) and 97 days (right panel) after injection and cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies to be analysed by flow cytometry. **(E)(G)** Normalized percentages of CD8⁺ T cells (red), Tconvs (green) and Tregs (blue) are expressed relative to the number of cells in the control group taken as 100%. Staining was performed using fluorochrome conjugated antibodies specific to CD45 (coupled to PerCP-Cy5.5), CD4 (APC-Cy7), CD8 (PE-Cy7), CD25 (PE), ARTC.2.2 (APC) (C,F) or biotinylated antibody to mouse IgG2a and streptavidin-APC (B,D). Errors bars represent the SEM and statistical analyses were performed using one-way ANOVA (n=5 in each group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

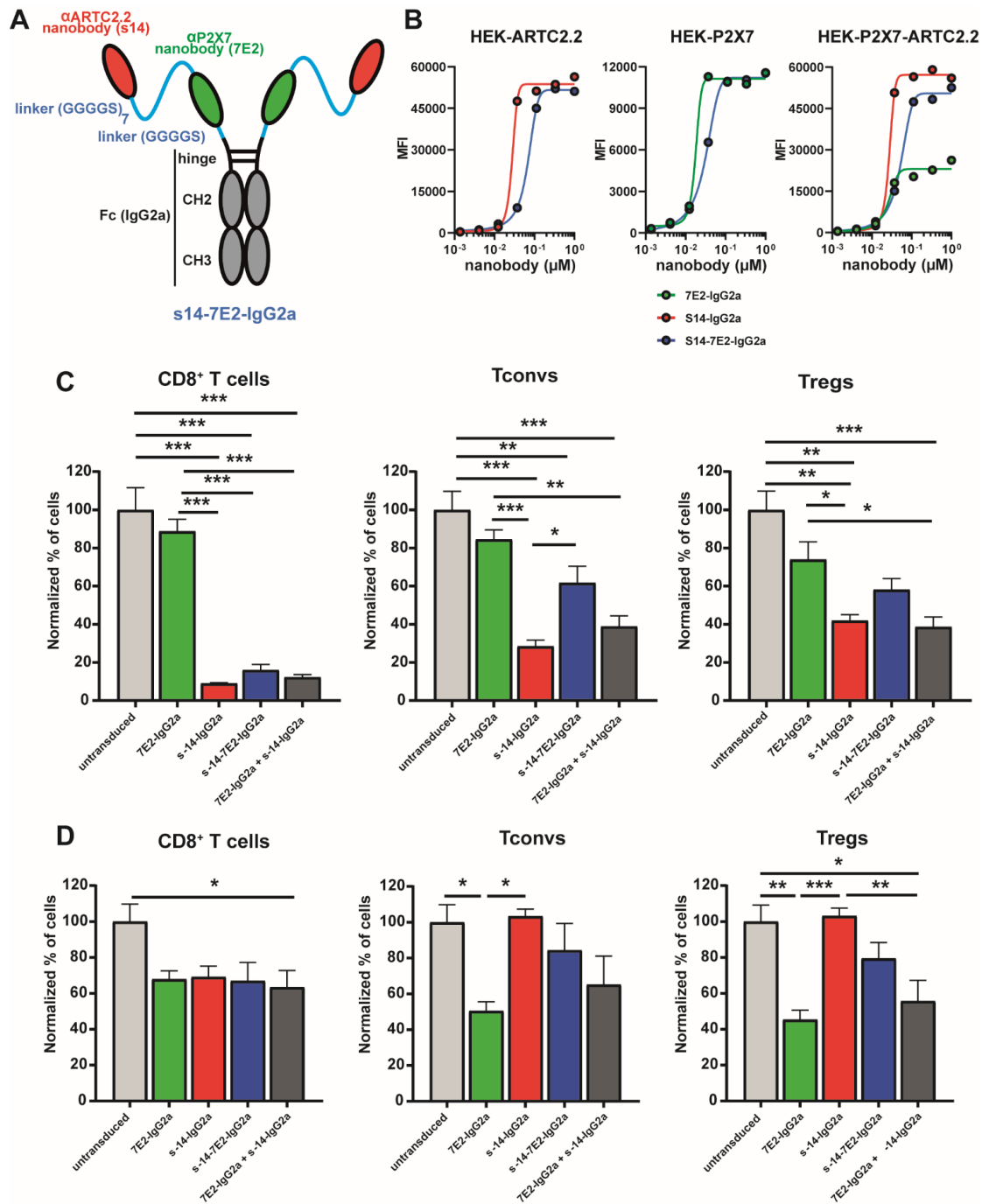


Figure 4: Evaluation of cell depletion induced by bispecific anti-ARTC2.2 and anti-P2X7 s14-7E2-IgG2a

(A) Schematic representation of s14-7E2-IgG2a. The C-terminal part of anti-ARTC2.2 nanobody S-14 was fused to the N-terminal part of anti-P2X7 nanobody through a 35-amino acid linker (GGGGS)₇ and the C-terminal part of 7E2 was linked to the hinge of a mouse

IgG2a Fc region with a 5-amino acid GGGGS linker. **(B)** HEK cells transduced to express ARTC2.2 (HEK-ARTC2.2), P2X7 (HEK-P2X7) or both (HEK-P2X7-ARTC2.2) were incubated with serial dilutions of recombinant S14-7E2-IgG2a that was counterstained with biotinylated antibody to mouse IgG2a and streptavidin APC. **(C)** C57BL/6 mice were injected i.m. with PBS (untransduced, pale grey) or rAAV encoding 7E2-IgG2a (green), s14-IgG2a (red), bispecific s-14-7E2-IgG2a (blue) or both 7E2-IgG2a and s-14-IgG2a (dark grey). Blood samples were collected 82 days after injection and cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies for flow cytometry analysis. **(D)** BALB/c mice were injected i.m. with PBS (untransduced, pale grey) or rAAV encoding 7E2-IgG2a (green), s14-IgG2a (red), bispecific s-14-7E2-IgG2a (blue) or both 7E2-IgG2a and s-14-IgG2a (dark grey). Blood samples were collected 35 days after injection and cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies for flow cytometry analysis. **(C)(D)** Normalized percentages of CD8 + T cells (red), Tconvs (green) and Tregs (blue) are expressed relative to the number of cells in the control group taken as 100%. Staining was performed using fluorochrome conjugated antibodies specific to CD45 (coupled to PerCP-Cy5.5), CD4 (APC-Cy7), CD8 (PE-Cy7), CD25 (PE) and biotinylated antibody to mouse IgG2a and streptavidin-APC. Errors bars represent the SEM and statistical analyses were performed using one-way ANOVA (n=5 in each group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

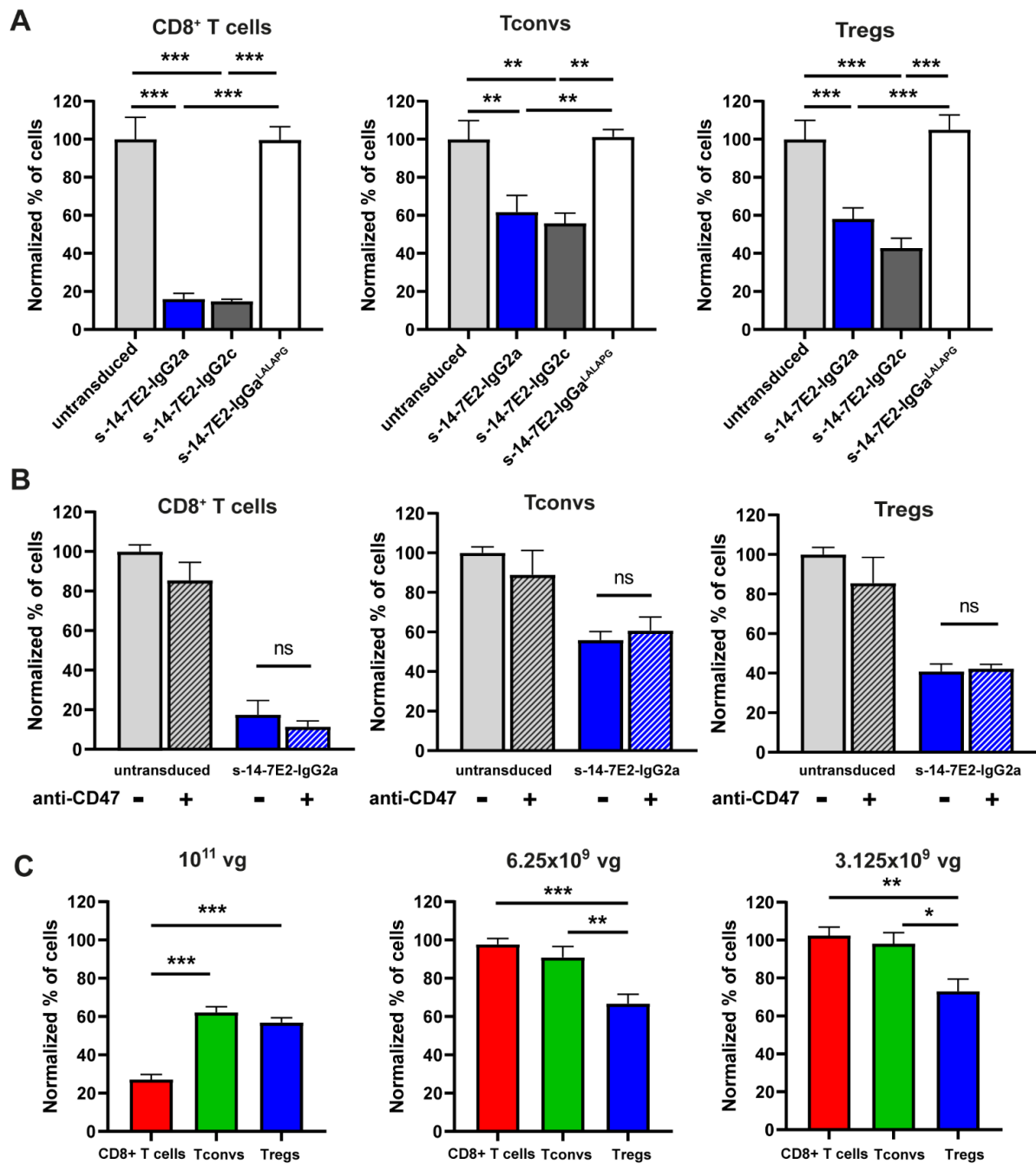
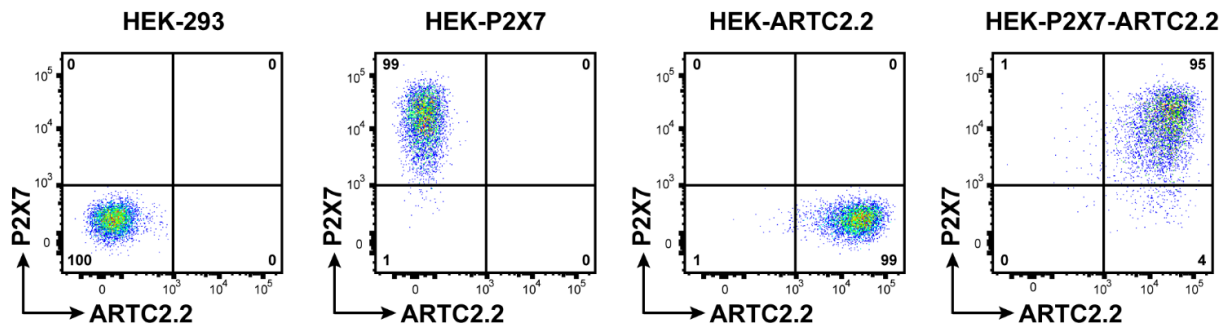


Figure 5: Strategies explored either to enhance cell depletion mediated by bispecific s14-7E2-IgG2a or to enhance the selectivity of the construct.

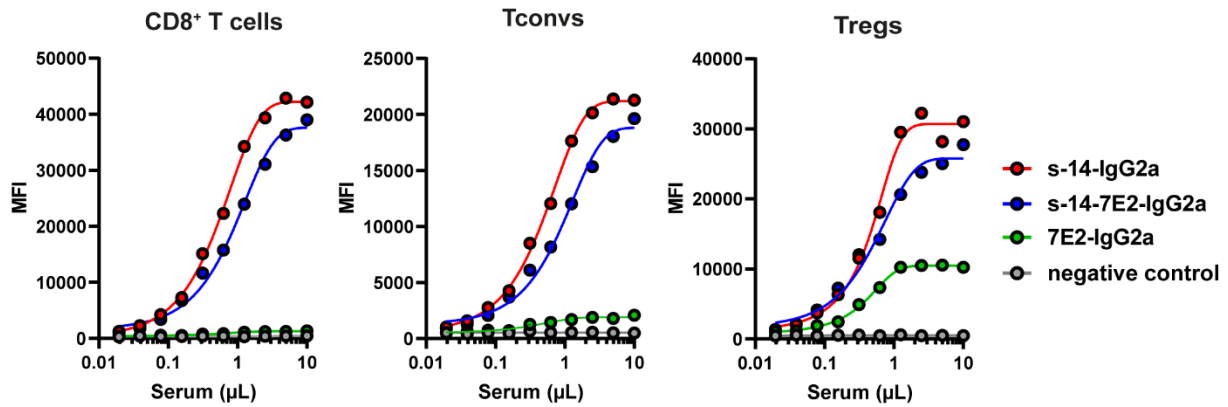
(A) C57BL/6 mice were injected i.m. with PBS (untransduced, pale grey) or rAAV encoding either s-14-7E2-IgG2a (blue), a variant fused to murine IgG2c Fc part, or a variant fused to a murine IgG2a bearing L234A, L235 and P327G mutations (LALA-PG) to abolish effector functions. Blood samples were collected 82 days after injection and cells were stained with

fluorochrome-conjugated antibodies for flow cytometry analysis. **(B)** PBS (untransduced) or rAAV vectors encoding s-14-7E2-IgG2a were injected to C57BL/6 mice. After 68 days, 200 μ g of anti-CD47 or irrelevant antibodies were injected i.p. The next day, blood was collected and cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies for flow cytometry analysis. **(C)** C57BL/6 mice were injected either with full dose (1.10^{11} vg) or with 6.25×10^9 vg or 3.125×10^9 vg of rAAV. Cell depletion was evaluated on blood collected from mice 21 days after the injection of rAAVs. **(A)(B)(C)** Normalized percentage of CD8 + T cells (red), Tconvss (green) and Tregs (blue) are shown, as compared to the percentages of cells found in the control group taken as 100%. Staining was performed using fluorochrome conjugated antibodies specific to CD45 (coupled to PerCP-Cy5.5), CD4 (APC-Cy7), CD8 (PE-Cy7), CD25 (PE) and biotinylated antibody to mouse IgG_a and streptavidin-APC. Errors bars represent the SEM and statistical analyses were performed using one-way ANOVA (n=5 in each group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).



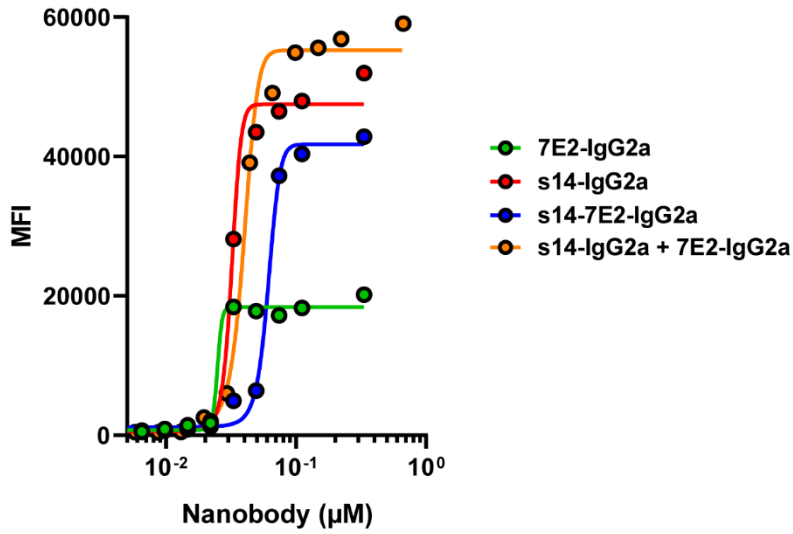
Supplemental S1: HEK-293 cell models

HEK-293 cells were transduced by a retroviral vector to express P2X7 (HEK-P2X7), ARTC2.2 (HEK-ARTC2.2) or both (HEK-P2X7-ARTC2.2). Staining was performed with antibodies to P2X7 (1F11) coupled to PE and ARTC2.2 (Nika102) coupled to APC.



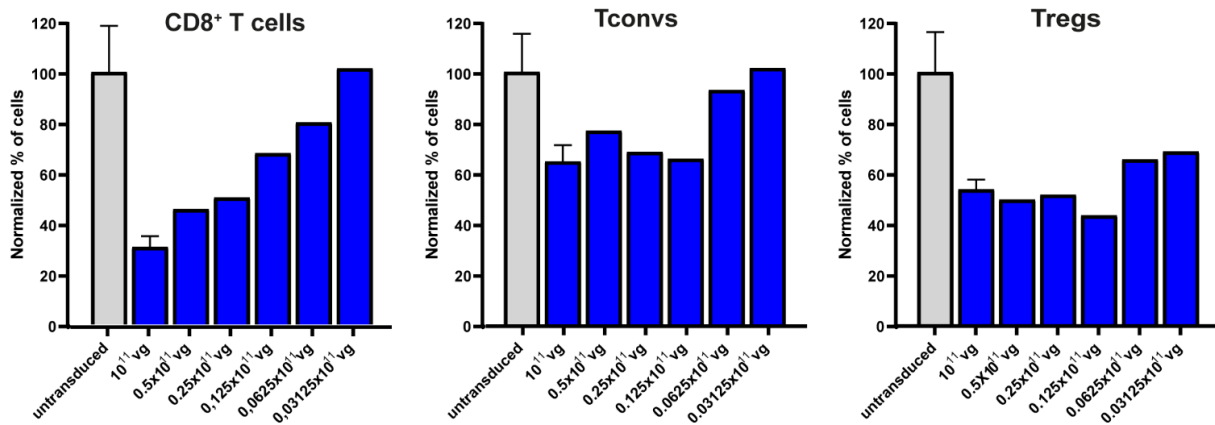
Supplemental S2: Binding of *in vivo* produced HcAb constructs on splenocytes

C57BL/6 mice were injected with PBS (negative control, grey) or with rAAV encoding 7E2-IgG2a (green), s-14-IgG2a (red) or bispecific s-14-7E2-IgG2a (blue). Sera were collected 63 days after the injection of rAAV. Splenocytes from an untreated C56BL/6 mouse were incubated with serial dilutions of sera. After washing, staining was performed using fluorochrome conjugated antibodies specific to CD45 (coupled to PerCP-Cy5.5), CD4 (APC-Cy7), CD8 (PE-Cy7), CD25 (PE) and biotinylated antibody to mouse IgG₁ and streptavidin-APC.



Supplemental S3: Binding of HcAbs on HEK-P2X7-ARTC2.2

HEK cells transduced to express ARTC2.2 and P2X7 (HEK-P2X7-ARTC2.2) were incubated with serial dilutions of recombinant 7E2-IgG2a (green), s-14-IgG2a (red), s14-7E2-IgG2a (blue) or both 7E2-IgG2a and s-14-IgG2a (orange) After washing, staining was performed with biotinylated antibody to mouse IgG2a and streptavidin APC and samples were analysed by flow cytometry.



Supplemental S4: Injection of different doses of rAAV

PBS (untransduced) or rAAV vectors encoding s-14-7E2-IgG2a were injected in C57BL/6 mice. After 68 days, 200 μ g of anti-CD47 or irrelevant antibodies were injected i.p. The next day, blood was collected and cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies for flow cytometry analysis. (C) C57BL/6 mice were injected either with PBS (untransduced, grey), full dose (1.10^{11} vg, n=5) or with diluted doses of rAAV (n=1). Blood was collected from mice 21 days after the injection of rAAVs. Normalized percentage of CD8 + T cells (red), Tconvs (green) and Tregs (blue) are shown, as compared to the percentages of cells found in the control group taken as 100%. Staining was performed using fluorochrome conjugated antibodies specific to CD45 (coupled to PerCP-Cy5.5), CD4 (APC-Cy7), CD8 (PE-Cy7) and CD25 (PE). Errors bars represent the SEM and statistical analyses were performed using one-way ANOVA (n=5 in each group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

Discussion générale

Depuis la mise sur le marché du muromonab-CD3 en 1986, l'utilisation des anticorps en tant qu'agents thérapeutiques a considérablement augmenté au cours des dernières décennies. A côté des anticorps « conventionnels », glycoprotéines constituées de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères, des formats alternatifs de molécules biologiques ont été approuvés ou sont en phase d'étude clinique (Walsh and Walsh, 2022). Parmi ceux-ci, le premier médicament biologique basé sur des nanobodies, le caplacizumab, a été approuvé en 2018 (Peyvandi *et al.*, 2016). Les nanobodies, molécules monocaténaires dérivées de la partie variable des anticorps à chaîne lourde des camélidés, présentent des propriétés remarquables pour le développement de médicaments biologiques, notamment d'être facilement reformatables et leur capacité à moduler des activités biologiques (Koch-Nolte *et al.*, 2019).

Nous avons utilisé deux approches pour augmenter à la fois l'avidité et la demi-vie de nos molécules biologiques basées sur les nanobodies. Le format « dimer-half-life extended » (dim-HLE) est une construction bivalente dans laquelle les deux nanobodies sont fusionnés par l'intermédiaire d'un peptide GS de 35 acides aminés (GGGGS)₇, ce dimère étant lié à un nanobody anti-albumine (Alb8) par un peptide GS de 9 acides aminés (GGGGSGGGS). Le nanobody Alb8 permet la fixation non covalente de la construction à l'albumine sérique et ainsi d'améliorer la pharmacocinétique et la pharmacodynamie des nanobodies (Van Roy *et al.*, 2015). Le format-dimHLE permet d'augmenter l'effet bloquant ou potentialisateur de P2X7 d'un facteur 20 par rapport à la forme monomérique (Danquah *et al.*, 2016). La fusion à nanobody anti-albumine est une approche utilisée actuellement en clinique dans le cas d'un nanobody anti-récepteur à l'IL-6, en essai de phase II dans le lupus érythémateux disséminé (NCT02437890) et dans la polyarthrite rhumatoïde (NCT02287922) administré toutes les 2 à 4 semaines. Une autre approche utilisée consistait à fusionner un nanobody à une partie Fc par l'intermédiaire d'un peptide de 5 acides aminés (GGGGS) pour obtenir un format bivalent à chaîne lourde (HcAb : « heavy-chain antibody »). De la même façon que le format dim-HLE, ce format permet d'augmenter l'effet biologique des nanobodies 13A7 et 14D5 par rapport à la forme monomérique (Danquah *et al.*, 2016). Dans le cas de la construction 13A7, la sous-classe de la partie Fc utilisée est l'IgG1 de souris, activant peu les mécanismes effecteurs et portant les mutations T252L, T254S et T256F (LSF) (Nimmerjahn and Ravetch, 2005). Cette mutation

permet d'augmenter la demi-vie des IgG chez les souris C57BL/6 et BALB/c par augmentation de l'affinité pour le FcRn (Ghetie *et al.*, 1997). La fusion de nanobodies à une partie Fc permet non seulement d'améliorer l'avidité de la construction et d'augmenter la demi-vie, mais elle offre également la possibilité de promouvoir la déplétion cellulaire après fixation des nanobodies sur les cellules cibles. Pour cela, nous avons fusionné les nanobodies à une IgG de souris de sous-classe IgG2a pour sa capacité à engager les fonctions effectrices dépendantes des FcγR et pour induire l'activation de la voie classique du complément (Baum *et al.*, 2021).

Approche basée sur les vecteurs AAV

Dans nos expériences, nous avons démontré qu'une seule injection intramusculaire d'AAV (1.10^{11} génomes viraux) permet la production *in vivo* des constructions basées sur les nanobodies et un effet biologique durable et stable au cours du temps. Dans nos expériences, cet effet était maintenu pendant 120 jours après injection de rAAV, pour les points d'analyse les plus tardifs. La persistance du transgène est cohérente avec le fait que les cellules musculaires se renouvellent peu en dehors de contextes pathologiques (Spalding *et al.*, 2005) et représentent ainsi une potentielle source stable et à long terme de protéines d'intérêt codées par les vecteurs AAV (Martinez-Navio *et al.*, 2020). Cette méthodologie basée sur des rAAV codant des constructions basées sur les nanobodies, que nous avons appelée « AAVnano » présente plusieurs avantages par rapport à l'injection de molécules recombinantes (Demeules *et al.*, 2022, 2020; Gondé *et al.*, 2021). Elle permet d'éviter le recours à des injections quotidiennes de constructions recombinantes, limitant les manipulations des animaux et facilitant les procédures expérimentales. Nous pouvons également supposer que cette méthodologie permet d'obtenir une pharmacocinétique plus favorable en maintenant une concentration plasmatique saturante et stable *in vivo*, en limitant les cycles de pic/déclin obtenus après l'injection d'une molécule recombinante. Cela pourrait favoriser une meilleure biodisponibilité et une meilleure pénétration tissulaire.

Nous avons utilisé des rAAV de sérotype 1 sous le contrôle d'un promoteur de β -actine de poulet (CBA : « *chicken β -actin* ») pour les constructions modulatrices 14D5-dimHLE, 13A7-HcAb et s+16a, et des rAAV de sérotype 8 avec un promoteur hybride CASI pour les constructions déplétantes. Les promoteurs CBA et CASI ont été intégrés aux constructions pour leur capacité à permettre une expression robuste et à long terme du transgène de façon

ubiquitaire. Les sérotypes d'AAV 1 et 8 présentent un tropisme important pour le muscle squelettique et sont ainsi adaptés à la méthodologie que nous avons employée, consistant en une administration par voie intramusculaire (Li and Samulski, 2020). Il est important de noter que les AAV1 et AAV8 présentent également un tropisme hépatique, et de façon intéressante, dans une expérience non présentée dans ce manuscrit, une injection intraveineuse d'AAV8 permettait d'obtenir une intensité de déplétion similaire à celle obtenue après injection intramusculaire.

Étude de la capacité des nanobodies à moduler des activités biologiques

L'ATP et le NAD⁺ sont des métabolites intracellulaires classiquement impliqués dans le métabolisme cellulaire. En réponse à un stress cellulaire, l'ATP et le NAD⁺ sont susceptibles d'être libérés dans l'espace extracellulaire et agir comme des « signaux de danger » (Haag *et al.*, 2007). L'ATP extracellulaire est le ligand physiologique du récepteur P2X7, qui est un canal cationique non sélectif, exprimé à la surface des cellules immunitaires, notamment les monocytes, macrophages et les lymphocytes T. P2X7 est notamment connu pour jouer un rôle central dans l'inflammation par sa capacité à activer l'inflammasome NLRP3 et entraîner la libération d'IL-1 β et d'IL-18 (Di Virgilio *et al.*, 2017). A la surface des lymphocytes T, en fonction de la concentration d'ATP extracellulaire et la durée d'exposition, l'activation de P2X7 peut aboutir à plusieurs événements cellulaires. Une exposition brève entraîne l'activation des métalloprotéases de surface ADAM10 et ADAM17 entraînant la perte de CD27 et CD62L et l'externalisation des phosphatidylsérines membranaires. L'activation prolongée de P2X7 induit la formation d'un pore non sélectif, perméable à des molécules jusqu'à 900 Da, provoquant une dépolarisation membranaire et aboutissant à la mort cellulaire (Rissiek *et al.*, 2015). Le NAD⁺ libéré dans l'espace extracellulaire peut agir sur plusieurs ectoenzymes dont la mono-ADP ribosyl transférase ARTC2.2. En présence de NAD⁺, l'ARTC2.2 catalyse le transfert d'un résidu ADP-ribose sur des protéines membranaires, dont P2X7, entraînant son activation.

La capacité de 13A7-IgG1^{LSF} à bloquer durablement l'activation de P2X7 par l'ATP et celle de 14D5dim-HLE à la potentialiser peut être mise à profit pour étudier le rôle de P2X7 dans des modèles murins, dans plusieurs contextes physiopathologiques. Plusieurs études précliniques dans des modèles d'inflammation, de douleur, de maladies auto-immunes et

neurodégénératives ont mis en évidence que le blocage de P2X7 par des agents pharmacologiques pouvait présenter un intérêt thérapeutique (Arulkumaran *et al.*, 2011; Hofman *et al.*, 2015; Inoue and Tsuda, 2021; Matute *et al.*, 2007). Dans le cancer, il a été attribué à P2X7 des rôles contrastés. P2X7 semble jouer un rôle comme promoteur de la croissance des cellules cancéreuses et de la dissémination métastatique. De nombreux types de cellules cancéreuses expriment P2X7 et son activation tonique dans le microenvironnement tumoral est associée à la prolifération des cellules cancéreuses (Adinolfi *et al.*, 2012; De Marchi *et al.*, 2019). Au contraire, d'autres études ont mis en évidence que P2X7 pouvait être à l'origine du rejet de tumeurs par un effet sur la stimulation de réponses immunitaires. Ainsi, des agents pharmacologiques modulateurs allostériques positifs, capables de potentialiser P2X7, ont été développés. Une de ces molécules, HEI3090, a démontré des résultats prometteurs dans des modèles de cancer du poumon et de mélanome, par sa capacité à stimuler les cellules immunitaires, notamment les cellules dendritiques, les lymphocytes NK et les lymphocytes CD4⁺ (Douguet *et al.*, 2021). Notre stratégie basée sur les rAAV, qui permet le blocage ou la potentialisation de P2X7 à long terme, représente un outil complémentaire pour mieux délimiter le rôle de P2X7, notamment dans le cancer. En comparaison aux molécules chimiques, les constructions basées sur les nanobodies offrent une meilleure spécificité. Les nanobodies (et les anticorps conventionnels) sont capables de distinguer des cibles proches appartenant à la même famille, contribuant à limiter la survenue d'effets indésirables. Dans ce travail de thèse, les constructions basées sur des nanobodies sélectionnées se lient spécifiquement au récepteur P2X7 de la souris et ne reconnaissent pas les paralogues les plus proches P2X4 et P2X1 (Danquah *et al.*, 2016).

A côté des inhibiteurs pharmacologiques, des modèles murins déficients pour P2X7 ont également été développés pour étudier de rôle de P2X7 *in vivo*. Ces modèles présentent plusieurs limites. Dans un modèle murin développé par Glaxosmithkline, ciblant l'exon 1 de P2X7, il a été mis en évidence que le variant P2X7k n'est pas invalidé (Nicke *et al.*, 2009). Ce variant résultant d'un épissage alternatif de P2X7 est exprimé majoritairement sur les lymphocytes T au contraire du variant P2X7a, invalidé dans ce modèle, qui est exprimé principalement sur les monocytes et macrophages (Nicke *et al.*, 2009). Dans un autre modèle, développé par Pfizer, ciblant l'exon 13, la version tronquée de P2X7 dans sa partie C-terminale pourrait conserver une activité biologique, bien que diminuée (Masin *et al.*, 2012).

Une exposition brève à des concentrations relativement faibles de NAD⁺ (de l'ordre de 1-30 µM) suffit pour induire la mort cellulaire dépendante de P2X7 (Rissiek *et al.*, 2015). Le NAD⁺ est susceptible d'être libéré en quantités suffisantes lors du prélèvement de tissus de souris et de la préparation de cellules. Au cours d'expériences, ces manipulations sont réalisées en routine sur la glace (à 4°C) pour préserver la viabilité des cellules isolées. Cependant, l'ectoenzyme ARTC2.2 est active à 4°C et, dans ces conditions, est capable de catalyser l'ADP-ribosylation covalente de protéines de surface, dont P2X7. En revanche, l'activation de P2X7 par ADP-ribosylation ne se produit qu'à des températures supérieures à 22°C (Scheuplein *et al.*, 2009). Ainsi les effets fonctionnels de l'ADP-ribosylation sont susceptibles de se manifester lors de la ré-incubation des cellules à 37°C, provoquant la mort cellulaire d'une fraction substantielle de lymphocytes T, notamment les populations qui co-expriment des niveaux élevés de P2X7 et ARTC2.2., incluant les Tregs, les lymphocytes NKT et les lymphocytes T résidents mémoire (Trm) (Georgiev *et al.*, 2018; Rissiek *et al.*, 2018, 2014; Seman *et al.*, 2003; Stark *et al.*, 2018)

Notre approche basée sur l'injection d'AAV codant pour 13A7-IgG1^{LSF} ou s+16-dimHLE constitue ainsi un outil intéressant pour préserver les cellules de la mort cellulaire induite par le NAD⁺ et ainsi permettre leur étude ultérieure *ex vivo* lorsque les protocoles expérimentaux impliquent une réincubation des cellules à 37°C, ou dans le cas d'expériences de transfert adoptif. Parmi ces deux approches, celle consistant à bloquer ARTC2.2 par s+16a-dimHLE interfère probablement moins avec la fonction des lymphocytes que l'approche consistant à bloquer P2X7 par 13A7-IgG1^{LSF}, qui bloque également son activation par l'ATP. En effet l'ATP extracellulaire stimule et module la fonction des lymphocytes T. L'ATP synthétisé par les lymphocytes T CD4⁺ agit de façon autocrine sur P2X7 pour augmenter la production d'IL-2 après engagement du TCR et l'absence de signalisation par P2X7 lors de l'activation des lymphocytes T affecte l'activation de la voie MAP kinase et induit un programme transcriptionnel caractéristique de l'anergie (Schenk *et al.*, 2008). De la même façon, une autre approche décrite dans la littérature, basée sur le blocage de P2X7 par l'agent pharmacologique KN62 présente ce même inconvénient (Georgiev *et al.*, 2018). Par ailleurs, bien que KN62 soit un puissant antagoniste non compétitif de P2X7, il est aussi susceptible de pénétrer dans la cellule et agir comme inhibiteur sélectif de protéine kinase II Ca²⁺/calmoduline dépendante qui joue un rôle clé dans l'activation de la kinase IκB médiée par le récepteur des lymphocytes T (Rissiek *et al.*, 2018). A l'opposé, le blocage d'ARTC2.2 pour prévenir la mort

cellulaire induite par le NAD⁺ semble préserver la fonction des cellules. L'injection de s+16a recombinant, sous forme monomérique, 15 min avant le sacrifice des animaux permettait de préserver, non seulement la viabilité, mais également la fonctionnalité suppressive des Tregs *in vitro* et la capacité des lymphocytes NKT à proliférer et à sécréter de l'INF- γ en réponse à une stimulation par l' α -galactosylcéramide. Ce blocage d'ARTC2.2 permettait également d'améliorer la survie des Tregs et des lymphocytes NKT après transfert adoptif (Rissiek *et al.*, 2014). De la même façon, l'injection de s+16a 30 min avant le sacrifice des animaux permet d'améliorer la fonctionnalité des Trm (Rissiek *et al.*, 2018).

Nous avons comparé l'effet obtenu avec les constructions produites *in situ* après injection de rAAV avec celui obtenu *in vitro* avec des formes recombinantes. Pour cela, nous avons incubé des splénocytes provenant d'une souris naïve (non transduite par des vecteurs AAV) avec des doses croissantes de constructions recombinantes, puis avec du NAD⁺ ou de l'ATP. Nous avons observé que chaque construction à dose saturante *in vitro* (de l'ordre de 10 μ g/mL) induisait un effet biologique comparable à celui observé *ex vivo* en utilisant l'approche basée sur les rAAV. Nous pouvons ainsi soutenir que l'injection de rAAV permet la production *in vivo* d'une quantité suffisante de constructions biologiques pour saturer les cibles et ainsi obtenir un effet biologique maximal, similaire à celui obtenu avec des concentrations saturantes *in vitro*.

Notre analyse des Trm hépatiques a permis de mettre en évidence que 120 jours après une injection d'AAV, s+16a-dimHLE sature ARTC2.2 à la surface de ces cellules. De la même façon, et malgré l'effet potentialisateur sur la mort cellulaire induite par le NAD⁺, 14D5-dimHLE était détectable sur les Trm CD69⁺. En revanche, 13A7-IgG1^{LSF} était détecté à des niveaux plus faibles à la surface des Trm. Cela n'était pas dû à une faible fixation de la construction sur P2X7 car l'intensité moyenne de fluorescence, évaluée par cytométrie en flux, n'était pas augmentée lorsque ces cellules étaient incubées par la suite avec une dose saturante de 13A7-IgG1^{LSF} recombinant *ex vivo*. Nous pouvons ainsi supposer que 13A7-IgG1^{LSF} induit une modulation négative de l'expression de P2X7, probablement par son internalisation. Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses pour expliquer que 13A7-IgG1^{LSF} soit internalisé après fixation sur P2X7 alors que 14D5-dimHLE ne l'est pas, bien qu'ils soient tous les deux spécifiques de la même cible. Tout d'abord, cet effet pourrait être lié à un épitope différent reconnu par les clones 13A7 et 14D5 sur P2X7. Cette influence de l'épitope sur le niveau

d'internalisation a été mise en évidence *in vitro* dans le cas d'anticorps monoclonaux anti-CD73 (Terp *et al.*, 2013). Il est également envisageable que la différence d'affinité de ces constructions puisse jouer un rôle (Opaliński *et al.*, 2018; Rudnick *et al.*, 2011). Enfin, il est possible que le format HcAb de 13A7-IgG1^{LSF} puisse favoriser la réticulation de P2X7 par rapport au format dim-HLE, dans lequel les deux nanobodies du dimère sont séparés par un long linker de 35 acides aminés, et ainsi favoriser l'internalisation de la cible après fixation (Moody *et al.*, 2015). En lien avec cette hypothèse, la construction consistant en la fusion de 14D5 à une partie Fc, également évaluée dans notre laboratoire, s'est comportée comme un antagoniste partiel sur l'activité de P2X7 plutôt que comme un modulateur positif de son activité comme c'est le cas avec le format dim-HLE (données non présentées). Ainsi, la capacité de blocage de P2X7 par 13A7-IgG1^{LSF} pourrait être liée à son activité intrinsèque bloquante sur P2X7, à l'internalisation de P2X7 ou une combinaison des deux effets. L'exploration des mécanismes par lesquels cette construction bloque l'activation de P2X7 fera l'objet de futures expériences.

Etude de la capacité des nanobodies à induire la déplétion cellulaire

La déplétion cellulaire est médiée par l'interaction de la partie Fc des anticorps d'une part avec le complexe C1 et l'activation de la voie classique du complément aboutissant à la formation du complexe membranaire (CDC : *complement-dependent cytotoxicity*) et d'autre part avec les FcγR présents à la surface des lymphocytes NK (ADCC : *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) et des macrophages (ADCP : *antibody-dependent cellular phagocytosis*). Dans notre approche, consistant en l'évaluation de nos constructions dans des souris *wild-type*, nous pouvons supposer que l'ADCP est le mécanisme effecteur majoritairement mis en jeu. En effet, il est peu probable que la CDC joue un rôle important dans la déplétion cellulaire, étant donné que les souris consanguines ne présentent qu'une faible activité du complément comparativement à l'homme et à d'autres espèces animales (Ong and Mattes, 1989). Plusieurs arguments suggèrent que l'ADCC médiée par les lymphocytes NK n'est également pas le mécanisme prépondérant dans les modèles murins. *In vivo*, l'activité déplétante d'un anticorps murin anti-CD20 d'isotype IgG2a est abolie par le blocage du FcγRIV (exprimé à la surface des monocytes/macrophages) mais pas par le blocage du FcγRIII, qui est le seul FcγR exprimé à la surface des lymphocytes NK murins (Hamaguchi *et al.*, 2006). De la même façon, le

blochage du Fc γ RIV mais pas celui du Fc γ RIII abolit l'activité anti-tumorale d'un anticorps d'isotype IgG2a (Nimmerjahn and Ravetch, 2005). Par ailleurs, *in vitro*, contrairement aux lymphocytes NK humains isolés du sang périphérique, qui présentent une forte capacité cytolytique, les lymphocytes NK murins fraîchement isolés ne présentent qu'une faible capacité lytique. Cette différence a été attribuée à une différence dans la traduction et l'expression de la perforine et du granzyme B. Chez la souris, les ARNm de la perforine et du granzyme B sont constitutivement transcrits mais faiblement traduits en protéines, jusqu'à l'activation de la cellule qui entraîne une traduction rapide des ARNm, alors que chez l'homme, le cytoplasme des lymphocytes NK comprend à l'état basal des niveaux élevés de perforine et de granzyme B (Sungur and Murphy, 2013).

Nous avons évalué nos constructions dans deux modèles murins, dans lesquels les profils d'expression de P2X7 et d'ARTC2.2 sur les sous-populations de lymphocytes T sont différents, nous permettant d'explorer les facteurs influençant le niveau de déplétion cellulaire. De façon générale, nos résultats montrent que le niveau de déplétion cellulaire des sous-populations de lymphocytes T, évalué sur des prélèvements sanguins après injection de rAAV codant pour 7E2-IgG2a ou s-14-IgG2a à des temps précoces (18 jours pour le modèle C57BL/6 ; 27 jours pour BALB/C) et des temps plus tardifs (92 jours ; 97 jours) est en corrélation avec la densité antigénique à la surface des cellules. Ces résultats ne sont pas surprenants puisque davantage de constructions sont susceptibles d'être fixées à la surface des cellules lorsque la densité de la cible augmente, exposant plus de fragments Fc susceptibles d'interagir avec les Fc γ R et le C1q pour engager les mécanismes effecteurs. A côté de la densité antigénique, nos résultats suggèrent que d'autres facteurs sont susceptibles d'influencer la déplétion médiée par nos constructions basées sur les nanobodies. La comparaison des niveaux de déplétion des Tregs médiés par les constructions anti-P2X7 7E2-IgG2a et anti-ARTC2.2 s-14-IgG2a montre que, bien que les deux cibles soient exprimées à haut niveau à la surface de ces cellules dans le modèle C57BL/6, s-14-IgG2a induit une déplétion profonde (de l'ordre de 70%) alors que la déplétion provoquée par 7E2-IgG2a est plus modeste, de l'ordre de 30%. Il est probable que la différence de taille, de structure et d'oligomérisation entre ARTC2.2 et P2X7 influence le niveau de déplétion. En effet, ARTC2.2 est une protéine monomérique de 35 Kda ancrée à la membrane par un groupement GPI alors que P2X7 est une protéine homotrimérique de 195 Kda, dont chaque sous-unité comprend un domaine extracellulaire de

269-288 acides aminés, deux domaines transmembranaire et des extrémités N- et C-terminales intracellulaires (Di Virgilio *et al.*, 2018).

Dans le modèle C57BL/6, 7E2-IgG2a provoque une déplétion d'environ 15% des Tconvs (MFI du marquage de P2X7 : 13194) alors que dans le modèle BALB/c, bien que P2X7 soit exprimé à un niveau plus faible sur les LT CD8⁺ (MFI : 10136), le niveau de déplétion est plus important (environ 25%). De la même façon, alors que P2X7 est exprimé à niveaux similaires sur les Tregs des souris C57BL/6 (MFI : 27379) et BALB/c (MFI : 27202), le niveau de déplétion médiée par 7E2-IgG2a est plus élevé dans le modèle BALB/c (50%) que dans le modèle C57BL/6 (30%). Dans notre approche basée sur la production *in vivo* des constructions biologiques après injection de rAAV, nous pourrions supposer que le niveau de production des protéines puisse varier entre les souches de souris, et que la différence de concentrations plasmatiques résultante pourrait influencer le niveau de déplétion. Cette hypothèse paraît peu probable puisque nous constatons que le niveau de déplétion varie très peu entre les temps précoces et tardifs pour les souris C57BL/6 et BALB/c, suggérant que l'effet est maximal et par conséquent que les constructions sont à saturation, indépendamment de la souche de souris. Une autre explication pourrait être une internalisation de P2X7 à la surface des cellules des souris C57BL/6 provoquée par la fixation de 7E2-IgG2a, similaire au phénomène de modulation antigénique survenant avec les anticorps anti-CD20 de type I (*e.g.* rituximab) (Beers *et al.*, 2010). Dans cette hypothèse, l'internalisation de P2X7 provoquerait une diminution du nombre de cible à la surface des cellules et par conséquent un plus faible niveau de déplétion. Le récepteur P2X7 des souris C57BL/6 et BALB/c diffère par un seul acide aminé en position 451 dans la partie intracellulaire C-terminale de P2X7, connue pour participer à la transduction des signaux et à la formation du pore membranaire suite à la stimulation prolongée du récepteur par l'ATP. Le variant 451L, exprimé dans les souris C57BL/6 présente une susceptibilité plus faible à la formation du pore non sélectif provoqué par l'ATP que le variant 451P exprimé dans les souris BALB/c. Il a été suggéré que la mutation P451L pourrait affecter la capacité du récepteur à interagir avec d'autres protéines (Adriouch *et al.*, 2002). Nous pouvons spéculer que cette différence d'un seul aminé, qui est importante pour la fonctionnalité de P2X7, puisse également influencer le phénomène d'internalisation. Une autre hypothèse est que l'efficacité des mécanismes effecteurs mis en jeu diffère entre les souches de souris. Selon les résultats exposés précédemment, les mécanismes effecteurs seraient plus efficaces dans les souris BALB/c. Or l'évaluation de la construction anti-ARTC2.2 s-14-IgG2a suggère l'inverse. Après

injection de rAAV codant pour cette construction, environ 70% des Tconvs des souris C57BL/6 (MFI d'expression d'ARTC2.2 : 18372) sont déplétés alors que dans le modèle BALB/c, S-14-IgG2a provoque une déplétion d'environ 30% des LT CD8⁺, alors que ces cellules ont niveau d'expression d'ARTC2.2 similaire, (MFI : 13457). Au total, nous ne pouvons pas exclure que l'efficacité des mécanismes effecteurs diffère entre les souris *wild-type* C57BL/6 et BALB/c, et à notre connaissance cela n'a pas été reporté dans la littérature.

Dans le cancer, les Tregs sont susceptibles d'infiltrer la tumeur, contribuant à diminuer la réponse immunitaire anti-tumorale et l'infiltration de Tregs dans la tumeur est corrélée avec un mauvais pronostic (Shang *et al.*, 2015). La déplétion des Tregs représente un moyen d'augmenter la réponse immunitaire anti-tumorale. Plusieurs études précliniques chez la souris ont démontré qu'un anticorps anti-CD25, capable d'induire une déplétion des Tregs CD4⁺CD25⁺, inhibe la croissance tumorale et améliore la survie des souris (Golgher *et al.*, 2002; Onizuka *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 1999). De la même façon, l'ipilimumab, anticorps anti-CTLA-4 de sous-classe IgG1 approuvé dans le traitement du mélanome, bloque la cosignalisation négative médiée par CTLA-4 et CD80/CD86, mais a également démontré sa capacité à induire une déplétion des Tregs contribuant à son efficacité anti-tumorale (Selby *et al.*, 2013; Simpson *et al.*, 2013). Dans le modèle C57BL/6, les Tregs expriment à la fois P2X7 et ARTC2.2 à haut niveau. Ainsi, nous avons développé une construction bispécifique ciblant à la fois ARTC2.2 et P2X7 avec l'objectif d'induire une déplétion sélective des Tregs par rapport aux autres sous-populations de lymphocytes T étudiées.

La construction bispécifique induit un niveau plus faible de déplétion cellulaire *in vivo* que s-14-IgG2a dans le modèle C57BL/6 et que 7E2-IgG2a dans le modèle BALB/c. Cette observation est probablement liée à une densité de fragments Fc plus faibles à la surface des cellules obtenue avec s-14-7E2-IgG2a qu'avec les constructions monospécifiques. Dans le cas d'anticorps conventionnels, lorsque les concentrations d'anticorps sont faibles par rapport à la cible, la plupart des cibles à la surface de la cellule sont inoccupées et disponibles pour la liaison de l'anticorps. Dans ces conditions, une forte proportion d'anticorps à la surface de la cellule est liée de manière bivalente. La proportion d'anticorps liés de manière monovalente deviendra de plus en plus fréquente à des concentrations d'anticorps plus élevées, car les anticorps doivent entrer en compétition pour les cibles libres (Dunlap and Cao, 2022; Harms *et al.*, 2014, 2012). Nous pouvons supposer que les constructions monospécifiques basées sur les nanobodies se

comportent de la même façon que les anticorps conventionnels. En revanche, la construction bispécifique possède quatre paratopes, deux dirigés contre P2X7 et deux contre ARTC2.2 et ainsi possède une avidité plus élevée que les constructions monospécifiques pour les cellules exprimant les deux cibles. Cela pourrait favoriser sa fixation bivalente, trivalente par trois paratopes ou tétravalente au travers des quatre paratopes, y compris dans le cas de concentrations saturantes. Ainsi, moins de constructions bispécifiques sont susceptibles d'être présentes simultanément à la surface des cellules exprimant à la fois P2X7 et ARTC2.2, comparativement aux constructions monospécifiques, exposant moins de fragments Fc à la surface de la cellule. Nos résultats d'essais de fixation sur des splénocytes de souris C57BL/6 et sur nos modèles HEK confortent cette hypothèse. Sur les cellules HEK-ARTC2.2 et sur les cellules HEK-P2X7, la MFI à saturation obtenue avec la construction bispécifique est similaire à celles obtenues avec les constructions monospécifiques, suggérant une fixation monovalente, alors que sur les cellules HEK-P2X7-ARTC2.2, la MFI à saturation obtenue avec la construction bispécifique est inférieure à celles obtenues avec les constructions monospécifiques, résultant d'une densité plus faible de fragments Fc. Cela suggère qu'à saturation la construction bispécifique aura moins tendance à se fixer de façon monovalente, favorisant un mode de fixation bivalent, voire trivalent ou tétravalent. Par ailleurs, nos résultats d'essais de fixation suggèrent que l'EC50 de s-14-7E2-IgG2a est supérieure à celles des constructions monospécifiques sur les cellules HEK-P2X7, HEK-ARTC2.2 et HEK-P2X7-ARTC2.2, ainsi que sur des splénocytes de souris C57BL/6. Cette observation semble indiquer que dans la construction bispécifique, chaque monomère de nanobodies (S-14 et 7E2) interfère avec l'autre pour la fixation sur la cible, gênant sa fixation. Cette interférence pourrait être provoquée par un encombrement stérique, malgré le linker de 35 acides aminés liant les deux monomères, ou encore être la conséquence d'interactions entre des résidus d'acides aminés de chaque monomère dans la molécule.

Nous avons exploré deux stratégies pour augmenter le niveau de déplétion médiée par la construction bispécifique. La première consistait à fusionner les nanobodies à une partie Fc de sous-classe IgG2c. IgG2a et IgG2c sont deux allotypes, présents respectivement dans les souris BALB/c et C57BL/6 (Zhang *et al.*, 2012). Nous avons observé une tendance à l'augmentation du niveau de déplétion avec la construction s-14-7E2-IgG2c (57%) dans les souris C57BL/6, notamment sur les Tregs sans que la différence avec s-14-7E2-IgG2a (42%) ne soit significative. La comparaison des séquences d'acides aminés d'IgG2a et IgG2c

présentée dans l'introduction de ce manuscrit (figure 10) met en évidence des différences localisées dans la région charnière notamment dans la charnière centrale (résidus 220 à 230). La région charnière d'IgG2c est également plus longue de 5 acides aminés. Ces différences pourraient contribuer à l'augmentation de la déplétion médiée par IgG2c. La région charnière des IgG est un lien flexible entre la partie Fc et la partie Fab des anticorps conventionnels, ou la partie nanobody dans notre étude, qui est impliquée dans l'interaction avec les FcγR (Roux *et al.*, 1997; Sondermann *et al.*, 2000). Dans les études menées sur des modèles syngéniques C57BL/6 décrites dans la littérature, les IgG peuvent être de sous-classe IgG2a ou IgG2c mais, à notre connaissance, aucune étude n'a comparé l'effet de ces deux sous-classes *in vivo*. En revanche, la comparaison de la fixation d'IgG sur les FcγR murins suggère qu'IgG2c a une affinité un peu plus importante pour le FcγRIV qu'IgG2a (Wang *et al.*, 2022). Une autre étude a également mis en évidence une affinité plus forte d'IgG2c pour le FcγRIV, mais également pour le FcγRI, alors qu'IgG2a a une affinité plus forte pour le FcγRIII (Shinde *et al.*, 2020). Cette affinité plus élevée de la sous-classe IgG2c pour le FcγRIV pourrait contribuer à la tendance à l'augmentation de la déplétion cellulaire que nous avons observée.

L'interaction de CD47 et son récepteur SIRPα, qui est exprimé sur les cellules phagocytaires incluant les monocytes, macrophages, les cellules dendritiques et les polynucléaires neutrophiles, transmet un signal « *dont-eat me* ». Ce signal inhibiteur contrebalance les signaux pro-phagocytaires provoqués par l'interaction des anticorps déplétants et des FcR activateurs à la surface des cellules phagocytaires, inhibant le processus d'ADCP. Ainsi, l'administration d'anticorps anti-CD47 en association à des anticorps déplétants permet d'améliorer la réponse anti-tumorale dans des modèles précliniques murins et en phase clinique chez l'homme (Advani *et al.*, 2018; Sockolosky *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021). Dans notre étude, nous avons constaté qu'un anticorps monoclonal anti-CD47 administré 68 jours après l'injection de rAAV codant pour s-14-7E2-IgG2a n'augmente pas le niveau de déplétion médiée par cette construction. Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses pour expliquer ces résultats. La première est liée à notre schéma d'administration, qui consistait en une injection unique de 200 µg de l'anticorps monoclonal commercial MIAP410. Contrairement aux modèles de xénogreffe de tumeur, dans lesquels l'anticorps monoclonal utilisé est dirigé contre le CD47 humain et donc ne cible que la tumeur, dans les modèles syngéniques, ainsi que dans nos modèles *wild-type* exempts de tumeurs, CD47 est exprimé virtuellement sur toutes les cellules, notamment sur les érythrocytes et les thrombocytes. Cette

expression ubiquitaire aboutit à un effet puits d'antigène important (« *antigen sink* ») limitant la quantité d'anticorps anti-CD47 sur les cellules d'intérêt, *i.e.* les lymphocytes T dans notre modèle (Ingram *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2020). Nous pouvons supposer que l'administration de doses plus élevées et/ou des administrations plus fréquentes d'anticorps anti-CD47 pourraient conduire à un niveau de déplétion plus important. A titre de comparaison, dans les études menées sur des modèles murins immunocompétents, les schémas thérapeutiques incluent des injections de 400 µg par jour, 400 µg tous les deux jours et 200 µg par jour pendant 14 jours (Liu *et al.*, 2015; Majeti *et al.*, 2009; Willingham *et al.*, 2012). L'administration d'anticorps ciblant SIRPα pourrait également être utilisée en alternative à un anticorps anti-CD47, le profil d'expression de SIRPα étant plus restreint que celui de CD47 (Gauttier *et al.*, 2020). Nous pouvons envisager que d'autres mécanismes rendent les lymphocytes T peu susceptibles à l'augmentation de l'ADCP médiée par le blocage de CD47. Il apparaît de façon générale dans la littérature que l'administration d'anticorps anti-CD47 entraîne peu de toxicités systémiques malgré l'expression de cette protéine sur de nombreux tissus sains (Feng *et al.*, 2019; Reinhold *et al.*, 1995). En pratique, l'efficacité du blocage de CD47 n'est pas uniquement la conséquence de son expression à la surface des cellules, mais semble également liée à la présence de signaux additionnels pro-phagocytaires « *eat me* », notamment l'exposition de la calréticuline à la surface cellulaire (Feng *et al.*, 2019). Contrairement aux cellules tumorales, qui sont susceptibles d'exprimer la calréticuline à leur surface, les cellules saines ne l'expriment pas. Après injection d'anti-CD47, le signal anti-phagocytaire CD47/SIRPα est bloqué, dévoilant le signal pro-phagocytaire calréticuline sur les cellules tumorales et entraînant leur phagocytose. Au contraire, le blocage de CD47 sur les cellules saines n'entraîne pas leur phagocytose car le signal pro-phagocytaire est absent (Chao *et al.*, 2010). Bien que la calréticuline puisse être exprimée à la surface des lymphocytes T périphériques activés (Arosa *et al.*, 1999), il est probable que dans notre modèle l'absence ou le faible niveau de signaux pro-phagocytaires contribue à l'absence d'effet du blocage de CD47 sur la déplétion cellulaire médiée par la construction bispécifique s-14-7E2-IgG2a.

Après injection de 1.10^{11} génomes viraux (gv) de rAAV codant pour s-14-7E2-IgG2a dans des souris C57BL/6, nous observons une déplétion des LT CD8⁺ de l'ordre de 90% et des Tconv^s et Tregs de l'ordre de 40%. L'absence de sélectivité de la déplétion médiée par la construction bispécifique *in vivo* pour les cellules exprimant à la fois P2X7 et ARTC2.2 (*i.e.* les Tregs dans le modèle C57BL/6) est vraisemblablement liée à un effet de dispersion de la

molécule. À des concentrations saturantes *in vivo*, s-14-7E2-IgG2a est susceptible de se fixer sur les cellules exprimant P2X7, ARTC2.2 et celles qui expriment les deux, provoquant leur déplétion. Dans le cas de concentrations plus faibles, les constructions bispécifiques auront tendance à cibler prioritairement les cellules exprimant les deux cibles par effet d'avidité. Dans nos expériences, nous avons en effet observé qu'après injection de $0.0625 \cdot 10^{11}$ gv ($1/16^e$ de la dose pleine) ou $0.03125 \cdot 10^{11}$ gv ($1/32^e$), la déplétion est plus sélective pour les Tregs puisque dans ce contexte les niveaux de LT CD8+ et Tconv sont proches de ceux des souris contrôle.

C. Limites du modèle

Le gène *ARTC2* est non fonctionnel chez l'homme à cause de la présence de codons stop prématurés. De ce fait, les effets liés au blocage d'ARTC2.2 par la construction s+16a-dimHLE ne sont pas directement transférables à l'homme. De la même façon, l'évaluation de la déplétion sur le modèle P2X7/ARTC2.2 ne constitue pas un modèle translationnel. Dans ce travail de thèse, nous avons fait le choix de ce modèle d'étude car d'une part nous disposions directement des séquences de plusieurs nanobodies dirigées contre ces deux cibles, et d'autre part les différences intrinsèques entre ces deux protéines et leur niveau d'expression différent entre les sous-types cellulaires dans deux modèles murins nous permettait d'explorer les facteurs influençant la déplétion cellulaire. Bien que des nanobodies déplétants ciblant ARTC2.2 ne présentent pas d'intérêt chez l'homme, la déplétion cellulaire des cellules exprimant P2X7 pourrait présenter un intérêt dans le cancer. Comme évoqué précédemment, P2X7 est exprimé sur de nombreux types de cellules cancéreuses. Chez l'homme, l'expression de P2X7 a notamment été mise en évidence dans le cas de cancers de la prostate, du poumon, du rein, du sein, de l'ovaire, de la vessie, du pancréas, dans le mélanome, la leucémie lymphoblastique et la leucémie lymphoïde chronique, le neuroblastome, ainsi que dans les cancers colorectaux, gastriques et osseux (Lara *et al.*, 2020). Par ailleurs, il est important de mentionner que la plupart des tumeurs expriment un variant de P2X7 non fonctionnel (nfP2X7), qui n'est pas présent sur les cellules saines. Le variant nfP2X7 conserve la fonction de canal ionique mais sa stimulation par l'ATP n'induit pas la formation du pore non sélectif et la mort cellulaire (Burnstock and Knight, 2018). Le récepteur nfP2X7 est caractérisé par l'exposition d'un épitope, E200 (correspondant à la séquence d'acides aminés en position 200 à 216), qui est normalement masqué sur P2X7 (Barden *et al.*, 2014). Ainsi le développement d'anticorps à

chaîne lourde ciblant l'épitope E200 sur nP2X7 et capables d'induire la déplétion cellulaire pourrait constituer une approche thérapeutique dans plusieurs types de cancer, limitant la survenue d'effets indésirables sur les cellules saines.

Nos modèles d'étude de la déplétion cellulaire étaient les souris C57BL/6 et BALB/c. La relevance de ces modèles d'étude, pourtant largement répandus dans la littérature, est questionnable. Il existe en effet des différences dans les acteurs moléculaires et cellulaires impliqués dans les mécanismes effecteurs des IgG chez l'homme et la souris. Chez l'homme, il existe six FcγR (FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA et FcγRIIIB) alors que quatre sont présents chez la souris (mFcγRI, mFcγRIIB, mFcγRIII et mFcγRIV). Le profil d'expression, ainsi que l'affinité des sous-classes d'IgG pour les FcγR est différente entre l'homme et la souris consanguine (Bruhns and Jönsson, 2015). Les souris présentent également une activité du complément plus faible que chez l'homme (Ong and Mattes, 1989). Comme évoqué précédemment, dans les souris consanguines le mécanisme effecteur prépondérant semble être l'ADCP, alors chez l'homme la CDC et l'ADCC sont également susceptibles de jouer un rôle important dans la déplétion induite par les anticorps thérapeutiques (Arnould *et al.*, 2006; Kennedy *et al.*, 2004).

Dans ce travail de thèse, nous n'avons pas évalué l'efficacité des constructions déplétantes dans des modèles tumoraux. Des cellules de lymphome murin EL4 exprimant P2X7, ARTC2.2 ou les deux simultanément ont été générées au laboratoire et les expériences de greffe syngénique ectopique ont été réalisées dans des souris C57BL/6 à plusieurs reprises. Malheureusement, les résultats n'étaient pas interprétables car les lignées cellulaires du laboratoire se sont avérées largement contaminées par des mycoplasmes, limitant leur croissance *in vitro* et *in vivo*. Par manque de temps, ces expériences n'ont pas pu être reproduites après que les lignées cellulaires aient été décontaminées.

Dans nos expériences, l'effet de sélectivité de la construction bispécifique obtenu avec des doses plus faibles de rAAV s'atténuait au cours du temps, en lien avec la production continue *in vivo* de la construction et l'augmentation de sa concentration plasmatique. Ainsi, bien que notre modèle basé sur les rAAV permette d'obtenir des concentrations saturantes de constructions biologiques, il est moins adapté aux cas où la concentration plasmatique doit être maîtrisée. L'injection de formes recombinantes permettrait un meilleur contrôle de la

concentration *in vivo*. Afin d'améliorer la sélectivité *in vivo* des constructions bispécifiques, nous avons également envisagé de diminuer l'affinité des monomères de nanobodies par mutagenèse dirigée de résidus arginine des régions CDR. Les mutants d'affinité (mono- et bispécifiques) ont été générés par nos partenaires allemands dans ce projet (Institute of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf). En revanche, l'évaluation de leur fixation *in vitro* sur nos modèles HEK n'a pas permis de mettre en évidence de différence avec les variants non mutés. De la même façon, *in vivo*, le niveau de déplétion observé était similaire à celui de la construction non mutée. Par ailleurs, une analyse ultérieure par Western Blot nous a permis d'identifier que le poids moléculaire de ces constructions mutées était différent de celui des constructions non mutées, suggérant des différences supplémentaires aux mutations arginine-alanine des régions CDR, limitant les possibilités de comparaison avec la construction non mutée.

Notre approche basée sur des vecteurs AAV est susceptible d'entraîner des réponses immunitaires dirigées contre les protéines de la capsid et le produit du transgène (Ronzitti *et al.*, 2020). Une des propriétés des nanobodies est leur faible immunogénicité bien qu'ils proviennent d'une espèce différente, par leur petite taille, leur stabilité limitant la formation d'agrégats protéiques et la forte homologie avec les séquences VH chez l'homme et chez la souris. Par ailleurs, dans les formats HcAb, les fragments Fc étaient murins (IgG1 ou IgG2a) limitant leur immunogénicité dans notre modèle d'étude. Se pose alors la question de l'immunogénicité des rAAV. Nos résultats suggèrent que les réponses immunitaires dirigées contre les capsides des AAV sont faibles et/ou inefficaces dans nos modèles murins, au vu de la persistance de nos constructions dim-HLE ou HcAb dans le sérum, ainsi que la durabilité des effets biologiques.

Références bibliographiques

- Abdiche, Y.N., Yeung, Y.A., Chaparro-Riggers, J., Barman, I., Strop, P., Chin, S.M., Pham, A., Bolton, G., McDonough, D., Lindquist, K., Pons, J., Rajpal, A., 2015. The neonatal Fc receptor (FcRn) binds independently to both sites of the IgG homodimer with identical affinity. *MAbs* 7, 331–343. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1008353>
- Achour, I., Cavelier, P., Tichit, M., Bouchier, C., Lafaye, P., Rougeon, F., 2008. Tetrameric and homodimeric camelid IgGs originate from the same IgH locus. *J Immunol* 181, 2001–2009. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.2001>
- Ackaert, C., Smiejkowska, N., Xavier, C., Sterckx, Y.G.J., Denies, S., Stijlemans, B., Elkrim, Y., Devoogdt, N., Caveliers, V., Lahoutte, T., Muyltermans, S., Breckpot, K., Keyaerts, M., 2021. Immunogenicity Risk Profile of Nanobodies. *Front Immunol* 12, 632687. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.632687>
- Adinolfi, E., Raffaghello, L., Giuliani, A.L., Cavazzini, L., Capece, M., Chiozzi, P., Bianchi, G., Kroemer, G., Pistoia, V., Di Virgilio, F., 2012. Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer Res* 72, 2957–2969. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1947>
- Adriouch, S., Dox, C., Welge, V., Seman, M., Koch-Nolte, F., Haag, F., 2002. Cutting Edge: A Natural P451L Mutation in the Cytoplasmic Domain Impairs the Function of the Mouse P2X7 Receptor1. *The Journal of Immunology* 169, 4108–4112. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.8.4108>
- Advani, R., Flinn, I., Popplewell, L., Forero, A., Bartlett, N.L., Ghosh, N., Kline, J., Roschewski, M., LaCase, A., Collins, G.P., Tran, T., Lynn, J., Chen, J.Y., Volkmer, J.-P., Agoram, B., Huang, J., Majeti, R., Weissman, I.L., Takimoto, C.H., Chao, M.P., Smith, S.M., 2018. CD47 Blockade by Hu5F9-G4 and Rituximab in Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* 379, 1711–1721. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1807315>
- Ahmed, A.A., Giddens, J., Pincetic, A., Lomino, J.V., Ravetch, J.V., Wang, L.-X., Bjorkman, P.J., 2014. Structural characterization of anti-inflammatory immunoglobulin G Fc proteins. *J Mol Biol* 426, 3166–3179. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.07.006>
- Alduaij, W., Ivanov, A., Honeychurch, J., Cheadle, E.J., Potluri, S., Lim, S.H., Shimada, K., Chan, C.H.T., Tutt, A., Beers, S.A., Glennie, M.J., Cragg, M.S., Illidge, T.M., 2011. Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood* 117, 4519–4529. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-296913>
- Almagro, J.C., 2004. Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires. *J Mol Recognit* 17, 132–143. <https://doi.org/10.1002/jmr.659>

- Anania, J.C., Chenoweth, A.M., Wines, B.D., Hogarth, P.M., 2019. The Human Fc γ RII (CD32) Family of Leukocyte FcR in Health and Disease. *Front Immunol* 10, 464. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00464>
- Arnold, J.N., Wormald, M.R., Sim, R.B., Rudd, P.M., Dwek, R.A., 2007. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 25, 21–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702>
- Arnould, L., Gelly, M., Penault-Llorca, F., Benoit, L., Bonnetain, F., Migeon, C., Cabaret, V., Fermeaux, V., Bertheau, P., Garnier, J., Jeannin, J.-F., Coudert, B., 2006. Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer* 94, 259–267. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602930>
- Arosa, F.A., de Jesus, O., Porto, G., Carmo, A.M., de Sousa, M., 1999. Calreticulin is expressed on the cell surface of activated human peripheral blood T lymphocytes in association with major histocompatibility complex class I molecules. *J Biol Chem* 274, 16917–16922. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16917>
- Arulkumaran, N., Unwin, R.J., Tam, F.W., 2011. A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opin Investig Drugs* 20, 897–915. <https://doi.org/10.1517/13543784.2011.578068>
- Bakalar, M.H., Joffe, A.M., Schmid, E.M., Son, S., Podolski, M., Fletcher, D.A., 2018. Size-Dependent Segregation Controls Macrophage Phagocytosis of Antibody-Opsonized Targets. *Cell* 174, 131–142.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.059>
- Balazs, A.B., Ouyang, Y., Hong, C.M., Chen, J., Nguyen, S.M., Rao, D.S., An, D.S., Baltimore, D., 2014. Vectored immunoprophylaxis protects humanized mice from mucosal HIV transmission. *Nat Med* 20, 296–300. <https://doi.org/10.1038/nm.3471>
- Bannas, P., Adriouch, S., Kahl, S., Braasch, F., Haag, F., Koch-Nolte, F., 2005. Activity and specificity of toxin-related mouse T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 depends on its association with lipid rafts. *Blood* 105, 3663–3670. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3325>
- Bannas, P., Hambach, J., Koch-Nolte, F., 2017. Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. *Front Immunol* 8, 1603. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01603>
- Barden, J.A., Yuksel, A., Pedersen, J., Danieletto, S., Delprado, W., 2014. Non-Functional P2X7: A Novel and Ubiquitous Target in Human Cancer. *J Clin Cell Immunol* 5. <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000237>
- Baum, N., Eggers, M., Koenigsdorf, J., Menzel, S., Hambach, J., Staehler, T., Fliegert, R., Kulow, F., Adam, G., Haag, F., Bannas, P., Koch-Nolte, F., 2021. Mouse CD38-Specific Heavy Chain Antibodies Inhibit CD38 GDPase Activity and Mediate

- Cytotoxicity Against Tumor Cells. *Front Immunol* 12, 703574. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.703574>
- Beers, S.A., French, R.R., Chan, H.T.C., Lim, S.H., Jarrett, T.C., Vidal, R.M., Wijayaweera, S.S., Dixon, S.V., Kim, H., Cox, K.L., Kerr, J.P., Johnston, D.A., Johnson, P.W.M., Verbeek, J.S., Glennie, M.J., Cragg, M.S., 2010. Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood* 115, 5191–5201. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-263533>
- Ben Mkaddem, S., Benhamou, M., Monteiro, R.C., 2019. Understanding Fc Receptor Involvement in Inflammatory Diseases: From Mechanisms to New Therapeutic Tools. *Front Immunol* 10, 811. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00811>
- Bertz, M., Buchner, J., Rief, M., 2013. Mechanical stability of the antibody domain CH3 homodimer in different oxidation states. *J Am Chem Soc* 135, 15085–15091. <https://doi.org/10.1021/ja405076j>
- Bindon, C.I., Hale, G., Waldmann, H., 1988. Importance of antigen specificity for complement-mediated lysis by monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 18, 1507–1514. <https://doi.org/10.1002/eji.1830181006>
- Bobkov, V., Zarca, A.M., Van Hout, A., Arimont, M., Doijen, J., Bialkowska, M., Toffoli, E., Klarenbeek, A., van der Woning, B., van der Vliet, H.J., Van Loy, T., de Haard, H., Schols, D., Heukers, R., Smit, M.J., 2018. Nanobody-Fc constructs targeting chemokine receptor CXCR4 potently inhibit signaling and CXCR4-mediated HIV-entry and induce antibody effector functions. *Biochem Pharmacol* 158, 413–424. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.10.014>
- Bond, C.J., Marsters, J.C., Sidhu, S.S., 2003. Contributions of CDR3 to V H H domain stability and the design of monobody scaffolds for naive antibody libraries. *J Mol Biol* 332, 643–655. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00967-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00967-7)
- Borges da Silva, H., Wang, H., Qian, L.J., Hogquist, K.A., Jameson, S.C., 2019. ARTC2.2/P2RX7 Signaling during Cell Isolation Distorts Function and Quantification of Tissue-Resident CD8⁺ T Cell and Invariant NKT Subsets. *J.I.* 202, 2153–2163. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801613>
- Bork, P., Holm, L., Sander, C., 1994. The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J Mol Biol* 242, 309–320. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1582>
- Brambell, F.W., 1966. The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins. *Lancet* 2, 1087–1093. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(66\)92190-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(66)92190-8)
- Brambell, F.W., Hemmings, W.A., Oakley, C.L., Porter, R.R., 1960. The relative transmission of the fractions of papain hydrolyzed homologous gamma-globulin from the uterine cavity to the foetal circulation in the rabbit. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 151, 478–482. <https://doi.org/10.1098/rspb.1960.0011>

- Brekke, O.H., Michaelsen, T.E., Sandlie, I., 1995. The structural requirements for complement activation by IgG: does it hinge on the hinge? *Immunol Today* 16, 85–90. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80094-8](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80094-8)
- Bril, V., Benatar, M., Andersen, H., Vissing, J., Brock, M., Greve, B., Kiessling, P., Woltering, F., Griffin, L., Van den Bergh, P., MG0002 Investigators, 2021. Efficacy and Safety of Rozanolixizumab in Moderate to Severe Generalized Myasthenia Gravis: A Phase 2 Randomized Control Trial. *Neurology* 96, e853–e865. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000011108>
- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D.A., Fernandez, N., Jorieux, S., Daëron, M., 2009. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113, 3716–3725. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-179754>
- Bruhns, P., Jönsson, F., 2015. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol Rev* 268, 25–51. <https://doi.org/10.1111/imr.12350>
- Burmeister, W.P., Huber, A.H., Bjorkman, P.J., 1994. Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc. *Nature* 372, 379–383. <https://doi.org/10.1038/372379a0>
- Burnstock, G., 2018. Purine and purinergic receptors. *Brain Neurosci Adv* 2, 2398212818817494. <https://doi.org/10.1177/2398212818817494>
- Burnstock, G., Knight, G.E., 2018. The potential of P2X7 receptors as a therapeutic target, including inflammation and tumour progression. *Purinergic Signal* 14, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11302-017-9593-0>
- Burton, D.R., 1985. Immunoglobulin G: functional sites. *Mol Immunol* 22, 161–206. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(85\)90151-8](https://doi.org/10.1016/0161-5890(85)90151-8)
- Burton, D.R., Woof, J.M., 1992. Human antibody effector function. *Adv Immunol* 51, 1–84. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60486-1](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60486-1)
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., Watier, H., 2002. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 99, 754–758. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.3.754>
- Chao, M.P., Jaiswal, S., Weissman-Tsukamoto, R., Alizadeh, A.A., Gentles, A.J., Volkmer, J., Weiskopf, K., Willingham, S.B., Raveh, T., Park, C.Y., Majeti, R., Weissman, I.L., 2010. Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci Transl Med* 2, 63ra94. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001375>
- Chatellier, J., Van Regenmortel, M.H., Vernet, T., Altschuh, D., 1996. Functional mapping of conserved residues located at the VL and VH domain interface of a Fab. *J Mol Biol* 264, 1–6. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0618>

- Chatenoud, L., Baudrihaye, M.F., Kreis, H., Goldstein, G., Schindler, J., Bach, J.F., 1982. Human in vivo antigenic modulation induced by the anti-T cell OKT3 monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 12, 979–982. <https://doi.org/10.1002/eji.1830121116>
- Chaudhury, C., Mehnaz, S., Robinson, J.M., Hayton, W.L., Pearl, D.K., Roopenian, D.C., Anderson, C.L., 2003. The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. *J Exp Med* 197, 315–322. <https://doi.org/10.1084/jem.20021829>
- Chiu, M.L., Goulet, D.R., Teplyakov, A., Gilliland, G.L., 2019. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies (Basel)* 8, 55. <https://doi.org/10.3390/antib8040055>
- Chothia, C., Gelfand, I., Kister, A., 1998. Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain. *J Mol Biol* 278, 457–479. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1653>
- Chothia, C., Lesk, A.M., Gherardi, E., Tomlinson, I.M., Walter, G., Marks, J.D., Llewelyn, M.B., Winter, G., 1992. Structural repertoire of the human VH segments. *J Mol Biol* 227, 799–817. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90224-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90224-8)
- Chothia, C., Novotný, J., Brucoleri, R., Karplus, M., 1985. Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *J Mol Biol* 186, 651–663. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(85\)90137-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(85)90137-8)
- Choudhuri, K., Wiseman, D., Brown, M.H., Gould, K., van der Merwe, P.A., 2005. T-cell receptor triggering is critically dependent on the dimensions of its peptide-MHC ligand. *Nature* 436, 578–582. <https://doi.org/10.1038/nature03843>
- Chu, T.H., Patz, E.F., Ackerman, M.E., 2021. Coming together at the hinges: Therapeutic prospects of IgG3. *MAbs* 13, 1882028. <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1882028>
- Cleary, K.L.S., Chan, H.T.C., James, S., Glennie, M.J., Cragg, M.S., 2017. Antibody Distance from the Cell Membrane Regulates Antibody Effector Mechanisms. *J Immunol* 198, 3999–4011. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601473>
- Clynes, R., Maizes, J.S., Guinamard, R., Ono, M., Takai, T., Ravetch, J.V., 1999. Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *J Exp Med* 189, 179–185. <https://doi.org/10.1084/jem.189.1.179>
- Cobb, B.A., 2020. The history of IgG glycosylation and where we are now. *Glycobiology* 30, 202–213. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz065>
- Collins, A.M., Watson, C.T., 2018. Immunoglobulin Light Chain Gene Rearrangements, Receptor Editing and the Development of a Self-Tolerant Antibody Repertoire. *Front Immunol* 9, 2249. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02249>

- Conrath, K., Vincke, C., Stijlemans, B., Schymkowitz, J., Decanniere, K., Wyns, L., Muyldermans, S., Loris, R., 2005. Antigen binding and solubility effects upon the veneering of a camel VHH in framework-2 to mimic a VH. *J Mol Biol* 350, 112–125. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.04.050>
- Conrath, K.E., Wernery, U., Muyldermans, S., Nguyen, V.K., 2003. Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Dev Comp Immunol* 27, 87–103. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(02\)00071-x](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(02)00071-x)
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A., 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22, 633–640. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(01\)02060-9](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(01)02060-9)
- Cortez-Retamozo, V., Lauwereys, M., Hassanzadeh Gh, G., Gobert, M., Conrath, K., Muyldermans, S., De Baetselier, P., Revets, H., 2002. Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. *Int J Cancer* 98, 456–462. <https://doi.org/10.1002/ijc.10212>
- Cragg, M.S., Morgan, S.M., Chan, H.T.C., Morgan, B.P., Filatov, A.V., Johnson, P.W.M., French, R.R., Glennie, M.J., 2003. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood* 101, 1045–1052. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1761>
- Cullen, S.P., Martin, S.J., 2008. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ* 15, 251–262. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402244>
- Dalakas, M.C., Alexopoulos, H., Spaeth, P.J., 2020. Complement in neurological disorders and emerging complement-targeted therapeutics. *Nat Rev Neurol* 16, 601–617. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0400-0>
- Dall’Acqua, W., Simon, A.L., Mulkerrin, M.G., Carter, P., 1998. Contribution of domain interface residues to the stability of antibody CH3 domain homodimers. *Biochemistry* 37, 9266–9273. <https://doi.org/10.1021/bi980270i>
- Dall’Acqua, W.F., Kiener, P.A., Wu, H., 2006. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J Biol Chem* 281, 23514–23524. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604292200>
- Damelang, T., Rogerson, S.J., Kent, S.J., Chung, A.W., 2019. Role of IgG3 in Infectious Diseases. *Trends Immunol* 40, 197–211. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.01.005>
- Dangl, J.L., Wensel, T.G., Morrison, S.L., Stryer, L., Herzenberg, L.A., Oi, V.T., 1988. Segmental flexibility and complement fixation of genetically engineered chimeric human, rabbit and mouse antibodies. *EMBO J* 7, 1989–1994. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03037.x>
- Danquah, W., Meyer-Schwesinger, C., Rissiek, B., Pinto, C., Serracant-Prat, A., Amadi, M., Iacenda, D., Knop, J.-H., Hammel, A., Bergmann, P., Schwarz, N., Assuncao, J., Rothier, W., Haag, F., Tolosa, E., Bannas, P., Boue-Grabot, E., Magnus, T., Laeremans,

- T., Stortelers, C., Koch-Nolte, F., 2016. Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Science Translational Medicine* 8, 366ra162-366ra162. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf8463>
- Dard, P., Huck, S., Fripiat, J.P., Lefranc, G., Langaney, A., Lefranc, M.P., Sanchez-Mazas, A., 1997. The IGHG3 gene shows a structural polymorphism characterized by different hinge lengths: sequence of a new 2-exon hinge gene. *Hum Genet* 99, 138–141. <https://doi.org/10.1007/s004390050328>
- Davies, J., Riechmann, L., 1994. “Camelising” human antibody fragments: NMR studies on VH domains. *FEBS Lett* 339, 285–290. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)80432-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)80432-x)
- de Haan, N., Reiding, K.R., Krištić, J., Hipgrave Ederveen, A.L., Lauc, G., Wuhrer, M., 2017. The N-Glycosylation of Mouse Immunoglobulin G (IgG)-Fragment Crystallizable Differs Between IgG Subclasses and Strains. *Front Immunol* 8, 608. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00608>
- De Marchi, E., Orioli, E., Pegoraro, A., Sangaletti, S., Portararo, P., Curti, A., Colombo, M.P., Di Virgilio, F., Adinolfi, E., 2019. The P2X7 receptor modulates immune cells infiltration, ectonucleotidases expression and extracellular ATP levels in the tumor microenvironment. *Oncogene* 38, 3636–3650. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0684-y>
- de Taeye, S.W., Bentlage, A.E.H., Mebius, M.M., Meesters, J.I., Lissenberg-Thunnissen, S., Falck, D., Sénard, T., Salehi, N., Wuhrer, M., Schuurman, J., Labrijn, A.F., Rispen, T., Vidarsson, G., 2020. FcγR Binding and ADCC Activity of Human IgG Allotypes. *Front Immunol* 11, 740. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00740>
- Debie, P., Lafont, C., Defrise, M., Hansen, I., van Willigen, D.M., van Leeuwen, F.W.B., Gijssbers, R., D’Huyvetter, M., Devoogdt, N., Lahoutte, T., Mollard, P., Hernot, S., 2020. Size and affinity kinetics of nanobodies influence targeting and penetration of solid tumours. *J Control Release* 317, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.11.014>
- Demeules, M., Scarpitta, A., Abad, C., Gondé, H., Hardet, R., Pinto-Espinoza, C., Eichhoff, A.M., Schäfer, W., Haag, F., Koch-Nolte, F., Adriouch, S., 2020. Evaluation of P2X7 Receptor Function in Tumor Contexts Using rAAV Vector and Nanobodies (AAVnano). *Front. Oncol.* 10, 1699. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01699>
- Demeules, M., Scarpitta, A., Hardet, R., Gondé, H., Abad, C., Blandin, M., Menzel, S., Duan, Y., Rissiek, B., Magnus, T., Mann, A.M., Koch-Nolte, F., Adriouch, S., 2022. Evaluation of nanobody-based biologics targeting purinergic checkpoints in tumor models in vivo. *Front Immunol* 13, 1012534. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1012534>
- Deveuve, Q., Gouilleux-Gruart, V., Thibault, G., Lajoie, L., 2019. [The hinge region of therapeutic antibodies: major importance of a short sequence]. *Med Sci (Paris)* 35, 1098–1105. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019218>

- Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A.C., Giuliani, A.L., Falzoni, S., 2017. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* 47, 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.020>
- Di Virgilio, F., Sarti, A.C., Grassi, F., 2018. Modulation of innate and adaptive immunity by P2X ion channels. *Curr Opin Immunol* 52, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.03.026>
- Diebold, C.A., Beurskens, F.J., de Jong, R.N., Koning, R.I., Strumane, K., Lindorfer, M.A., Voorhorst, M., Ugurlar, D., Rosati, S., Heck, A.J.R., van de Winkel, J.G.J., Wilson, I.A., Koster, A.J., Taylor, R.P., Saphire, E.O., Burton, D.R., Schuurman, J., Gros, P., Parren, P.W.H.I., 2014. Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science* 343, 1260–1263. <https://doi.org/10.1126/science.1248943>
- Douguet, L., Janho Dit Hreich, S., Benzaquen, J., Seguin, L., Juhel, T., Dezitter, X., Duranton, C., Ryffel, B., Kanellopoulos, J., Delarasse, C., Renault, N., Furman, C., Homerin, G., Féral, C., Cherfils-Vicini, J., Millet, R., Adriouch, S., Ghinet, A., Hofman, P., Vouret-Craviari, V., 2021. A small-molecule P2RX7 activator promotes anti-tumor immune responses and sensitizes lung tumor to immunotherapy. *Nat Commun* 12, 653. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20912-2>
- Dunlap, T., Cao, Y., 2022. Physiological Considerations for Modeling in vivo Antibody-Target Interactions. *Front Pharmacol* 13, 856961. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.856961>
- Dwek, R.A., Lellouch, A.C., Wormald, M.R., 1995. Glycobiology: “the function of sugar in the IgG molecule.” *J Anat* 187 (Pt 2), 279–292.
- Edelman, G.M., 1959. DISSOCIATION OF γ -GLOBULIN. *J. Am. Chem. Soc.* 81, 3155–3156. <https://doi.org/10.1021/ja01521a071>
- Edelman, G.M., Cunningham, B.A., Gall, W.E., Gottlieb, P.D., Rutishauser, U., Waxdal, M.J., 1969. The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63, 78–85. <https://doi.org/10.1073/pnas.63.1.78>
- Els Conrath, K., Lauwereys, M., Wyns, L., Muyldermans, S., 2001. Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *J Biol Chem* 276, 7346–7350. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007734200>
- English, H., Hong, J., Ho, M., 2020. Ancient species offers contemporary therapeutics: an update on shark VNAR single domain antibody sequences, phage libraries and potential clinical applications. *Antib Ther* 3, 1–9. <https://doi.org/10.1093/abt/tbaa001>
- Feige, M.J., Hendershot, L.M., Buchner, J., 2010. How antibodies fold. *Trends Biochem Sci* 35, 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.11.005>
- Feng, M., Jiang, W., Kim, B.Y.S., Zhang, C.C., Fu, Y.-X., Weissman, I.L., 2019. Phagocytosis checkpoints as new targets for cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 19, 568–586. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0183-z>

- Ferrara, C., Stuart, F., Sondermann, P., Brünker, P., Umaña, P., 2006. The carbohydrate at Fcγ₃ Asn-162. An element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms. *J Biol Chem* 281, 5032–5036. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510171200>
- Firan, M., Bawdon, R., Radu, C., Ober, R.J., Eaken, D., Antohe, F., Ghetie, V., Ward, E.S., 2001. The MHC class I-related receptor, FcRn, plays an essential role in the maternofetal transfer of gamma-globulin in humans. *Int Immunol* 13, 993–1002. <https://doi.org/10.1093/intimm/13.8.993>
- Foote, J., Milstein, C., 1991. Kinetic maturation of an immune response. *Nature* 352, 530–532. <https://doi.org/10.1038/352530a0>
- Freeman, S.A., Vega, A., Riedl, M., Collins, R.F., Ostrowski, P.P., Woods, E.C., Bertozzi, C.R., Tammi, M.I., Lidke, D.S., Johnson, P., Mayor, S., Jaqaman, K., Grinstein, S., 2018. Transmembrane Pickets Connect Cyto- and Pericellular Skeletons Forming Barriers to Receptor Engagement. *Cell* 172, 305–317.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.023>
- Gaboriaud, C., Juanhuix, J., Gruez, A., Lacroix, M., Darnault, C., Pignol, D., Verger, D., Fontecilla-Camps, J.C., Arlaud, G.J., 2003. The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties. *J Biol Chem* 278, 46974–46982. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307764200>
- Gauttier, V., Pengam, S., Durand, J., Biteau, K., Mary, C., Morello, A., Néel, M., Porto, G., Teppaz, G., Thepenier, V., Danger, R., Vince, N., Wilhelm, E., Girault, I., Abes, R., Ruiz, C., Trilleaud, C., Ralph, K., Trombetta, E.S., Garcia, A., Vignard, V., Martinet, B., Glémain, A., Bruneau, S., Haspot, F., Dehmani, S., Duplouye, P., Miyasaka, M., Labarrière, N., Laplaud, D., Le Bas-Bernardet, S., Blanquart, C., Catros, V., Gouraud, P.-A., Archambeaud, I., Aublé, H., Metairie, S., Mosnier, J.-F., Costantini, D., Blanco, G., Conchon, S., Vanhove, B., Poirier, N., 2020. Selective SIRPα blockade reverses tumor T cell exclusion and overcomes cancer immunotherapy resistance. *J Clin Invest* 130, 6109–6123. <https://doi.org/10.1172/JCI135528>
- Georgiev, H., Ravens, I., Papadogianni, G., Malissen, B., Förster, R., Bernhardt, G., 2018. Blocking the ART2.2/P2X7-system is essential to avoid a detrimental bias in functional CD4 T cell studies. *Eur. J. Immunol.* 48, 1078–1081. <https://doi.org/10.1002/eji.201747420>
- Ghetie, V., Popov, S., Borvak, J., Radu, C., Matesoi, D., Medesan, C., Ober, R.J., Ward, E.S., 1997. Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. *Nat Biotechnol* 15, 637–640. <https://doi.org/10.1038/nbt0797-637>
- Golay, J., Lazzari, M., Facchinetti, V., Bernasconi, S., Borleri, G., Barbui, T., Rambaldi, A., Inrona, M., 2001. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood* 98, 3383–3389. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.12.3383>

- Golgher, D., Jones, E., Powrie, F., Elliott, T., Gallimore, A., 2002. Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *Eur J Immunol* 32, 3267–3275. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200211\)32:11<3267::AID-IMMU3267>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200211)32:11<3267::AID-IMMU3267>3.0.CO;2-1)
- Gondé, H., Demeules, M., Harget, R., Scarpitta, A., Junge, M., Pinto-Espinoza, C., Varin, R., Koch-Nolte, F., Boyer, O., Adriouch, S., 2021. A Methodological Approach Using rAAV Vectors Encoding Nanobody-Based Biologics to Evaluate ARTC2.2 and P2X7 In Vivo. *Front Immunol* 12, 704408. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.704408>
- Gonnord, P., Delarasse, C., Auger, R., Benihoud, K., Prigent, M., Cuif, M.H., Lamaze, C., Kanellopoulos, J.M., 2009. Palmitoylation of the P2X7 receptor, an ATP-gated channel, controls its expression and association with lipid rafts. *FASEB J* 23, 795–805. <https://doi.org/10.1096/fj.08-114637>
- Graziano, R.F., Looney, R.J., Shen, L., Fanger, M.W., 1989. Fc gamma R-mediated killing by eosinophils. *J Immunol* 142, 230–235.
- Haag, F., Adriouch, S., Braß, A., Jung, C., Möller, S., Scheuplein, F., Bannas, P., Seman, M., Koch-Nolte, F., 2007. Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. *Purinergic Signalling* 3, 71–81. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9038-7>
- Haag, F., Koch-Nolte, F., Kühn, M., Lorenzen, S., Thiele, H.G., 1994. Premature stop codons inactivate the RT6 genes of the human and chimpanzee species. *J Mol Biol* 243, 537–546. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1680>
- Hamaguchi, Y., Xiu, Y., Komura, K., Nimmerjahn, F., Tedder, T.F., 2006. Antibody isotype-specific engagement of Fcγ receptors regulates B lymphocyte depletion during CD20 immunotherapy. *J Exp Med* 203, 743–753. <https://doi.org/10.1084/jem.20052283>
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., Hamers, R., 1993. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446–448. <https://doi.org/10.1038/363446a0>
- Hao, S., Xu, S., Li, L., Li, Y., Zhao, M., Chen, J., Zhu, S., Xie, Y., Jiang, H., Zhu, J., Wu, M., 2022. Tumour inhibitory activity on pancreatic cancer by bispecific nanobody targeting PD-L1 and CXCR4. *BMC Cancer* 22, 1092. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-10165-7>
- Harms, B.D., Kearns, J.D., Iadevaia, S., Lugovskoy, A.A., 2014. Understanding the role of cross-arm binding efficiency in the activity of monoclonal and multispecific therapeutic antibodies. *Methods* 65, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.07.017>
- Harms, B.D., Kearns, J.D., Su, S.V., Kohli, N., Nielsen, U.B., Schoeberl, B., 2012. Optimizing properties of antireceptor antibodies using kinetic computational models and experiments. *Methods Enzymol* 502, 67–87. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416039-2.00004-5>

- Hieter, P.A., Korsmeyer, S.J., Waldmann, T.A., Leder, P., 1981. Human immunoglobulin kappa light-chain genes are deleted or rearranged in lambda-producing B cells. *Nature* 290, 368–372. <https://doi.org/10.1038/290368a0>
- Hofman, P., Cherfils-Vicini, J., Bazin, M., Ilie, M., Juhel, T., Hébuterne, X., Gilson, E., Schmid-Alliana, A., Boyer, O., Adriouch, S., Vouret-Craviari, V., 2015. Genetic and pharmacological inactivation of the purinergic P2RX7 receptor dampens inflammation but increases tumor incidence in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cancer Res* 75, 835–845. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1778>
- Honjo, K., Kubagawa, Y., Jones, D.M., Dizon, B., Zhu, Z., Ohno, H., Izui, S., Kearney, J.F., Kubagawa, H., 2012. Altered Ig levels and antibody responses in mice deficient for the Fc receptor for IgM (Fc μ R). *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 15882–15887. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206567109>
- Howard, J.F., Bril, V., Vu, T., Karam, C., Peric, S., Margania, T., Murai, H., Bilinska, M., Shakarishvili, R., Smilowski, M., Guglietta, A., Ulrichs, P., Vangeneugden, T., Utsugisawa, K., Verschuuren, J., Mantegazza, R., ADAPT Investigator Study Group, 2021. Safety, efficacy, and tolerability of efgartigimod in patients with generalised myasthenia gravis (ADAPT): a multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol* 20, 526–536. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00159-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00159-9)
- Hubert, S., Rissiek, B., Klages, K., Huehn, J., Sparwasser, T., Haag, F., Koch-Nolte, F., Boyer, O., Seman, M., Adriouch, S., 2010. Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2–P2X7 pathway. *Journal of Experimental Medicine* 207, 2561–2568. <https://doi.org/10.1084/jem.20091154>
- Huet, H.A., Growney, J.D., Johnson, J.A., Li, J., Bilic, S., Ostrom, L., Zafari, M., Kowal, C., Yang, G., Royo, A., Jensen, M., Dombrecht, B., Meerschaert, K.R.A., Kolkman, J.A., Cromie, K.D., Mosher, R., Gao, H., Schuller, A., Isaacs, R., Sellers, W.R., Ettenberg, S.A., 2014. Multivalent nanobodies targeting death receptor 5 elicit superior tumor cell killing through efficient caspase induction. *MAbs* 6, 1560–1570. <https://doi.org/10.4161/19420862.2014.975099>
- Ingram, J.R., Blomberg, O.S., Sockolosky, J.T., Ali, L., Schmidt, F.I., Pishesha, N., Espinosa, C., Dougan, S.K., Garcia, K.C., Ploegh, H.L., Dougan, M., 2017. Localized CD47 blockade enhances immunotherapy for murine melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 10184–10189. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710776114>
- Inoue, K., Tsuda, M., 2021. Nociceptive signaling mediated by P2X3, P2X4 and P2X7 receptors. *Biochem Pharmacol* 187, 114309. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114309>
- Jefferis, R., Lefranc, M.-P., 2009. Human immunoglobulin allotypes: possible implications for immunogenicity. *MAbs* 1, 332–338. <https://doi.org/10.4161/mabs.1.4.9122>
- Jiang, Z., Sun, H., Yu, J., Tian, W., Song, Y., 2021. Targeting CD47 for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol* 14, 180. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01197-w>

- Jones, B.G., Penkert, R.R., Surman, S.L., Sealy, R.E., Pelletier, S., Berns, H., Hurwitz, J.L., 2019. Background check: Profound differences in serum antibody isotypes among C57BL/6 mouse substrains discourage substrain interchanges in immunology experiments. *Immunol Lett* 216, 9–11. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.05.011>
- Jouvin-Marche, E., Morgado, M.G., Leguern, C., Voegtle, D., Bonhomme, F., Cazenave, P.A., 1989. The mouse Igh-1a and Igh-1b H chain constant regions are derived from two distinct isotypic genes. *Immunogenetics* 29, 92–97. <https://doi.org/10.1007/BF00395856>
- Junker, F., Gordon, J., Qureshi, O., 2020. Fc Gamma Receptors and Their Role in Antigen Uptake, Presentation, and T Cell Activation. *Front Immunol* 11, 1393. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01393>
- Junttila, T.T., Parsons, K., Olsson, C., Lu, Y., Xin, Y., Theriault, J., Crocker, L., Pabonan, O., Baginski, T., Meng, G., Totpal, K., Kelley, R.F., Sliwkowski, M.X., 2010. Superior in vivo efficacy of afucosylated trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. *Cancer Res* 70, 4481–4489. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3704>
- Kabat, E., 1991. Sequences of proteins of immunological interest - 5th édition. US Department of Health and Human Services, NIH publication n° 91-3242, pp 662,680,689.
- Kaczmarek-Hajek, K., Zhang, J., Kopp, R., Grosche, A., Rissiek, B., Saul, A., Bruzzone, S., Engel, T., Jooss, T., Krautloher, A., Schuster, S., Magnus, T., Stadelmann, C., Sirko, S., Koch-Nolte, F., Eulenburg, V., Nicke, A., 2018. Re-evaluation of neuronal P2X7 expression using novel mouse models and a P2X7-specific nanobody. *eLife* 7, e36217. <https://doi.org/10.7554/eLife.36217>
- Karasawa, A., Kawate, T., 2016. Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *Elife* 5, e22153. <https://doi.org/10.7554/eLife.22153>
- Kasuya, K., Shimazu, M., Suzuki, M., Itoi, T., Aoki, T., Tsuchida, A., 2010. Bispecific anti-HER2 and CD16 single-chain antibody production prolongs the use of stem cell-like cell transplantation against HER2-overexpressing cancer. *Int J Mol Med* 25, 209–215.
- Kelley, S.M., Ravichandran, K.S., 2021. Putting the brakes on phagocytosis: “don’t-eat-me” signaling in physiology and disease. *EMBO Rep* 22, e52564. <https://doi.org/10.15252/embr.202152564>
- Kennedy, A.D., Beum, P.V., Solga, M.D., DiLillo, D.J., Lindorfer, M.A., Hess, C.E., Densmore, J.J., Williams, M.E., Taylor, R.P., 2004. Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol* 172, 3280–3288. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.3280>
- Kibria, M.G., Akazawa-Ogawa, Y., Rahman, N., Hagihara, Y., Kuroda, Y., 2020. The immunogenicity of an anti-EGFR single domain antibody (VHH) is enhanced by misfolded amorphous aggregation but not by heat-induced aggregation. *Eur J Pharm Biopharm* 152, 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.05.006>

- Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A., Kuby, J., 2006. Kuby immunology., 6th ed. ed. New York : W.H. Freeman, c2007, United States.
- Klarenbeek, A., El Mazouari, K., Desmyter, A., Blanchetot, C., Hultberg, A., de Jonge, N., Roovers, R.C., Cambillau, C., Spinelli, S., Del-Favero, J., Verrips, T., de Haard, H.J., Achour, I., 2015. Camelid Ig V genes reveal significant human homology not seen in therapeutic target genes, providing for a powerful therapeutic antibody platform. *MAbs* 7, 693–706. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1046648>
- Klein-Schneegans, A.S., Kuntz, L., Fonteneau, P., Loor, F., 1989. Serum concentrations of IgM, IgG1, IgG2b, IgG3 and IgA in C57BL/6 mice and their congenics at the *lpr* (lymphoproliferation) locus. *J Autoimmun* 2, 869–875. [https://doi.org/10.1016/0896-8411\(89\)90013-9](https://doi.org/10.1016/0896-8411(89)90013-9)
- Koch-Nolte, F., Eichhoff, A., Pinto-Espinoza, C., Schwarz, N., Schäfer, T., Menzel, S., Haag, F., Demeules, M., Gondé, H., Adriouch, S., 2019. Novel biologics targeting the P2X7 ion channel. *Current Opinion in Pharmacology* 47, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.03.001>
- Koch-Nolte, F., Reyelt, J., Schößow, B., Schwarz, N., Scheuplein, F., Rothenburg, S., Haag, F., Alzogaray, V., Cauerhff, A., Goldbaum, F.A., 2007. Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 *in vivo*. *FASEB j.* 21, 3490–3498. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8661com>
- Koene, H.R., Kleijer, M., Algra, J., Roos, D., von dem Borne, A.E., de Haas, M., 1997. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* 90, 1109–1114.
- Kolev, M., Le Friec, G., Kemper, C., 2014. Complement--tapping into new sites and effector systems. *Nat Rev Immunol* 14, 811–820. <https://doi.org/10.1038/nri3761>
- Krapp, S., Mimura, Y., Jefferis, R., Huber, R., Sondermann, P., 2003. Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *J Mol Biol* 325, 979–989. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)01250-0](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)01250-0)
- Krzewski, K., Coligan, J.E., 2012. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Front Immunol* 3, 335. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00335>
- Lakbub, J.C., Clark, D.F., Shah, I.S., Zhu, Z., Go, E.P., Tolbert, T.J., Desaire, H., 2016. Disulfide Bond Characterization of Endogenous IgG3 Monoclonal Antibodies Using LC-MS: An Investigation of IgG3 Disulfide-mediated Isoforms. *Anal Methods* 8, 6046–6055. <https://doi.org/10.1039/C6AY01248E>
- Lanier, L.L., Yu, G., Phillips, J.H., 1991. Analysis of Fc gamma RIII (CD16) membrane expression and association with CD3 zeta and Fc epsilon RI-gamma by site-directed mutation. *J Immunol* 146, 1571–1576.

- Lara, R., Adinolfi, E., Harwood, C.A., Philpott, M., Barden, J.A., Di Virgilio, F., McNulty, S., 2020. P2X7 in Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutics. *Front Pharmacol* 11, 793. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00793>
- Lauwereys, M., Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Kinne, J., Hölzer, W., De Genst, E., Wyns, L., Muyldermans, S., 1998. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J* 17, 3512–3520. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.13.3512>
- Lefranc, M.-P., Lefranc, G., 2012. Human Gm, Km, and Am allotypes and their molecular characterization: a remarkable demonstration of polymorphism. *Methods Mol Biol* 882, 635–680. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-842-9_34
- Li, C., Samulski, R.J., 2020. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 21, 255–272. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0205-4>
- Liu, H., Zhong, S., Chumsae, C., Radziejewski, C., Hsieh, C.-M., 2011. Effect of the light chain C-terminal serine residue on disulfide bond susceptibility of human immunoglobulin G1 λ . *Anal Biochem* 408, 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.09.025>
- Liu, X., Pu, Y., Cron, K., Deng, L., Kline, J., Frazier, W.A., Xu, H., Peng, H., Fu, Y.-X., Xu, M.M., 2015. CD47 blockade triggers T cell-mediated destruction of immunogenic tumors. *Nat Med* 21, 1209–1215. <https://doi.org/10.1038/nm.3931>
- Liu, Y., Fortmann, S.D., Shen, J., Wielechowski, E., Tretiakova, A., Yoo, S., Kozarsky, K., Wang, J., Wilson, J.M., Campochiaro, P.A., 2018. AAV8-antiVEGFfab Ocular Gene Transfer for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Mol Ther* 26, 542–549. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.12.002>
- Liu, Y.D., Wang, T., Chou, R., Chen, L., Kannan, G., Stevenson, R., Goetze, A.M., Jiang, X.G., Huang, G., Dillon, T.M., Flynn, G.C., 2013. IgG2 disulfide isoform conversion kinetics. *Mol Immunol* 54, 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.12.005>
- Lundahl, M.L.E., Fogli, S., Colavita, P.E., Scanlan, E.M., 2021. Aggregation of protein therapeutics enhances their immunogenicity: causes and mitigation strategies. *RSC Chem Biol* 2, 1004–1020. <https://doi.org/10.1039/d1cb00067e>
- Majeti, R., Chao, M.P., Alizadeh, A.A., Pang, W.W., Jaiswal, S., Gibbs, K.D., van Rooijen, N., Weissman, I.L., 2009. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 138, 286–299. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.045>
- Mancardi, D., Daëron, M., 2014. Fc Receptors in Immune Responses. Reference Module in Biomedical Sciences B978-0-12-801238-3.00119-7. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00119-7>
- Martin, R.M., Brady, J.L., Lew, A.M., 1998. The need for IgG2c specific antiserum when isotyping antibodies from C57BL/6 and NOD mice. *J Immunol Methods* 212, 187–192. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(98\)00015-5](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(98)00015-5)

- Martin, W.L., West, A.P., Gan, L., Bjorkman, P.J., 2001. Crystal structure at 2.8 Å of an FcRn/heterodimeric Fc complex: mechanism of pH-dependent binding. *Mol Cell* 7, 867–877. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00230-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00230-1)
- Martinez-Navio, J.M., Fuchs, S.P., Mendes, D.E., Rakasz, E.G., Gao, G., Lifson, J.D., Desrosiers, R.C., 2020. Long-Term Delivery of an Anti-SIV Monoclonal Antibody With AAV. *Front Immunol* 11, 449. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00449>
- Masin, M., Young, C., Lim, K., Barnes, S.J., Xu, X.J., Marschall, V., Brutkowski, W., Mooney, E.R., Gorecki, D.C., Murrell-Lagnado, R., 2012. Expression, assembly and function of novel C-terminal truncated variants of the mouse P2X7 receptor: re-evaluation of P2X7 knockouts. *Br J Pharmacol* 165, 978–993. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01624.x>
- Matute, C., Torre, I., Pérez-Cerdá, F., Pérez-Samartín, A., Alberdi, E., Etxebarria, E., Arranz, A.M., Ravid, R., Rodríguez-Antigüedad, A., Sánchez-Gómez, M., Domercq, M., 2007. P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 27, 9525–9533. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0579-07.2007>
- Mazor, Y., Yang, C., Borrok, M.J., Ayriss, J., Aherne, K., Wu, H., Dall’Acqua, W.F., 2016. Enhancement of Immune Effector Functions by Modulating IgG’s Intrinsic Affinity for Target Antigen. *PloS one* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157788>
- Mendoza, M.N., Jian, M., King, M.T., Brooks, C.L., 2020. Role of a noncanonical disulfide bond in the stability, affinity, and flexibility of a VHH specific for the *Listeria* virulence factor InlB. *Protein Sci* 29, 1004–1017. <https://doi.org/10.1002/pro.3831>
- Merchant, A.M., Zhu, Z., Yuan, J.Q., Goddard, A., Adams, C.W., Presta, L.G., Carter, P., 1998. An efficient route to human bispecific IgG. *Nat Biotechnol* 16, 677–681. <https://doi.org/10.1038/nbt0798-677>
- Meyer, S., Evers, M., Jansen, J.H.M., Buijs, J., Broek, B., Reitsma, S.E., Moerer, P., Amini, M., Kretschmer, A., Ten Broeke, T., den Hartog, M.T., Rijke, M., Klein, C., Valerius, T., Boross, P., Leusen, J.H.W., 2018. New insights in Type I and II CD20 antibody mechanisms-of-action with a panel of novel CD20 antibodies. *Br J Haematol* 180, 808–820. <https://doi.org/10.1111/bjh.15132>
- Michaelsen, T.E., Garred, P., Aase, A., 1991. Human IgG subclass pattern of inducing complement-mediated cytolysis depends on antigen concentration and to a lesser extent on epitope patchiness, antibody affinity and complement concentration. *Eur J Immunol* 21, 11–16. <https://doi.org/10.1002/eji.1830210103>
- Montaño, R.F., Morrison, S.L., 2002. Influence of the isotype of the light chain on the properties of IgG. *J Immunol* 168, 224–231. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.1.224>
- Moody, P.R., Sayers, E.J., Magnusson, J.P., Alexander, C., Borri, P., Watson, P., Jones, A.T., 2015. Receptor Crosslinking: A General Method to Trigger Internalization and

- Lysosomal Targeting of Therapeutic Receptor:Ligand Complexes. *Mol Ther* 23, 1888–1898. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.178>
- Morgado, M.G., Cam, P., Gris-Liebe, C., Cazenave, P.A., Jouvin-Marche, E., 1989. Further evidence that BALB/c and C57BL/6 gamma 2a genes originate from two distinct isotypes. *EMBO J* 8, 3245–3251. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08484.x>
- Moritz, B., Stracke, J.O., 2017. Assessment of disulfide and hinge modifications in monoclonal antibodies. *Electrophoresis* 38, 769–785. <https://doi.org/10.1002/elps.201600425>
- Murin, C.D., 2020. Considerations of Antibody Geometric Constraints on NK Cell Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity. *Front Immunol* 11, 1635. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01635>
- Muyldermans, S., 2021. A guide to: generation and design of nanobodies. *FEBS J* 288, 2084–2102. <https://doi.org/10.1111/febs.15515>
- Muyldermans, S., 2013. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem* 82, 775–797. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>
- Naso, M.F., Tomkowicz, B., Perry, W.L., Strohl, W.R., 2017. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* 31, 317–334. <https://doi.org/10.1007/s40259-017-0234-5>
- Natarajan, K., Mage, M.G., Margulies, D.H., 2015. Immunoglobulin Superfamily, in: *ELS*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000926.pub2>
- Natsume, A., In, M., Takamura, H., Nakagawa, T., Shimizu, Y., Kitajima, K., Wakitani, M., Ohta, S., Satoh, M., Shitara, K., Niwa, R., 2008. Engineered antibodies of IgG1/IgG3 mixed isotype with enhanced cytotoxic activities. *Cancer Res* 68, 3863–3872. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6297>
- Neuberger, M.S., Rajewsky, K., 1981. Activation of mouse complement by monoclonal mouse antibodies. *Eur J Immunol* 11, 1012–1016. <https://doi.org/10.1002/eji.1830111212>
- Nguyen, V.K., Hamers, R., Wyns, L., Muyldermans, S., 2000. Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J* 19, 921–930. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.5.921>
- Nguyen, V.K., Hamers, R., Wyns, L., Muyldermans, S., 1999. Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C(H)1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies. *Mol Immunol* 36, 515–524. [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(99\)00067-x](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(99)00067-x)
- Nicke, A., Kuan, Y.-H., Masin, M., Rettinger, J., Marquez-Klaka, B., Bender, O., Górecki, D.C., Murrell-Lagnado, R.D., Soto, F., 2009. A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. *J Biol Chem* 284, 25813–25822. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.033134>

- Niederfellner, G., Lammens, A., Mundigl, O., Georges, G.J., Schaefer, W., Schwaiger, M., Franke, A., Wiechmann, K., Jenewein, S., Sloodstra, J.W., Timmerman, P., Brännström, A., Lindstrom, F., Mössner, E., Umana, P., Hopfner, K.-P., Klein, C., 2011. Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. *Blood* 118, 358–367. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-305847>
- Nimmerjahn, F., Bruhns, P., Horiuchi, K., Ravetch, J.V., 2005. FcγRIIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* 23, 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.05.010>
- Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., 2007. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol* 96, 179–204. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(07\)96005-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(07)96005-8)
- Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., 2006. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* 24, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.11.010>
- Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., 2005. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 310, 1510–1512. <https://doi.org/10.1126/science.1118948>
- Niwa, R., Sakurada, M., Kobayashi, Y., Uehara, A., Matsushima, K., Ueda, R., Nakamura, K., Shitara, K., 2005. Enhanced natural killer cell binding and activation by low-fucose IgG1 antibody results in potent antibody-dependent cellular cytotoxicity induction at lower antigen density. *Clin Cancer Res* 11, 2327–2336. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2263>
- Ober, R.J., Martinez, C., Vaccaro, C., Zhou, J., Ward, E.S., 2004. Visualizing the site and dynamics of IgG salvage by the MHC class I-related receptor, FcRn. *J Immunol* 172, 2021–2029. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.4.2021>
- Okayama, Y., Kirshenbaum, A.S., Metcalfe, D.D., 2000. Expression of a functional high-affinity IgG receptor, Fc γRI, on human mast cells: Up-regulation by IFN-γ. *J Immunol* 164, 4332–4339. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.8.4332>
- Okerblom, J., Varki, A., 2017. Biochemical, Cellular, Physiological, and Pathological Consequences of Human Loss of N-Glycolylneuraminic Acid. *ChemBiochem* 18, 1155–1171. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700077>
- Ong, G.L., Mattes, M.J., 1989. Mouse strains with typical mammalian levels of complement activity. *J Immunol Methods* 125, 147–158. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90088-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90088-4)
- Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., Nakayama, E., 1999. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 59, 3128–3133.

- Oostindie, S.C., Lazar, G.A., Schuurman, J., Parren, P.W.H.I., 2022. Avidity in antibody effector functions and biotherapeutic drug design. *Nat Rev Drug Discov* 21, 715–735. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00501-8>
- Opaliński, Ł., Szymczyk, J., Szczepara, M., Kucińska, M., Krowarsch, D., Zakrzewska, M., Otlewski, J., 2018. High Affinity Promotes Internalization of Engineered Antibodies Targeting FGFR1. *Int J Mol Sci* 19, 1435. <https://doi.org/10.3390/ijms19051435>
- Oyen, D., Srinivasan, V., Steyaert, J., Barlow, J.N., 2011. Constraining enzyme conformational change by an antibody leads to hyperbolic inhibition. *J Mol Biol* 407, 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.01.017>
- Padlan, E.A., Cohen, G.H., Davies, D.R., 1986. Antibody Fab assembly: the interface residues between CH1 and CL. *Mol Immunol* 23, 951–960. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(86\)90125-2](https://doi.org/10.1016/0161-5890(86)90125-2)
- Petersen, J.G., Dorrington, K.J., 1974. An in vitro system for studying the kinetics of interchain disulfide bond formation in immunoglobulin G. *J Biol Chem* 249, 5633–5641.
- Peyvandi, F., Scully, M., Kremer Hovinga, J.A., Cataland, S., Knöbl, P., Wu, H., Artoni, A., Westwood, J.-P., Mansouri Taleghani, M., Jilma, B., Callewaert, F., Ulrichs, H., Duby, C., Tersago, D., TITAN Investigators, 2016. Caplacizumab for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N Engl J Med* 374, 511–522. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1505533>
- Pike, L.J., 2006. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* 47, 1597–1598. <https://doi.org/10.1194/jlr.E600002-JLR200>
- Porter, R.R., 1959. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J* 73, 119–126. <https://doi.org/10.1042/bj0730119>
- Powell, M.S., Barnes, N.C., Bradford, T.M., Musgrave, I.F., Wines, B.D., Cambier, J.C., Hogarth, P.M., 2006. Alteration of the Fc γ RIIa dimer interface affects receptor signaling but not ligand binding. *J Immunol* 176, 7489–7494. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.12.7489>
- Priddy, F.H., Lewis, D.J.M., Gelderblom, H.C., Hassanin, H., Streatfield, C., LaBranche, C., Hare, J., Cox, J.H., Dally, L., Bendel, D., Montefiori, D., Sayeed, E., Ackland, J., Gilmour, J., Schnepf, B.C., Wright, J.F., Johnson, P., 2019. Adeno-associated virus vectored immunoprophylaxis to prevent HIV in healthy adults: a phase 1 randomised controlled trial. *Lancet HIV* 6, e230–e239. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(19\)30003-7](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(19)30003-7)
- Pyzik, M., Rath, T., Lencer, W.I., Baker, K., Blumberg, R.S., 2015. FcRn: The Architect Behind the Immune and Nonimmune Functions of IgG and Albumin. *J Immunol* 194, 4595–4603. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403014>

- Qu, T., Li, B., Wang, Y., 2022. Targeting CD47/SIRP α as a therapeutic strategy, where we are and where we are headed. *Biomark Res* 10, 20. <https://doi.org/10.1186/s40364-022-00373-5>
- Quast, I., Keller, C.W., Maurer, M.A., Giddens, J.P., Tackenberg, B., Wang, L.-X., Münz, C., Nimmerjahn, F., Dalakas, M.C., Lünemann, J.D., 2015. Sialylation of IgG Fc domain impairs complement-dependent cytotoxicity. *J Clin Invest* 125, 4160–4170. <https://doi.org/10.1172/JCI82695>
- Rabinovitch, M., 1995. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* 5, 85–87. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(00\)88955-2](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(00)88955-2)
- Rayner, L.E., Hui, G.K., Gor, J., Heenan, R.K., Dalby, P.A., Perkins, S.J., 2015. The solution structures of two human IgG1 antibodies show conformational stability and accommodate their C1q and Fc γ R ligands. *J Biol Chem* 290, 8420–8438. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.631002>
- Reily, C., Stewart, T.J., Renfrow, M.B., Novak, J., 2019. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol* 15, 346–366. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0129-4>
- Reinhold, M.I., Lindberg, F.P., Plas, D., Reynolds, S., Peters, M.G., Brown, E.J., 1995. In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). *J Cell Sci* 108 (Pt 11), 3419–3425. <https://doi.org/10.1242/jcs.108.11.3419>
- Repp, R., Valerius, T., Sendler, A., Gramatzki, M., Iro, H., Kalden, J.R., Platzer, E., 1991. Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 78, 885–889.
- Richards, J.O., Karki, S., Lazar, G.A., Chen, H., Dang, W., Desjarlais, J.R., 2008. Optimization of antibody binding to Fc γ RIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther* 7, 2517–2527. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0201>
- Ridgway, J.B., Presta, L.G., Carter, P., 1996. “Knobs-into-holes” engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng* 9, 617–621. <https://doi.org/10.1093/protein/9.7.617>
- Riechmann, L., Muyldermans, S., 1999. Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains. *J Immunol Methods* 231, 25–38. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(99\)00138-6](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(99)00138-6)
- Rissiek, B., Danquah, W., Haag, F., Koch-Nolte, F., 2014. Technical Advance: A new cell preparation strategy that greatly improves the yield of vital and functional Tregs and NKT cells. *Journal of Leukocyte Biology* 95, 543–549. <https://doi.org/10.1189/jlb.0713407>

- Rissiek, B., Haag, F., Boyer, O., Koch-Nolte, F., Adriouch, S., 2015. P2X7 on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions. *Front Immunol* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00204>
- Rissiek, B., Lukowiak, M., Raczkowski, F., Magnus, T., Mittrücker, H.-W., Koch-Nolte, F., 2018. In Vivo Blockade of Murine ARTC2.2 During Cell Preparation Preserves the Vitality and Function of Liver Tissue-Resident Memory T Cells. *Front. Immunol.* 9, 1580. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01580>
- Robbie, G.J., Criste, R., Dall'acqua, W.F., Jensen, K., Patel, N.K., Losonsky, G.A., Griffin, M.P., 2013. A novel investigational Fc-modified humanized monoclonal antibody, motavizumab-YTE, has an extended half-life in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 6147–6153. <https://doi.org/10.1128/AAC.01285-13>
- Ronzitti, G., Gross, D.-A., Mingozi, F., 2020. Human Immune Responses to Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors. *Front Immunol* 11, 670. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00670>
- Roopenian, D.C., Christianson, G.J., Sproule, T.J., Brown, A.C., Akilesh, S., Jung, N., Petkova, S., Avanesian, L., Choi, E.Y., Shaffer, D.J., Eden, P.A., Anderson, C.L., 2003. The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs. *J Immunol* 170, 3528–3533. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.7.3528>
- Roovers, R.C., Vosjan, M.J.W.D., Laeremans, T., el Khoulati, R., de Bruin, R.C.G., Ferguson, K.M., Verkleij, A.J., van Dongen, G.A.M.S., van Bergen en Henegouwen, P.M.P., 2011. A biparatopic anti-EGFR nanobody efficiently inhibits solid tumour growth. *Int J Cancer* 129, 2013–2024. <https://doi.org/10.1002/ijc.26145>
- Rossotti, M.A., Bélanger, K., Henry, K.A., Tanha, J., 2022. Immunogenicity and humanization of single-domain antibodies. *FEBS J* 289, 4304–4327. <https://doi.org/10.1111/febs.15809>
- Roux, K.H., Strelets, L., Michaelsen, T.E., 1997. Flexibility of human IgG subclasses. *J Immunol* 159, 3372–3382.
- Roy, S., Nanovskaya, T., Patrikeeva, S., Cochran, E., Parge, V., Guess, J., Schaeck, J., Choudhury, A., Ahmed, M., Ling, L.E., 2019. M281, an anti-FcRn antibody, inhibits IgG transfer in a human ex vivo placental perfusion model. *Am J Obstet Gynecol* 220, 498.e1-498.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.02.058>
- Rudnick, S.I., Lou, J., Shaller, C.C., Tang, Y., Klein-Szanto, A.J.P., Weiner, L.M., Marks, J.D., Adams, G.P., 2011. Influence of affinity and antigen internalization on the uptake and penetration of Anti-HER2 antibodies in solid tumors. *Cancer Res* 71, 2250–2259. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2277>
- Sanders, L.A., Feldman, R.G., Voorhorst-Ogink, M.M., de Haas, M., Rijkers, G.T., Capel, P.J., Zegers, B.J., van de Winkel, J.G., 1995. Human immunoglobulin G (IgG) Fc receptor

- IIA (CD32) polymorphism and IgG2-mediated bacterial phagocytosis by neutrophils. *Infect Immun* 63, 73–81. <https://doi.org/10.1128/iai.63.1.73-81.1995>
- Sargentini-Maier, M.L., De Decker, P., Tersteeg, C., Canvin, J., Callewaert, F., De Winter, H., 2019. Clinical pharmacology of caplacizumab for the treatment of patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Expert Rev Clin Pharmacol* 12, 537–545. <https://doi.org/10.1080/17512433.2019.1607293>
- Schenk, U., Westendorf, A.M., Radaelli, E., Casati, A., Ferro, M., Fumagalli, M., Verderio, C., Buer, J., Scanziani, E., Grassi, F., 2008. Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal* 1, ra6. <https://doi.org/10.1126/scisignal.1160583>
- Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Krebs, C., Bannas, P., Rissiek, B., Seman, M., Haag, F., Koch-Nolte, F., 2009. NAD⁺ and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. *J Immunol* 182, 2898–2908. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801711>
- Schmitz, K.R., Bagchi, A., Roovers, R.C., van Bergen en Henegouwen, P.M.P., Ferguson, K.M., 2013. Structural evaluation of EGFR inhibition mechanisms for nanobodies/VHH domains. *Structure* 21, 1214–1224. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.05.008>
- Schneider, W.P., Wensel, T.G., Stryer, L., Oi, V.T., 1988. Genetically engineered immunoglobulins reveal structural features controlling segmental flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2509–2513. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.8.2509>
- Schroeder, H.W., Cavacini, L., 2010. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 125, S41-52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
- Schütze, K., Petry, K., Hambach, J., Schuster, N., Fumey, W., Schriewer, L., Röckendorf, J., Menzel, S., Albrecht, B., Haag, F., Stortelers, C., Bannas, P., Koch-Nolte, F., 2018. CD38-Specific Biparatopic Heavy Chain Antibodies Display Potent Complement-Dependent Cytotoxicity Against Multiple Myeloma Cells. *Front Immunol* 9, 2553. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02553>
- Selby, M.J., Engelhardt, J.J., Quigley, M., Henning, K.A., Chen, T., Srinivasan, M., Korman, A.J., 2013. Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunol Res* 1, 32–42. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0013>
- Seman, M., Adriouch, S., Scheuplein, F., Krebs, C., Freese, D., Glowacki, G., Deterre, P., Haag, F., Koch-Nolte, F., 2003. NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* 19, 571–582. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00266-8](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00266-8)
- Shang, B., Liu, Yao, Jiang, S., Liu, Yi, 2015. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3⁺ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 5, 15179. <https://doi.org/10.1038/srep15179>

- Shen, Y., Zeng, L., Zhu, A., Blanc, T., Patel, D., Pennello, A., Bari, A., Ng, S., Persaud, K., Kang, Y.K., Balderes, P., Surguladze, D., Hindi, S., Zhou, Q., Ludwig, D.L., Snaveley, M., 2013. Removal of a C-terminal serine residue proximal to the inter-chain disulfide bond of a human IgG1 lambda light chain mediates enhanced antibody stability and antibody dependent cell-mediated cytotoxicity. *MAbs* 5, 418–431. <https://doi.org/10.4161/mabs.24291>
- Shields, R.L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L.Y., Hong, K., Meng, Y.G., Weikert, S.H.A., Presta, L.G., 2002. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 277, 26733–26740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202069200>
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakaguchi, S., 1999. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163, 5211–5218.
- Shinde, P., Howie, H.L., Stegmann, T.C., Hay, A.M., Waterman, H.R., Szittner, Z., Bentlage, A.E.H., Kapp, L., Lissenberg-Thunnissen, S.N., Dekkers, G., Schasfoort, R.B.M., Ratcliffe, S.J., Smolkin, M.E., Vidarsson, G., van der Schoot, C.E., Hudson, K.E., Zimring, J.C., 2020. IgG Subclass Determines Suppression Versus Enhancement of Humoral Alloimmunity to Kell RBC Antigens in Mice. *Front Immunol* 11, 1516. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01516>
- Simister, N.E., Mostov, K.E., 1989. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature* 337, 184–187. <https://doi.org/10.1038/337184a0>
- Simpson, T.R., Li, F., Montalvo-Ortiz, W., Sepulveda, M.A., Bergerhoff, K., Arce, F., Roddie, C., Henry, J.Y., Yagita, H., Wolchok, J.D., Peggs, K.S., Ravetch, J.V., Allison, J.P., Quezada, S.A., 2013. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med* 210, 1695–1710. <https://doi.org/10.1084/jem.20130579>
- Smith, K.G.C., Clatworthy, M.R., 2010. Fc gamma RIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nat Rev Immunol* 10, 328–343. <https://doi.org/10.1038/nri2762>
- Sokolosky, J.T., Dougan, M., Ingram, J.R., Ho, C.C.M., Kauke, M.J., Almo, S.C., Ploegh, H.L., Garcia, K.C., 2016. Durable antitumor responses to CD47 blockade require adaptive immune stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E2646–2654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604268113>
- Sokolosky, J.T., Szoka, F.C., 2015. The neonatal Fc receptor, FcRn, as a target for drug delivery and therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 91, 109–124. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.005>
- Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V., Jacob, U., 2000. The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gamma RIII complex. *Nature* 406, 267–273. <https://doi.org/10.1038/35018508>

- Sondermann, P., Pincetic, A., Maamary, J., Lammens, K., Ravetch, J.V., 2013. General mechanism for modulating immunoglobulin effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 9868–9872. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307864110>
- Spalding, K.L., Bhardwaj, R.D., Buchholz, B.A., Druid, H., Frisé, J., 2005. Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell* 122, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.04.028>
- Stapleton, N.M., Andersen, J.T., Stemmerding, A.M., Bjarnarson, S.P., Verheul, R.C., Gerritsen, J., Zhao, Y., Kleijer, M., Sandlie, I., de Haas, M., Jonsdottir, I., van der Schoot, C.E., Vidarsson, G., 2011. Competition for FcRn-mediated transport gives rise to short half-life of human IgG3 and offers therapeutic potential. *Nat Commun* 2, 599. <https://doi.org/10.1038/ncomms1608>
- Stark, R., Wesselink, T.H., Behr, F.M., Kragten, N.A.M., Arens, R., Koch-Nolte, F., van Gisbergen, K.P.J.M., van Lier, R.A.W., 2018. TRM maintenance is regulated by tissue damage via P2RX7. *Sci Immunol* 3. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau1022>
- Stopforth, R.J., Cleary, K.L.S., Cragg, M.S., 2016. Regulation of Monoclonal Antibody Immunotherapy by FcγRIIB. *J Clin Immunol* 36 Suppl 1, 88–94. <https://doi.org/10.1007/s10875-016-0247-8>
- Strasser, J., de Jong, R.N., Beurskens, F.J., Wang, G., Heck, A.J.R., Schuurman, J., Parren, P.W.H.I., Hinterdorfer, P., Preiner, J., 2019. Unraveling the Macromolecular Pathways of IgG Oligomerization and Complement Activation on Antigenic Surfaces. *Nano Lett* 19, 4787–4796. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b02220>
- Sungur, C.M., Murphy, W.J., 2013. Utilization of mouse models to decipher natural killer cell biology and potential clinical applications. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013, 227–233. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2013.1.227>
- Takai, T., Li, M., Sylvestre, D., Clynes, R., Ravetch, J.V., 1994. FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* 76, 519–529. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90115-5)
- Tang, Y., Lou, J., Alpaugh, R.K., Robinson, M.K., Marks, J.D., Weiner, L.M., 2007. Regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IgG intrinsic and apparent affinity for target antigen. *J Immunol* 179, 2815–2823. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.2815>
- Tapia-Galisteo, A., Sánchez Rodríguez, Í., Aguilar-Sopeña, O., Harwood, S.L., Narbona, J., Ferreras Gutierrez, M., Navarro, R., Martín-García, L., Corbacho, C., Compte, M., Lacadena, J., Blanco, F.J., Chames, P., Roda-Navarro, P., Álvarez-Vallina, L., Sanz, L., 2022. Trispecific T-cell engagers for dual tumor-targeting of colorectal cancer. *Oncoimmunology* 11, 2034355. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2022.2034355>
- Teeling, J.L., French, R.R., Cragg, M.S., van den Brakel, J., Pluyter, M., Huang, H., Chan, C., Parren, P.W.H.I., Hack, C.E., Dechant, M., Valerius, T., van de Winkel, J.G.J., Glennie, M.J., 2004. Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent

- cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 104, 1793–1800. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0039>
- Temming, A.R., de Taeye, S.W., de Graaf, E.L., de Neef, L.A., Dekkers, G., Bruggeman, C.W., Koers, J., Ligthart, P., Nagelkerke, S.Q., Zimring, J.C., Kuijpers, T.W., Wuhler, M., Rispens, T., Vidarsson, G., 2019. Functional Attributes of Antibodies, Effector Cells, and Target Cells Affecting NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *J Immunol* 203, 3126–3135. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900985>
- Teplyakov, A., Zhao, Y., Malia, T.J., Obmolova, G., Gilliland, G.L., 2013. IgG2 Fc structure and the dynamic features of the IgG CH2-CH3 interface. *Mol Immunol* 56, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.03.018>
- Terp, M.G., Olesen, K.A., Arnspang, E.C., Lund, R.R., Lagerholm, B.C., Ditzel, H.J., Leth-Larsen, R., 2013. Anti-human CD73 monoclonal antibody inhibits metastasis formation in human breast cancer by inducing clustering and internalization of CD73 expressed on the surface of cancer cells. *J Immunol* 191, 4165–4173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301274>
- Tijink, B.M., Laeremans, T., Budde, M., Stigter-van Walsum, M., Dreier, T., de Haard, H.J., Leemans, C.R., van Dongen, G.A.M.S., 2008. Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor Nanobodies through albumin binding: taking advantage of modular Nanobody technology. *Mol Cancer Ther* 7, 2288–2297. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-2384>
- Tintelnot, J., Baum, N., Schultheiß, C., Braig, F., Trentmann, M., Finter, J., Fumey, W., Bannas, P., Fehse, B., Riecken, K., Schuetze, K., Bokemeyer, C., Rösner, T., Valerius, T., Peipp, M., Koch-Nolte, F., Binder, M., 2019. Nanobody Targeting of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Ectodomain Variants Overcomes Resistance to Therapeutic EGFR Antibodies. *Mol Cancer Ther* 18, 823–833. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0849>
- Ugurlar, D., Howes, S.C., de Kreuk, B.-J., Koning, R.I., de Jong, R.N., Beurskens, F.J., Schuurman, J., Koster, A.J., Sharp, T.H., Parren, P.W.H.I., Gros, P., 2018. Structures of C1-IgG1 provide insights into how danger pattern recognition activates complement. *Science* 359, 794–797. <https://doi.org/10.1126/science.aao4988>
- Ulrichs, P., Guglietta, A., Dreier, T., van Bragt, T., Hanssens, V., Hofman, E., Vankerckhoven, B., Verheesen, P., Ongenae, N., Lykhopiy, V., Enriquez, F.J., Cho, J., Ober, R.J., Ward, E.S., de Haard, H., Leupin, N., 2018. Neonatal Fc receptor antagonist efgartigimod safely and sustainably reduces IgGs in humans. *J Clin Invest* 128, 4372–4386. <https://doi.org/10.1172/JCI97911>
- Uribe-Querol, E., Rosales, C., 2020. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Front Immunol* 11, 1066. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01066>

- Vaccaro, C., Zhou, J., Ober, R.J., Ward, E.S., 2005. Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody levels. *Nat Biotechnol* 23, 1283–1288. <https://doi.org/10.1038/nbt1143>
- van der Neut Kolfschoten, M., Schuurman, J., Losen, M., Bleeker, W.K., Martínez-Martínez, P., Vermeulen, E., den Bleker, T.H., Wiegman, L., Vink, T., Aarden, L.A., De Baets, M.H., van de Winkel, J.G.J., Aalberse, R.C., Parren, P.W.H.I., 2007. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science* 317, 1554–1557. <https://doi.org/10.1126/science.1144603>
- van Meerten, T., van Rijn, R.S., Hol, S., Hagenbeek, A., Ebeling, S.B., 2006. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res* 12, 4027–4035. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0066>
- Van Roy, M., Ververken, C., Beirnaert, E., Hoefman, S., Kolkman, J., Vierboom, M., Breedveld, E., 't Hart, B., Poelmans, S., Bontinck, L., Hemeryck, A., Jacobs, S., Baumeister, J., Ulrichs, H., 2015. The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody® ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 17, 135. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0651-0>
- Vidarsson, G., Dekkers, G., Rispen, T., 2014. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* 5, 520. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>
- Vieira, P., Rajewsky, K., 1988. The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *Eur J Immunol* 18, 313–316. <https://doi.org/10.1002/eji.1830180221>
- Vincke, C., Loris, R., Saerens, D., Martinez-Rodriguez, S., Muyldermans, S., Conrath, K., 2009. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *J Biol Chem* 284, 3273–3284. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806889200>
- Vu, K.B., Ghahroudi, M.A., Wyns, L., Muyldermans, S., 1997. Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol* 34, 1121–1131. [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(97\)00146-6](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(97)00146-6)
- Walsh, G., Walsh, E., 2022. Biopharmaceutical benchmarks 2022. *Nat Biotechnol* 40, 1722–1760. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01582-x>
- Wang, Y., Krémer, V., Iannascoli, B., Goff, O.R.-L., Mancardi, D.A., Ramke, L., de Chaisemartin, L., Bruhns, P., Jönsson, F., 2022. Specificity of mouse and human Fcγ receptors and their polymorphic variants for IgG subclasses of different species. *Eur J Immunol* 52, 753–759. <https://doi.org/10.1002/eji.202149766>
- Watier, H., 2005. Variability factors in the clinical response to recombinant antibodies and IgG Fc-containing fusion proteins. *Expert Opin Biol Ther* 5 Suppl 1, S29-36. <https://doi.org/10.1517/14712598.5.1.s29>

- Webster, D.M., Henry, A.H., Rees, A.R., 1994. Antibody-antigen interactions. *Current Opinion in Structural Biology* 4, 123–129. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(94\)90070-1](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(94)90070-1)
- Weiskopf, K., Weissman, I.L., 2015. Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer. *MAbs* 7, 303–310. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1011450>
- West, A.P., Bjorkman, P.J., 2000. Crystal structure and immunoglobulin G binding properties of the human major histocompatibility complex-related Fc receptor(γ). *Biochemistry* 39, 9698–9708. <https://doi.org/10.1021/bi000749m>
- Willingham, S.B., Volkmer, J.-P., Gentles, A.J., Sahoo, D., Dalerba, P., Mitra, S.S., Wang, J., Contreras-Trujillo, H., Martin, R., Cohen, J.D., Lovelace, P., Scheeren, F.A., Chao, M.P., Weiskopf, K., Tang, C., Volkmer, A.K., Naik, T.J., Storm, T.A., Mosley, A.R., Edris, B., Schmid, S.M., Sun, C.K., Chua, M.-S., Murillo, O., Rajendran, P., Cha, A.C., Chin, R.K., Kim, D., Adorno, M., Raveh, T., Tseng, D., Jaiswal, S., Enger, P.Ø., Steinberg, G.K., Li, G., So, S.K., Majeti, R., Harsh, G.R., van de Rijn, M., Teng, N.N.H., Sunwoo, J.B., Alizadeh, A.A., Clarke, M.F., Weissman, I.L., 2012. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6662–6667. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121623109>
- Wines, B.D., Vanderven, H.A., Esparon, S.E., Kristensen, A.B., Kent, S.J., Hogarth, P.M., 2016. Dimeric FcγR Ectodomains as Probes of the Fc Receptor Function of Anti-Influenza Virus IgG. *J Immunol* 197, 1507–1516. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502551>
- Wirthmueller, U., Kurosaki, T., Murakami, M.S., Ravetch, J.V., 1992. Signal transduction by Fc gamma RIII (CD16) is mediated through the gamma chain. *J Exp Med* 175, 1381–1390. <https://doi.org/10.1084/jem.175.5.1381>
- Wormald, M.R., Rudd, P.M., Harvey, D.J., Chang, S.C., Scragg, I.G., Dwek, R.A., 1997. Variations in oligosaccharide-protein interactions in immunoglobulin G determine the site-specific glycosylation profiles and modulate the dynamic motion of the Fc oligosaccharides. *Biochemistry* 36, 1370–1380. <https://doi.org/10.1021/bi9621472>
- Wu, T.T., Johnson, G., Kabat, E.A., 1993. Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins* 16, 1–7. <https://doi.org/10.1002/prot.340160102>
- Wypych, J., Li, M., Guo, A., Zhang, Z., Martinez, T., Allen, M.J., Fodor, S., Kelner, D.N., Flynn, G.C., Liu, Y.D., Bondarenko, P.V., Ricci, M.S., Dillon, T.M., Balland, A., 2008. Human IgG2 antibodies display disulfide-mediated structural isoforms. *J Biol Chem* 283, 16194–16205. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709987200>
- Yamaguchi, Y., Kato, K., Shindo, M., Aoki, S., Furusho, K., Koga, K., Takahashi, N., Arata, Y., Shimada, I., 1998. Dynamics of the carbohydrate chains attached to the Fc portion of immunoglobulin G as studied by NMR spectroscopy assisted by selective ¹³C labeling of the glycans. *J Biomol NMR* 12, 385–394. <https://doi.org/10.1023/a:1008392229694>

- Yoo, E.M., Wims, L.A., Chan, L.A., Morrison, S.L., 2003. Human IgG2 can form covalent dimers. *J Immunol* 170, 3134–3138. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3134>
- Zavrtanik, U., Lukan, J., Loris, R., Lah, J., Hadži, S., 2018. Structural Basis of Epitope Recognition by Heavy-Chain Camelid Antibodies. *J Mol Biol* 430, 4369–4386. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.09.002>
- Zhang, A., Ren, Z., Tseng, K.-F., Liu, X., Li, H., Lu, C., Cai, Y., Minna, J.D., Fu, Y.-X., 2021. Dual targeting of CTLA-4 and CD47 on Treg cells promotes immunity against solid tumors. *Sci Transl Med* 13, eabg8693. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abg8693>
- Zhang, T., Cheng, Xueqian, Yu, D., Lin, F., Hou, N., Cheng, Xuan, Hao, S., Wei, J., Ma, L., Fu, Y., Ma, Y., Ren, L., Han, H., Yu, S., Yang, X., Zhao, Y., 2018. Genetic Removal of the CH1 Exon Enables the Production of Heavy Chain-Only IgG in Mice. *Front Immunol* 9, 2202. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02202>
- Zhang, W., Huang, Q., Xiao, W., Zhao, Y., Pi, J., Xu, H., Zhao, H., Xu, J., Evans, C.E., Jin, H., 2020. Advances in Anti-Tumor Treatments Targeting the CD47/SIRP α Axis. *Front Immunol* 11, 18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00018>
- Zhang, Z., Goldschmidt, T., Salter, H., 2012. Possible allelic structure of IgG2a and IgG2c in mice. *Mol Immunol* 50, 169–171. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.11.006>
- Zhu, X., Meng, G., Dickinson, B.L., Li, X., Mizoguchi, E., Miao, L., Wang, Y., Robert, C., Wu, B., Smith, P.D., Lencer, W.I., Blumberg, R.S., 2001. MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. *J Immunol* 166, 3266–3276. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.5.3266>
- Zhu, Y., Bassoff, N., Reinshagen, C., Bhere, D., Nowicki, M.O., Lawler, S.E., Roux, J., Shah, K., 2017. Bi-specific molecule against EGFR and death receptors simultaneously targets proliferation and death pathways in tumors. *Sci Rep* 7, 2602. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02483-9>
- Zwarthoff, S.A., Widmer, K., Kuipers, A., Strasser, J., Ruyken, M., Aerts, P.C., de Haas, C.J.C., Ugurlar, D., den Boer, M.A., Vidarsson, G., van Strijp, J.A.G., Gros, P., Parren, P.W.H.I., van Kessel, K.P.M., Preiner, J., Beurskens, F.J., Schuurman, J., Ricklin, D., Rooijackers, S.H.M., 2021. C1q binding to surface-bound IgG is stabilized by C1r2s2 proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118, e2102787118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2102787118>

Annexe

Revue de la littérature « **Novel biologics targeting the P2X7 ion channel** » dans le cadre de la collaboration avec nos partenaires allemands dans ce projet de l'*Institute of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf*.



Novel biologics targeting the P2X7 ion channel

Friedrich Koch-Nolte¹, Anna Eichhoff^{1,2},
Carolina Pinto-Espinoza¹, Nicole Schwarz¹,
Tobias Schäfer¹, Stephan Menzel¹, Friedrich Haag¹,
Mélanie Demeules², Henri Gondé² and Sahil Adriouch^{1,2}

Targeting the P2X7 ion channel, a danger sensor for extracellular nucleotides, improves outcomes in models of inflammation, cancer, and brain-diseases. Antibodies and nanobodies have been developed that antagonize or potentiate gating of P2X7. Their potential advantages over small-molecule drugs include high specificity, lower off-target effects, and tunable *in vivo* half-life. Genetic fusion of P2X7-specific biologics to binding modules may enable targeting of specific cell subsets. Besides directly modulating P2X7 function, antibodies can also initiate specific depletion of P2X7-expressing cells. Adeno-associated viral vectors (AAV) can be used to express P2X7-specific antibodies *in vivo* to achieve long-lasting biological effects. Furthermore, if successfully targeted to P2X7-expressing cells, AAVs may enable modulation of the function of P2X7-expressing immune cells via encoded transgenic RNA or proteins.

Addresses

¹Institute of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

²Normandie University, UNIROUEN, INSERM, U1234, Pathophysiology, Autoimmunity, Neuromuscular diseases and regenerative THERapies (PANTHER), 76000, Rouen, France

Corresponding authors: Koch-Nolte, Friedrich (nolte@uke.de),
Adriouch, Sahil (sahil.adriouch@univ-rouen.fr)

Current Opinion in Pharmacology 2019, 47:110–118

This review comes from a themed issue on **Immunomodulation**

Edited by **Francesco Di Virgilio** and **Pablo Pelegrín**

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

Available online 12th April 2019

<https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.03.001>

1471-4892/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

P2X7 is a non-selective ligand-gated cation channel expressed at the cell surface of various leukocytes, in particular monocytes, macrophages, and regulatory T cells (Tregs) [1,2] (Figure 1). The physiological ligand of P2X7 is extracellular ATP, which is released from stressed cells as a danger associated molecular pattern (DAMP) during inflammation and tumor development

[3,4*,5]. In LPS-primed monocytes and microglia gating of P2X7 by ATP provides a strong stimulus for the formation of the inflammasome, a multiprotein complex that drives caspase-mediated maturation and release of IL-1 β , IL-18, and IL-33 as potent inflammatory cytokines [6,7]. On Tregs, chronic activation of P2X7 by ARTC2-catalyzed ADP-ribosylation induces cell death (Figure 1). Gating of P2X7 by extracellular NAD⁺-dependent ADP-ribosylation regulates the survival of Tregs and NKT cells [8,9]. P2X7 also controls the development and survival of tissue resident memory T cells [10–13].

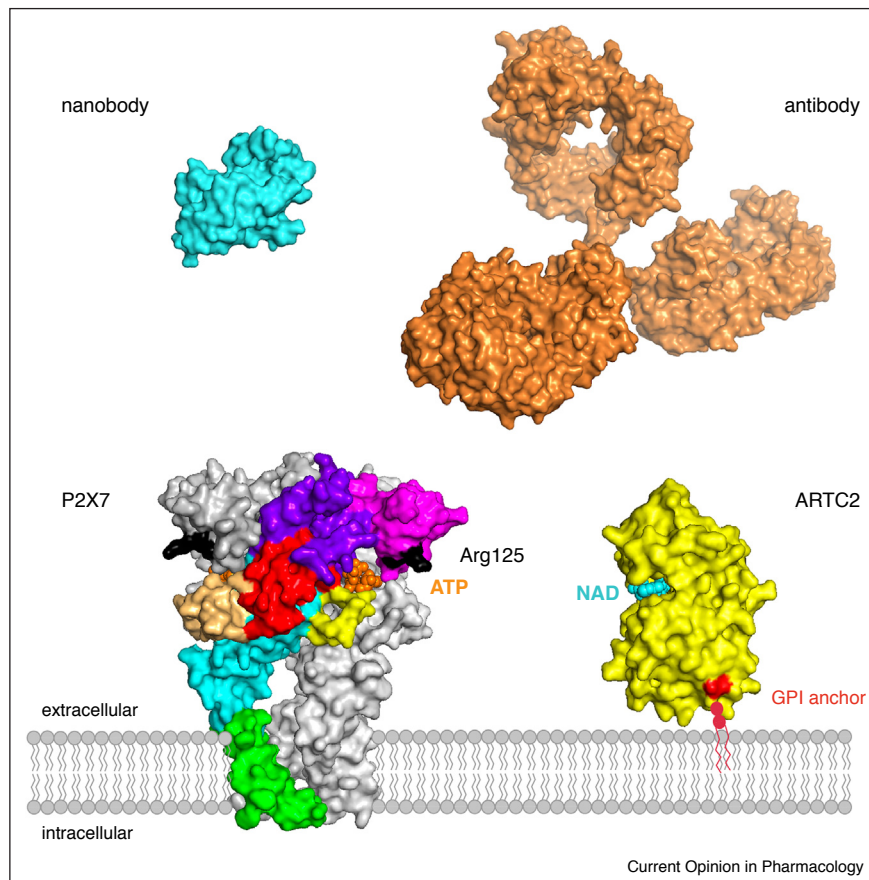
The 3D structures of zebrafish P2X4 and panda P2X7 have provided insight into the structure of ligand binding site and separate allosteric sites, and the molecular mechanism of gating and allosteric modulation [14,15**]. The lipid composition of the plasma membrane, post-translational modifications and soluble allosteric mediators influence the sensitivity of P2X7 to extracellular nucleotides [16]. Pharmacological antagonists and agonists of P2X7 have been proposed as potential therapeutics for sterile inflammation, cancer, pain, and brain-diseases [1,17–19]. P2X7-specific antibodies and nanobodies – single domain fragments derived from heavy chain antibodies that naturally occur in camelids – have been shown to modulate gating of P2X7 [20,21**,22]. These biologics represent a novel class of therapeutic agents (Figure 1). Here we summarize recent progress and perspectives for using these biologics and adeno-associated viral vectors (AAV) to modulate P2X7 function *in vivo*.

P2X7 as a sensor of extracellular NAD⁺ and ATP

NAD⁺ and ATP are released from cells as DAMPs during stress, inflammation and tissue damage [4*,23]. Immune cells are equipped with sensors for extracellular nucleotides. Among these, the P2X7 ion channel is unique because of its role in triggering the release of proinflammatory cytokines and in inducing Treg death [1,2,9]. P2X7 is also overexpressed by many cancer cells and by immunoregulatory cells in the tumor microenvironment, raising the possibility that targeting P2X7 may be of therapeutic benefit in cancer [24*,25,26,27*].

P2X7 is a homotrimeric ion channel (Figure 2) [14,28]. Each subunit contains an extracellular ATP binding

Figure 1



P2X7-modulating nanobodies and antibodies.

One subunit of the homotrimeric P2X7 ion channel is color-coded according to the body parts of a dolphin (see Figure 2), the other two subunits are depicted in grey. ATP, bound to the deep ligand binding site at the interface of two adjacent subunits, is depicted in orange. Arg125 – the target for ADP-ribosylation by ARTC2 is depicted in black. ARTC2 and bound NAD⁺ are depicted in yellow and cyan, respectively. Models of a P2X7 modulating nanobody (cyan) and antibody (orange) are shown for size comparison. Assembled in PyMOL with models of P2X7 (pdb file 5u2h), ARTC2 (pdb file 1og3), IgG1 (1hzh), and a nanobody (pdb file 1mel3).

domain, two transmembrane domains that line the channel, and cytosolic N-terminus and C-terminus that modulate gating of the receptor and intracellular signaling (Figure 2a). Ligand-binding induces a conformational change that allows influx of Ca²⁺ and Na⁺ ions and efflux of K⁺ ions [28]. P2X7 differs from other P2X family members in important characteristics: its requirement for rather high concentrations of extracellular ATP, its capacity to dilate from a cation channel to a dye permeable pore, its capacity to trigger the formation of nonselective pores by other membrane proteins including pannexin 1 and gasdermin D, and its unique gating by NAD⁺-dependent ADP-ribosylation, a post-translational modification catalyzed by the ectoenzyme ARTC2 [2,3,8,29].

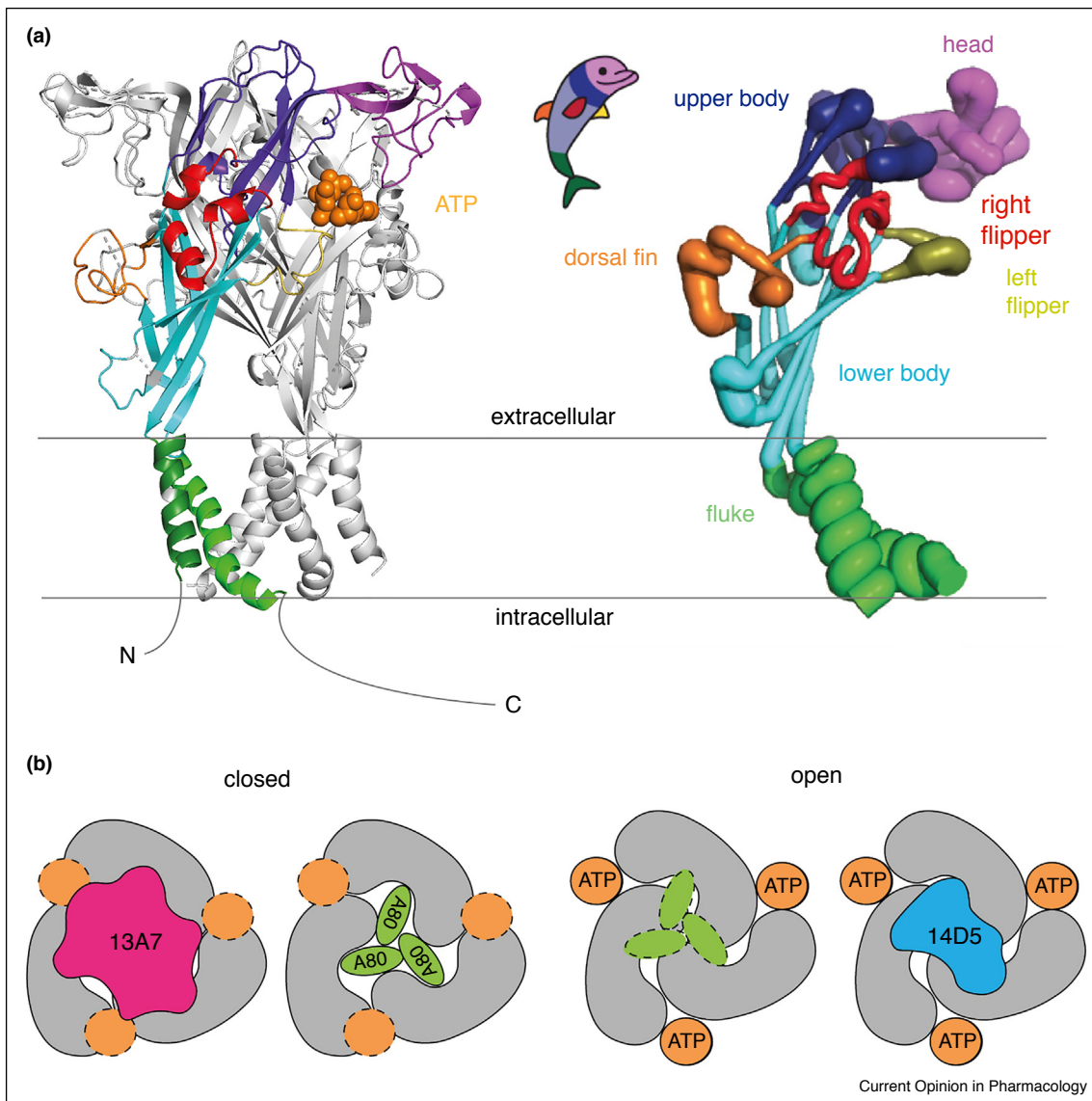
The 3D structures of the extracellular and transmembrane domains of panda P2X7 and zebrafish P2X4 in

closed and ATP-bound open conformations have provided insight into the ATP binding site of the homotrimeric receptor, the orientation of the transmembrane domains of the ion channel pore, conformational changes during gating, and an allosteric binding pocket [14,28,30*,31]. The extracellular P2X7 domain adopts a dolphin-like shape. ATP binds to a pocket cradled by the head, upper body, and left flipper of one subunit and the lower body and dorsal fin of the adjacent subunit (Figure 2a) [14,28]. Activation of P2X7 results in the narrowing of the allosteric binding pocket, explaining why binding of a molecule at this site can prevent gating of the channel [31] (Figure 2b).

P2X7 as a target in sterile inflammation, pain, cancer, and neurological diseases

Activation of P2X7 on T cells causes exposure of phosphatidylserine on the outer leaflet of the plasma

Figure 2



3D structure of the P2X7 ion channel.

(a) Each subunit of the P2X7 ion channel resembles a dolphin. One subunit is color-coded according to the body parts of a dolphin, the other two subunits are depicted in grey. ATP bound to the ligand binding site is depicted as a space-fill model in orange. **(b)** Schematic diagrams illustrating the closed and open conformations of P2X7 with bound small molecule antagonist A804598 (green) and ATP (orange), respectively. Antagonistic and potentiating Nbs 13A7 (magenta) and 14D5 (cyan) might stabilize the closed and open conformations of P2X7, respectively. Figure modified from Refs. [14,15*].

membrane and metalloprotease-mediated shedding of CD62L and CD27 [4*,8,32]. Gating of P2X7 on macrophages, microglia, and dendritic cells induces assembly of the inflammasome and caspase-1-mediated cleavage and release of the leaderless proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-18, and IL-33 [2]. On Tregs cells, prolonged exposure to ATP or brief exposition to NAD⁺ causes P2X7-dependent pore formation, membrane blebbing and – ultimately – cell death [8,9].

Genetic inactivation of the P2X7-encoding gene has revealed an important role for P2X7 in sterile inflammation, chronic pain, and cancer [24*,33,34]. P2X7^{-/-} animals show reduced inflammatory responses in several experimental models of sterile inflammation, including experimental autoimmune encephalomyelitis [35], experimental colitis [27*], and antibody mediated nephritis [36]. Also, tumors were shown to grow faster in P2X7^{-/-} mice implying a role of P2X7 in the anti-tumor immune response [24*,27*].

In the human, allelic polymorphisms of P2X7 have been associated with enhanced or decreased risks for inflammatory and neurological diseases [37–39]. While gain-of-function haplotypes are associated with increased risk to develop inflammatory and psychiatric disorders, loss-of-function haplotypes provide protection against multiple sclerosis and other inflammatory disorders [1,37].

The effects of genetic inactivation of P2X7 have been recapitulated to some extent by pharmacological studies using P2X7 antagonists [1,19]. Small-molecule antagonists, including brilliant blue G (BBG) and oxidized ATP (oATP), have shown therapeutic benefit in animal models [35,36]. P2X7 antagonists have also been shown to reduce tumor growth in several models where the tumor itself expresses P2X7 [26]. However, these small molecules are fraught with lack of specificity and off-target side effects. Two small-molecule inhibitors (SMI) with higher selectivity have failed in clinical studies [40,41]. Biologics offer higher specificity, cell subset targeting and new perspectives for immunoregulation. Table 1 provides an overview of P2X7-specific biologics and their possible modes of action.

P2X7-specific biologics: antibodies, nanobodies, AAV

Antibodies and nanobodies are highly specific. They can be administered either by repeated systemic injections or via continued endogenous synthesis after transduction of cells *in vivo* with adeno-associated viral vectors (AAV) coding for these biologics. AAV provide a means for producing P2X7-specific antibodies *in vivo* and they may also provide a strategy to specifically alter the function of P2X7-expressing cells (see Sections ‘Modulating the function of P2X7-expressing cells with P2X7-specific biologics’ and ‘Depleting P2X7-expressing cells’, below). In contrast to small molecule drugs, antibodies typically demonstrate exquisite specificity for a single protein target that rarely can be matched by small molecules. Antibodies targeting membrane proteins, cytokines and growth factors are established therapeutics in oncology and inflammation. With a size of 150 kDa, however, conventional antibodies are rather large molecules when compared to the exposed surface of ion channels (Figure 3). Nanobodies retain the same specificity as antibodies but in a smaller (15 kDa)

more flexible format with higher solubility [42] (Figure 3a). The complementarity determining region 3 (CDR3) of a nanobody is usually longer and can extend into cavities on protein surfaces [43]. Such cavities often correspond to functional regions of proteins (e.g. the active site, the ligand-binding site, or allosteric site), positioning nanobodies as potential modulating biologics (i.e. blocking or potentiating).

Nanobodies can readily be fused to other nanobodies to generate bispecific reagents or to the Fc-region of conventional antibodies to generate nanobody-based heavy chain antibodies (hcAbs) (Figure 3b) [44*,45*]. Monovalent and bivalent nanobodies ensure high tissue penetration combined with rapid renal clearance while bivalent format offers higher avidity. Bispecific formats can be used to increase serum half-life and/or cell specificity. Fusion of nanobodies to the Fc-region offers the possibility to confer effector functions that can be further manipulated using protein-engineering, for example to abolish binding to complement and FcγR receptors or to enhance complement-dependent cytotoxicity, antibody-dependent cellular cytotoxicity, or serum half-life [46–50]. Bispecific reagents that combine a selective binding moiety targeting a given cell differentiation marker with a P2X7-blocking nanobody open the possibility of blocking P2X7 selectively in the targeted cell subset (Figure 3c). Such biologics are easier to construct with nanobodies than with conventional antibodies, as the modular nanobody format avoids solubility and mispairing problems inherent to conventional V_H–V_L pairs [47].

Modulating the function of P2X7-expressing cells with P2X7-specific biologics

In principle, there are several strategies to modulate the function of P2X7-expressing cells with P2X7-specific biologics: (i) by antagonizing or potentiating the function of P2X7 itself, (ii) by depleting cells expressing P2X7, and (iii) by tuning the function of P2X7-expressing cells using retargeted viral vectors. In the following sections we will summarize the current status, challenges, limitations, and perspectives for each of these strategies.

Blocking or activating the function of P2X7

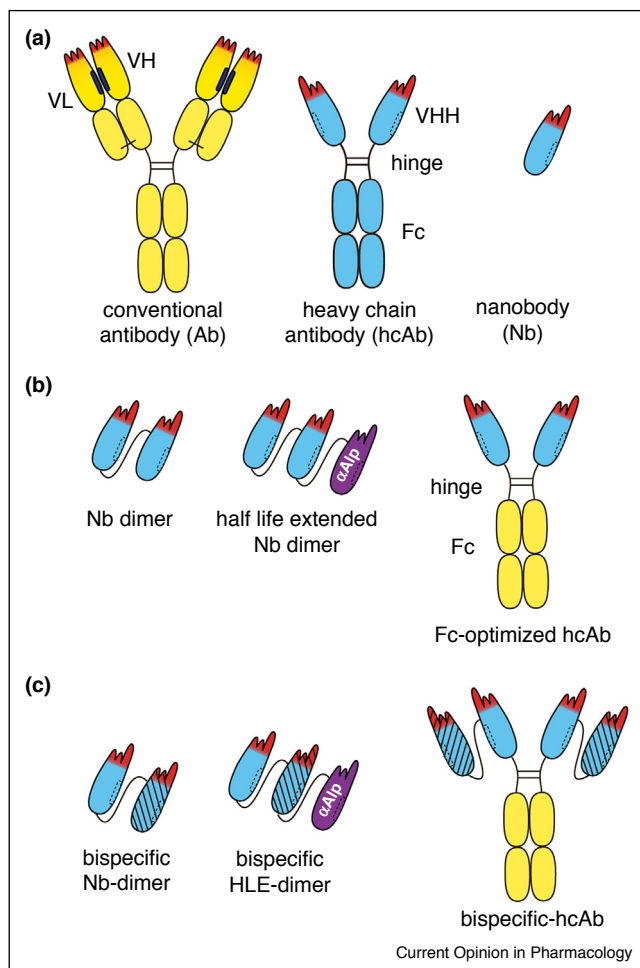
A number of monoclonal antibodies (mAb) and nanobodies (Nb) have been developed that modulate the

Table 1

Potential modes of action of P2X7-targeting biologics

Biologic	Mode of action
Antibodies, nanobodies	Block or potentiate nucleotide-induced gating of P2X7
Fc-optimized antibodies	Deplete P2X7-expressing cells
Bispecific antibodies or nanobodies	Block or potentiate P2X7 on specific immune cells, deplete specific immune cell subsets
AAV	Local and systemic expression of P2X7 modulating antibodies or nanobodies
Retargeted AAV	Modulate the function of P2X7-expressing cells

Figure 3



P2X7-targeting biologics.

(a) Conventional P2X7-specific antibodies are composed of two heavy chains and two light chains. Each of the two antigen-binding paratopes (in red) is formed by the variable domains (VH, VL) which interact via a hydrophobic interface (black ovals). The antigen binding paratope of a P2X7-specific llama heavy chain antibody is formed by a single variable domain (VHH or nanobody). The region of the VHH corresponding to the VH–VL interface of the conventional antibody is hydrophilic, accounting for the high stability and solubility of nanobodies. **(b)** Owing to their excellent solubility, nanobodies can easily be fused genetically to other nanobodies. Fusion to a second identical nanobody yields a bivalent P2X7-specific dimer. Fusion to an albumin-specific nanobody mediates an extended *in vivo* half-life. Fusion to an engineered Fc region yields a heavy chain antibody (hcAb) and can confer modified effector functions. **(c)** Fusion of a P2X7-specific nanobody to a nanobody directed against another cell surface protein can target the P2X7-specific nanobody to a particular subset of immune cells. Fusion to an albumin-specific nanobody or an optimized Fc domain, again, can prolong the half-life or enhance the cytotoxicity of P2X7-subset-specific nanobodies. Figure modified from references [45*,62].

function of human and mouse P2X7 (Table 2). The L4 mAb and the Dano1 Nb inhibit gating of human P2X7 [20,21**], the 1F11 mAb and 13A7 Nb inhibit gating of mouse P2X7, whereas Nb 14D5 potentiates gating of

P2X7 by subthreshold levels of ATP [21**,22]. mAb Hano43 prevents ADP-ribosylation of mouse P2X7 [51]. These biologics illustrated exquisite specificity for P2X7, that is they did not show any detectable binding to P2X4 or P2X1, the closest paralogs of P2X7. Nbs 13A7 and 14D5 were readily reformatted into half-life extended homo-dimers by fusion to the albumin-specific nanobody Alb8. Systemic administration of half-life extended Nb 13A7 ameliorated inflammation in DNFB induced allergic dermatitis and antibody-induced glomerulonephritis [21**]. Similarly, in a human surrogate inflammation model with endotoxin treated blood samples, Nb Dano1 blocked ATP-induced release of IL-1β from monocytes at >1000-fold higher potency than small molecule inhibitors of P2X7. Nb Dano1 showed complete blockade of human P2X7, in contrast to the partial effect of the L4 mAb [20,21**].

Therapeutic antibodies are commonly injected systemically to maximize delivery. As in case of small molecule drugs, antibodies presumably cross the endothelium and reach the surface of cells in the tissue parenchyma. In case of ARTC2.2 we observed that intact antibodies take longer than nanobodies to reach and occupy ARTC2.2 on the cell surface of T cells in the spleen and lymph nodes [46,52]. Exploring other injection routes, nanobodies have been administered to the respiratory tract and lung via aerosols [53]. In future studies, intracerebroventricular injections of P2X7-blocking biologics may offer benefit in brain diseases such as multiple sclerosis, epilepsy, and depression [54]. Antibodies and nanobodies might also be engineered for enhanced permeation of the blood brain barrier, for example by linkage to a ligand for a brain-shuttle transcytosis receptor [55,56].

An emerging alternative to systemic delivery of antibodies is the endogenous production of the therapeutic antibodies directly *in vivo* upon administration of AAV vectors. AAV vectors have been used successfully to produce therapeutic anti-HIV antibodies *in vivo*, conferring protection in animals that were not classically vaccinated (a concept termed vectored-immunoprophylaxis) [57]. A single intramuscular injection of AAV coding for HIV-neutralizing antibodies resulted in long lasting serum levels of the therapeutic antibodies in mice and non-human primates [58,59]. We have made similar observations using AAV coding for P2X7-specific nanobodies (Adriouch *et al.*, unpublished).

Depleting P2X7-expressing cells

Depletion of Tregs by activation the ARTC2/P2X7 axis can be used to promote anti-tumor immune responses. We have previously observed that mouse Tregs cells are particularly sensitive to NAD⁺-induced cell death – mediated by ARTC2.2 catalyzed ADP-ribosylation of the P2X7 receptor [9]. This resulted in more effective anti-tumor responses. This strategy is not applicable to

Table 2

Antibodies and nanobodies that modulate the function of P2X7

mAb/Nb	Effect on P2X7 function	Inflammation models	Refs.
mAb L4	Inhibits gating of human and rat P2X7	Inhibits ATP-induced release of IL-1 β	[20]
mAb Hano43	Inhibits ADP-ribosylation of mouse P2X7	–	[49]
mAb Hano44	Potentiates gating of mouse P2X7	–	[49]
mAb 1F11	Inhibits gating of mouse P2X7	Ameliorates experimental colitis	[22]
Nb Dano1	Inhibits gating of human P2X7	Inhibits ATP-induced release of IL-1 β	[21**]
Nb 13A7	Inhibits gating of mouse P2X7	Ameliorates experimental glomerulonephritis and contact dermatitis	[21**]
Nb 14D5	Potentiates gating of mouse P2X7	Aggravates experimental glomerulonephritis	[21**]
Nb s+16	Inhibits ADP-ribosylation of mouse P2X7	Ameliorates experimental T1DM	[9,10,44*]

humans, since the human ARTC2.2 encoding gene is inactivated by premature stop codons [60]. Instead, antibodies targeting Treg cell surface markers such as CTLA-4, CD25 and CD137 can be used to deplete Tregs and to promote anti-tumor response [61,62,63**]. As P2X7 is expressed at high level on Tregs, and at lower levels by many tumor cells, a similar strategy using P2X7-specific hcAbs to deplete Tregs could have the additional beneficial effect of blocking P2X7-dependent proliferation of tumor cells. Again, combining a P2X7-specific nanobody with a binding module directed against a cell surface marker restricted to Tregs might further facilitate the specific depletion of this immune cell subset.

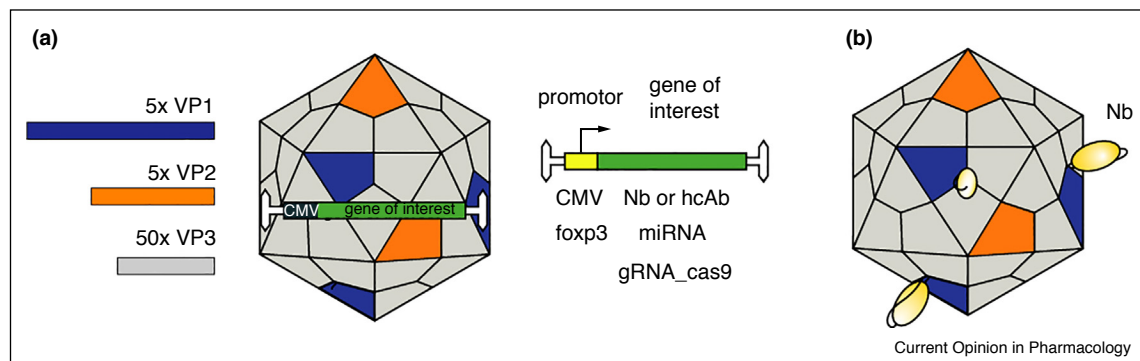
Interestingly, Fc-engineering can be used to modulate the capacity of antibodies to deplete target cells, as certain IgG isotypes more effectively activate the complement system and/or Fc-receptor mediated cytotoxicity and phagocytosis [48,63**]. Combining hcAbs may also have some advantages. Recently, we observed that

complement is activated more effectively by combinations of two hcAbs that target non-overlapping epitopes on the same protein than by a single mAb or hcAb [49,64*]. Similar effects were observed when two distinct nanobodies were genetically linked into a biparatopic hcAb. Combinations of hcAbs and biparatopic hcAbs presumably crosslink the target protein into larger oligomers on the cell surface, thereby facilitating binding and activation of the first complement component C1q [49,64*]. It will be interesting to determine whether oligomerization of P2X7 with hcAbs targeting different epitopes more efficiently deplete P2X7-expressing cells.

Tuning the function of P2X7 expressing cells

As discussed earlier, AAV vectors can be used to produce antibodies or nanobodies *in vivo* (see Section ‘Modulating the function of P2X7-expressing cells with P2X7-specific biologics’ above). AAV can also be used to modulate the function of the transduced cell, for example via expression of transgenic proteins and/or RNA in the target cells

Figure 4



AAV vectors as tools for modulating the function of P2X7 and/or the function of P2X7-expressing cells.

(a) Adeno-associated viral vectors (AAV) are established gene therapy vectors. The AAV capsid is assembled from 60 capsid proteins, with VP2 and VP3 representing N-terminally truncated versions of VP1. The AAV genome, maintained as an episome in the transduced cell, can carry one or more therapeutic genes under the control of a given promoter. A strong ubiquitous promoter such as the cytomegalovirus (CMV) promoter drives expression of the transgene in all transduced cells, a tissue-restricted promoter such as the *foxp3* promoter would be active only in a particular subset of transduced cells (e.g. *Foxp3*⁺ Tregs). The gene of interest can encode various effectors such as secreted P2X7-specific nanobodies or antibodies, a pro-apoptotic protein, an inhibitory micro RNA (miRNA), a guide RNA and Cas9 for a specific genomic modification.

(b) Incorporation of a P2X7-specific nanobody into a viral capsid protein provides a strategy to selectively promote transduction of P2X7-expressing cells with such redirected AAV.

(Figure 4). For instance, the AAV-vector can be used to express a pro-apoptotic protein, an interfering miRNA targeting P2X7 itself or other downstream proteins such as IL-1 β or gasdermin D, or guide RNA and Cas9 for genetic modifications of the transduced cells *in vivo* [65,66] (Figure 4a).

AAV-based modulation of cell function, however, is limited by the broad tropism of AAV vectors making it difficult to target a particular cell subset. One strategy to overcome this limitation is to use cell-specific promoters limiting the expression of the transgene to the targeted cell subset. A second strategy is to use a P2X7-specific nanobody as targeting module to redirect AAV to P2X7-expressing cells (Eichhoff *et al.*, unpublished) (Figure 4b). If successful, this could allow selective modulation of P2X7-expressing cells for therapeutic intervention.

Conclusions and outlook

Thanks to its pivotal roles in triggering the release of the leaderless cytokines IL-1 β , IL-18, and IL-33, and its role in controlling the development and survival of regulatory and tissue resident T cells, P2X7 has emerged as an attractive target for immunomodulation. Small molecule inhibitors have shown promising results in animal models but have failed so far in clinical studies. Meanwhile, functional antibodies and nanobodies have been generated and these, too, have shown promising therapeutic benefit in animal models of sterile inflammation. P2X7-specific antibodies and nanobodies pave the way for several new strategies for experimental and therapeutic immunomodulation. Bispecific reagents and the use of AAV vectors appear particularly challenging and promising.

Conflict of interest statement

FK-N and FH receive royalties from sales of antibodies developed in their lab via MediGate GmbH, a 100% subsidiary of the University Medical Center, Hamburg. FK-N and AE are co-inventors on patent applications on P2X7-nanobodies and on the use of nanobodies to target AAVs to P2X7-expressing cells.

Acknowledgements

This study was supported in part by grants from the Agence Nationale de la Recherche to SA (ANR-18-CE92-0046), the Institut National Du Cancer to SA (INCa 2015-137), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Nos. 310/11, 310/13, SFB1192-B5, SFB1328-A10) to FK-N and FH, from the Deutsche Akademische Austauschdienst to CP, from the Claussen-Simon-Stiftung to AE, and the European Cooperation in Science and Technology COST Action BM1406 IONCHAN-IMMUNRESPON to SA and FK-N.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest
 - of outstanding interest
1. Bartlett R, Stokes L, Sluyter R: **The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease.** *Pharmacol Rev* 2014, **66**:638-675.
 2. Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S: **The P2X7 receptor in infection and inflammation.** *Immunity* 2017, **47**:15-31.
 3. Di Virgilio F, Schmalzing G, Markwardt F: **The elusive P2X7 macropore.** *Trends Cell Biol* 2018, **28**:392-404.
 4. Linden J, Koch-Nolte F, Dahl G: **Purine release, metabolism, and signaling in the inflammatory response.** *Annu Rev Immunol* 2019, **37**:325-347.
 - A comprehensive review of purinergic signaling in infection and inflammation.
 5. Mikolajewicz N, Mohammed A, Morris M, Komarova SV: **Mechanically stimulated ATP release from mammalian cells: systematic review and meta-analysis.** *J Cell Sci* 2018, **131**.
 6. Barbera-Cremades M, Baroja-Mazo A, Gomez AI, Machado F, Di Virgilio F, Pelegrin P: **P2X7 receptor-stimulation causes fever via PGE2 and IL-1 β release.** *FASEB J* 2012, **26**:2951-2962.
 7. Giuliani AL, Sarti AC, Falzoni S, Di Virgilio F: **The P2X7 receptor-interleukin-1 liaison.** *Front Pharmacol* 2017, **8**:123.
 8. Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, Glowacki G, Deterre P, Haag F, Koch-Nolte F: **NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor.** *Immunity* 2003, **19**:571-582.
 9. Hubert S, Rissiek B, Klages K, Huehn J, Sparwasser T, Haag F, Koch-Nolte F, Boyer O, Seman M, Adriouch S: **Extracellular NAD + shapes the Foxp3+ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway.** *J Exp Med* 2010, **207**:2561-2568.
 10. Rissiek B, Lukowiak M, Raczkowski F, Magnus T, Mittrucker HW, Koch-Nolte F: **In vivo blockade of murine ARTC2.2 during cell preparation preserves the vitality and function of liver tissue-resident memory T cells.** *Front Immunol* 2018, **9**:1580.
 11. Borges da Silva H, Beura LK, Wang H, Hanse EA, Gore R, Scott MC, Walsh DA, Block KE, Fonseca R, Yan Y *et al.*: **The purinergic receptor P2RX7 directs metabolic fitness of long-lived memory CD8(+) T cells.** *Nature* 2018, **559**:264-268.
 12. Stark R, Wesselink TH, Behr FM, Kragten NAM, Arens R, Koch-Nolte F, van Gisbergen K, van Lier RAW: **T RM maintenance is regulated by tissue damage via P2RX7.** *Sci Immunol* 2018, **3**.
 13. Greene TT, Labarta-Bajo L, Zuniga EI: **Dangerously fit: extracellular ATP aids memory T cell metabolism.** *Immunity* 2018, **49**:208-210.
 14. Karasawa A, Kawate T: **Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor.** *eLife* 2016, **5**.
 15. Karasawa A, Michalski K, Mikhelzon P, Kawate T: **The P2X7 receptor forms a dye-permeable pore independent of its intracellular domain but dependent on membrane lipid composition.** *eLife* 2017, **6**.
 - This study demonstrates that panda P2X7 reconstituted into liposomes can form a dye permeable pore. Gating is facilitated by phosphoglycerate and sphingomyelin but inhibited by cholesterol.
 16. Di Virgilio F, Giuliani AL, Vultaggio-Poma V, Falzoni S, Sarti AC: **Non-nucleotide agonists triggering P2X7 receptor activation and pore formation.** *Front Pharmacol* 2018, **9**:39.
 17. Burnstock G, Knight GE: **The potential of P2X7 receptors as a therapeutic target, including inflammation and tumour progression.** *Purinergic Signal* 2018, **14**:1-18.
 18. Jacobson KA, Muller CE: **Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors.** *Neuropharmacology* 2016, **104**:31-49.
 19. Young CNJ, Gorecki DC: **P2RX7 purinoceptor as a therapeutic target-the second coming?** *Front Chem* 2018, **6**:248.
 20. Buell G, Chessell IP, Michel AD, Collo G, Salazzo M, Herren S, Gretener D, Grahames C, Kaur R, Kosco-Vilbois MH *et al.*: **Blockade of human P2X7 receptor function with a monoclonal antibody.** *Blood* 1998, **92**:3521-3528.
 21. Danquah W, Meyer-Schwesinger C, Rissiek B, Pinto C, Serracant-Prat A, Amadi M, Iacenda D, Knop JH, Hammel A, Bergmann P *et al.*: **Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation.** *Sci Transl Med* 2016, **8** 366ra.

- This study shows that P2X7-specific nanobodies 13A7 and Dano-1 block ATP-induced release of IL-1 β from endotoxin primed monocytes at >1000-fold higher potency than benchmark small molecule inhibitors.
22. Kurashima Y, Amiya T, Nochi T, Fujisawa K, Haraguchi T, Iba H, Tsutsui H, Sato S, Nakajima S, Iijima H et al.: **Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors.** *Nat Commun* 2012, **3**:1034.
 23. Adriouch S, Hubert S, Pechberty S, Koch-Nolte F, Haag F, Seman M: **NAD⁺ released during inflammation participates in T cell homeostasis by inducing ART2-mediated death of naive T cells in vivo.** *J Immunol* 2007, **179**:186-194.
 24. Adinolfi E, Capece M, Franceschini A, Falzoni S, Giuliani AL, Rotondo A, Sarti AC, Bonora M, Syberg S, Corigliano D et al.: **Accelerated tumor progression in mice lacking the ATP receptor P2X7.** *Cancer Res* 2015, **75**:635-644.
- This study shows that tumors implanted in P2X7^{-/-} mice grow faster, lack inflammatory infiltrate and metastasize more readily, implying that expression of P2X7 on host immune cells has a fundamental role in restraining tumor growth and metastatic spreading.
25. Di Virgilio F, Falzoni S, Giuliani AL, Adinolfi E: **P2 receptors in cancer progression and metastatic spreading.** *Curr Opin Pharmacol* 2016, **29**:17-25.
 26. Di Virgilio F, Sarti AC, Falzoni S, De Marchi E, Adinolfi E: **Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment.** *Nat Rev Cancer* 2018, **18**:601-618.
 27. Hofman P, Cherfils-Vicini J, Bazin M, Ilie M, Juhel T, Hebuterne X, Gilson E, Schmid-Alliana A, Boyer O, Adriouch S et al.: **Genetic and pharmacological inactivation of the purinergic P2RX7 receptor dampens inflammation but increases tumor incidence in a mouse model of colitis-associated cancer.** *Cancer Res* 2015, **75**:835-845.
- This study shows lack of P2X7 accelerates growth of transplanted tumors and that pharmacological inactivation of P2X7 accelerates progression of colitis-associated cancer.
28. Hattori M, Gouaux E: **Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors.** *Nature* 2012, **485**:207-213.
 29. Janks L, Sprague RS, Egan TM: **ATP-gated P2X7 receptors require chloride channels to promote inflammation in human macrophages.** *J Immunol* 2019, **202**:883-898.
 30. Schmid R, Evans RJ: **ATP-gated P2X receptor channels: molecular insights into functional roles.** *Annu Rev Physiol* 2018.
- A comprehensive review of the insights gained from 3D-structures of P2X7 and related receptors and from studies with site directed P2X receptor mutants.
31. Kasuya G, Yamaura T, Ma XB, Nakamura R, Takemoto M, Nagumo H, Tanaka E, Dohmae N, Nakane T, Yu Y et al.: **Structural insights into the competitive inhibition of the ATP-gated P2X receptor channel.** *Nat Commun* 2017, **8**:876.
 32. Sommer A, Kordowski F, Buch J, Marezky T, Evers A, Andra J, Dusterhoft S, Michalek M, Lorenzen I, Somasundaram P et al.: **Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function.** *Nat Commun* 2016, **7**:11523.
 33. Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, Brissette W, Wicks JR, Audoly L, Gabel CA: **Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response.** *J Immunol* 2002, **168**:6436-6445.
 34. Sorge RE, Trang T, Dorfman R, Smith SB, Beggs S, Ritchie J, Austin JS, Zaykin DV, Vander Meulen H, Costigan M et al.: **Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity.** *Nat Med* 2012, **18**:595-599.
 35. Matute C, Torre I, Perez-Cerda F, Perez-Samartin A, Alberdi E, Etxebarria E, Arranz AM, Ravid R, Rodriguez-Antiguedad A, Sanchez-Gomez M et al.: **P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis.** *J Neurosci* 2007, **27**:9525-9533.
 36. Taylor SR, Turner CM, Elliott JI, McDaid J, Hewitt R, Smith J, Pickering MC, Whitehouse DL, Cook HT, Burnstock G et al.: **P2X7 deficiency attenuates renal injury in experimental glomerulonephritis.** *J Am Soc Nephrol* 2009, **20**:1275-1281.
 37. Fuller SJ, Stokes L, Skarratt KK, Gu BJ, Wiley JS: **Genetics of the P2X7 receptor and human disease.** *Purinergic Signal* 2009, **5**:257-262.
 38. Ursu D, Ebert P, Langron E, Ruble C, Munsie L, Zou W, Fijal B, Qian YW, McNearney TA, Mogg A et al.: **Gain and loss of function of P2X7 receptors: mechanisms, pharmacology and relevance to diabetic neuropathic pain.** *Mol Pain* 2014, **10**:37.
 39. Caseley EA, Muench SP, Roger S, Mao HJ, Baldwin SA, Jiang LH: **Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the P2X receptor genes: association with diseases, impact on receptor functions and potential use as diagnosis biomarkers.** *Int J Mol Sci* 2014, **15**:13344-13371.
 40. Keystone EC, Wang MM, Layton M, Hollis S, McInnes IB: **Clinical evaluation of the efficacy of the P2X7 purinergic receptor antagonist AZD9056 on the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in patients with active disease despite treatment with methotrexate or sulphasalazine.** *Ann Rheum Dis* 2012, **71**:1630-1635.
 41. Eser A, Colombel JF, Rutgeerts P, Vermeire S, Vogelsang H, Braddock M, Persson T, Reinisch W: **Safety and efficacy of an oral inhibitor of the purinergic receptor P2X7 in adult patients with moderately to severely active Crohn's disease: a randomized placebo-controlled, double-blind, phase IIa study.** *Inflamm Bowel Dis* 2015, **21**:2247-2253.
 42. Muyldermans S: **Nanobodies: natural single-domain antibodies.** *Annu Rev Biochem* 2013, **82**:775-797.
 43. De Genst E, Silence K, Decanniere K, Conrath K, Loris R, Kinne J, Muyldermans S, Wyns L: **Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:4586-4591.
 44. Ingram JR, Schmidt FI, Ploegh HL: **Exploiting nanobodies' singular traits.** *Annu Rev Immunol* 2018, **36**:695-715.
- A comprehensive review on nanobodies with a focus on immunomodulating nanobodies.
45. Steeland S, Vandenbroucke RE, Libert C: **Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies.** *Drug Discov Today* 2016, **21**:1076-1113.
- A comprehensive review on nanobodies in clinical development in the fields of cancer, infection, inflammation, and neurodegeneration.
46. Scheuplein F, Rissiek B, Driver JP, Chen YG, Koch-Nolte F, Serreze DV: **A recombinant heavy chain antibody approach blocks ART2 mediated deletion of an iNKT cell population that upon activation inhibits autoimmune diabetes.** *J Autoimmun* 2010, **34**:145-154.
 47. Bannas P, Hambach J, Koch-Nolte F: **Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics.** *Front Immunol* 2017, **8**:1603.
 48. Sondermann P, Szymkowski DE: **Harnessing Fc receptor biology in the design of therapeutic antibodies.** *Curr Opin Immunol* 2016, **40**:78-87.
 49. de Jong RN, Beurskens FJ, Verploegen S, Strumane K, van Kampen MD, Voorhorst M, Horstman W, Engelberts PJ, Oostindie SC, Wang G et al.: **A novel platform for the potentiation of therapeutic antibodies based on antigen-dependent formation of IgG hexamers at the cell surface.** *PLoS Biol* 2016, **14**:e1002344.
 50. Lo M, Kim HS, Tong RK, Bainbridge TW, Vernes JM, Zhang Y, Lin YL, Chung S, Dennis MS, Zuchero YJ et al.: **Effector-attenuating substitutions that maintain antibody stability and reduce toxicity in mice.** *J Biol Chem* 2017, **292**:3900-3908.
 51. Moller S, Jung C, Adriouch S, Dubberke G, Seyfried F, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F: **Monitoring the expression of purinoceptors and nucleotide-metabolizing ecto-enzymes with antibodies directed against proteins in native conformation.** *Purinergic Signal* 2007, **3**:359-366.
 52. Bannas P, Well L, Lenz A, Rissiek B, Haag F, Schmid J, Hochgrafe K, Trepel M, Adam G, Ittrich H et al.: **In vivo near-infrared fluorescence targeting of T cells: comparison of nanobodies and conventional monoclonal antibodies.** *Contrast Media Mol Imaging* 2014, **9**:135-142.

53. Van Heeke G, Allosery K, De Brabandere V, De Smedt T, Detalle L, de Fougères A: **Nanobodies(R) as inhaled biotherapeutics for lung diseases.** *Pharmacol Ther* 2017, **169**:47-56.
54. Beamer E, Fischer W, Engel T: **The ATP-gated P2X7 receptor as a target for the treatment of drug-resistant epilepsy.** *Front Neurosci* 2017, **11**:21.
55. Niewoehner J, Bohrmann B, Collin L, Urich E, Sade H, Maier P, Rueger P, Stracke JO, Lau W, Tissot AC *et al.*: **Increased brain penetration and potency of a therapeutic antibody using a monovalent molecular shuttle.** *Neuron* 2014, **81**:49-60.
56. Stanimirovic D, Kemmerich K, Haqqani AS, Farrington GK: **Engineering and pharmacology of blood-brain barrier-permeable bispecific antibodies.** *Adv Pharmacol* 2014, **71**:301-335.
57. Brady JM, Baltimore D, Balazs AB: **Antibody gene transfer with adeno-associated viral vectors as a method for HIV prevention.** *Immunol Rev* 2017, **275**:324-333.
58. Balazs AB, Ouyang Y, Hong CM, Chen J, Nguyen SM, Rao DS, An DS, Baltimore D: **Vectored immunoprophylaxis protects humanized mice from mucosal HIV transmission.** *Nat Med* 2014, **20**:296-300.
59. Saunders KO, Wang L, Joyce MG, Yang ZY, Balazs AB, Cheng C, Ko SY, Kong WP, Rudicell RS, Georgiev IS *et al.*: **Broadly neutralizing human immunodeficiency virus type 1 antibody gene transfer protects nonhuman primates from mucosal simian-human immunodeficiency virus infection.** *J Virol* 2015, **89**:8334-8345.
60. Haag F, Koch-Nolte F, Kuhl M, Lorenzen S, Thiele HG: **Premature stop codons inactivate the RT6 genes of the human and chimpanzee species.** *J Mol Biol* 1994, **243**:537-546.
61. Selby MJ, Engelhardt JJ, Quigley M, Henning KA, Chen T, Srinivasan M, Korman AJ: **Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells.** *Cancer Immunol Res* 2013, **1**:32-34.
62. Arce Vargas F, Furness AJS, Solomon I, Joshi K, Mekkaoui L, Lesko MH, Miranda Rota E, Dahan R, Georgiou A, Sledzinska A *et al.*: **Fc-optimized anti-CD25 depletes tumor-infiltrating regulatory T cells and synergizes with PD-1 blockade to eradicate established tumors.** *Immunity* 2017, **46**:577-586.
63. Buchan SL, Dou L, Remer M, Booth SG, Dunn SN, Lai C, Semmrich M, Teige I, Martensson L, Penfold CA *et al.*: **Antibodies to costimulatory receptor 4-1BB enhance anti-tumor immunity via T regulatory cell depletion and promotion of CD8 T cell effector function.** *Immunity* 2018, **49**:958-970 e957.
- This study shows that an antibody engineered to optimize both Fc γ R-dependent depletion of Tregs and Fc γ R-independent agonism delivered enhanced anti-tumor responses in several solid tumor models.
64. Schutze K, Petry K, Hambach J, Schuster N, Fumey W, Schriewer L, Rockendorf J, Menzel S, Albrecht B, Haag F *et al.*: **CD38-specific biparatopic heavy chain antibodies display potent complement-dependent cytotoxicity against multiple myeloma cells.** *Front Immunol* 2018, **9**:2553.
- This study shows that biparatopic hcAbs, generated by fusing two nanobodies that recognize independent epitopes of the target in tandem to the hinge and Fc-domains of human IgG1, display enhanced complement-dependent cytotoxicity, most likely by facilitating target oligomerization.
65. Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS *et al.*: **In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9.** *Nature* 2015, **520**:186-191.
66. Tabebordbar M, Zhu K, Cheng JKW, Chew WL, Widrick JJ, Yan WX, Maesner C, Wu EY, Xiao R, Ran FA *et al.*: **In vivo genome editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells.** *Science* 2016, **351**:407-411.

***In vivo* evaluation of mono- and bispecific biologics derived from single-chain antibodies from camelids (nanobodies): a study on their ability to modulate biological activities or to induce cell depletion.**

Nanobodies are derived from the variable part of camelid heavy chain antibodies. Among their remarkable properties, the single-chain structure confers to nanobodies the ability to be easily reformatted. In addition, nanobodies can act as modulators of biological activities. In this work, we evaluated *in vivo* the capacity of recombinant adeno-associated vectors (rAAV)-encoded nanobody-based biologics first to modulate biological activities, and then to induce cell depletion. Taking advantage of the availability of several nanobody clones in the lab, in this study the targets were the purinergic receptor P2X7 and the ADP-ribosyltransferase ARTC2.2. In the first part, we demonstrated that activation of P2X7 by ATP and NAD⁺ is blocked by 13A7-IgG1^{LSF} construct. The s+16a-dimHLE construct is a potent blocker of ARTC2.2-dependent activation of P2X7. Conversely, activation of P2X7 by ATP and NAD⁺ is potentiated by 14D5-dimHLE. 13A7-IgG1^{LSF} and s+16a-dimHLE protect CD69⁺ resident T cells and NKT cells (that express high levels of P2X7) from NAD⁺-induced cell death. In contrast, NAD⁺-induced cell death is increased by 14D5-dimHLE. An injection of NAD⁺ *in vivo* leads to the depletion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, increased by 14D5-dimHLE, while 13A7-IgG1^{LSF} protects T cells from NAD⁺-induced depletion. In the second part, we evaluated the ability of mono- or bispecific nanobody-based biologics to induce cell depletion. A single injection of rAAV encoding these constructs achieves long-lasting depletion of cells expressing the targets. In this model, the intensity of cell depletion mediated by anti-P2X7 7E2-IgG2a and anti-ARTC2.2 s-14-IgG2a constructs correlates with the antigen density on the cell surface. However, the epitope recognized and the nature of the target protein seem also to influence cell depletion. The bispecific S-14-7E2-IgG2a construct fails to achieve selective depletion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells expressing high levels of P2X7 and ARTC2.2. The intensity of cell depletion is lower than that observed with monospecific counterparts. Switching the Fc part and the co-injection of anti-CD47 monoclonal antibody did not increase the intensity of cell depletion. The injection of lower doses of rAAV results in a more selective depletion of cells of interest, suggesting that nanobody affinity and target multiplicity are to be considered. Together, these results highlight that nanobodies are versatile biologics that can be used in mono- or multi-specific formats to modulate the activity of their targets, or to deplete cells expressing them, paving the way for multiple therapeutic applications.

Keywords: nanobodies, biologics, activity modulation, cell depletion

Evaluation *in vivo* de molécules biologiques mono ou bi-spécifiques dérivées des anticorps monocaténaire de lama (nanobodies) : étude portant sur leurs capacités à moduler les activités biologiques ou à induire la déplétion cellulaire

Les nanobodies, dérivés de la partie variable des anticorps à chaîne lourde des camélidés, présentent plusieurs propriétés remarquables. Leur structure à chaîne unique leur confère la capacité d'être facilement recomposés en différents formats et ils ont la propriété de moduler des activités biologiques. Dans ce travail, nous avons évalué *in vivo* la capacité de molécules biologiques basées sur les nanobodies, vectorisées par des vecteurs adéno-associés recombinants (rAAV), d'une part à moduler des activités biologiques, et d'autre part à induire la déplétion cellulaire. Les molécules ciblées, prises comme modèles d'études, sont le récepteur purinergique P2X7 et l'ADP-ribosyltransférase ARTC2.2 pour lesquels nous disposons de différents clones de nanobodies. Dans la première partie, nous avons démontré que l'activation de P2X7 par l'ATP et le NAD⁺ est bloquée par la construction 13A7-IgG1^{LSF}. La construction s+16a-dimHLE bloque l'activation de P2X7 par l'ARTC2.2. À l'inverse, l'activation de P2X7 par l'ATP et le NAD⁺ est potentialisée par la construction 14D5-dimHLE. 13A7-IgG1^{LSF} et s+16a-dimHLE protègent les lymphocytes T résidents CD69⁺ et les lymphocytes NKT (exprimant fortement P2X7) de la mort cellulaire induite par le NAD⁺ alors qu'elle est augmentée par la construction 14D5-dimHLE. Une injection de NAD⁺ *in vivo* entraîne la déplétion des lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺. La déplétion est augmentée par la construction 14D5-dimHLE alors que 13A7-IgG1^{LSF} protège de la déplétion induite par le NAD⁺. Dans la seconde partie du travail, nous avons évalué la capacité de constructions mono- ou bispécifiques à induire la déplétion cellulaire. Une injection de rAAV codant pour ces molécules biologiques permet d'obtenir une déplétion durable des cellules exprimant les cibles. Dans ce modèle d'étude, l'intensité de la déplétion cellulaire médiée par les constructions anti-P2X7 7E2-IgG2a et anti-ARTC2.2 s-14-IgG2a corrèle avec la densité antigénique à la surface des cellules cibles. Cependant l'épitope reconnu et la nature de la protéine cible semblent également influencer la déplétion cellulaire. La construction bispécifique S-14-7E2-IgG2a ne permet pas d'obtenir une déplétion sélective des lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺ (exprimant fortement P2X7 et ARTC2.2) et le niveau de déplétion est inférieur à celui des constructions monospécifiques. La modification du fragment Fc ou la co-injection d'un anticorps monoclonal anti-CD47 n'ont pas permis d'augmenter le niveau de déplétion. L'injection de doses plus faibles de rAAV permet d'obtenir une déplétion plus sélective des cellules d'intérêt suggérant que l'affinité des nanobodies et la multiplicité de leurs cibles sont des critères importants à prendre en considération. Au total, l'ensemble de ces résultats suggère que les nanobodies constituent des molécules biologiques versatiles qui peuvent être utilisées sous des formes mono- ou multi-spécifiques, dans l'objectif de moduler l'activité de leurs cibles, ou de dépléter les cellules qui les portent, ouvrant la voie à de multiples applications thérapeutiques.

Mots-clés : nanobodies, molécules biologiques, modulation d'activité, déplétion cellulaire