

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES DE TOURS « Philippe MAUPAS »

Année 2016

N° 19

**MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE
TENANT LIEU DE THÈSE D'EXERCICE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Par

Guillaume BRACHET, né le 14 novembre 1988 à Chambray-lès-Tours (37)

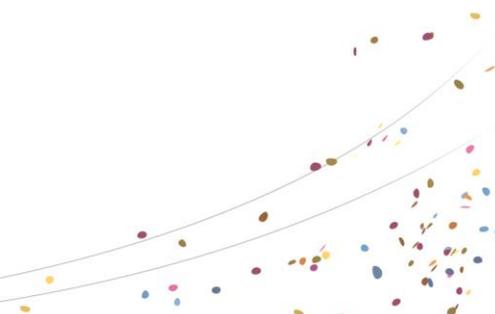
PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 27 MAI 2016

Physicochimie des anticorps thérapeutiques :
Impact de la séquence primaire sur l'agrégation

JURY

Président : M. Gilles THIBAUT Professeur, Immunologie, UFR des Sciences
Pharmaceutiques – TOURS

Membres : Dr. Nicolas AUBREY
Pr. Philippe BILLIALD
Dr. Hélène BLASCO
Pr. Hervé WATIER
Dr. Renaud RESPAUD



ANNEE : 2015 - 2016

Doyen : Pr Alain GUEIFFIER

Vice - Doyen : Pr Véronique MAUPOIL

Assesseurs : Pr Stéphane CHEVALIER, M. Hervé MARCHAIS

ENSEIGNANTS

20 PROFESSEURS

AGAFONOV	Viatcheslav	CHIMIE PHYSIQUE
ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CRECHE	Joël	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DELONCLE	Roger	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
DOMENECH	Jorge	HEMATOLOGIE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
GIRAUDEAU	Bruno	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
GUEIFFIER	Alain	CHIMIE THERAPEUTIQUE
GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL	Veronique	PHARMACOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

1 PROFESSEUR EMERITE

RIDEAU	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
---------------	-------------	--

38 MAITRES DE CONFERENCES

ALLARD	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BAKRI	Françoise	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BONNIER	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE

BOUDESOCQUE - DELAYE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
COURTOIS	Martine	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
DELAYE	Pierre-Oliver	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
JUSTE	Matthieu	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
LESAGE	Gérard	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
MARCHAIS	Hervé	PHARMACIE GALENIQUE
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MUNNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
OMBETTA-GOKA	Jean-Edouard	CHIMIE ORGANIQUE
LOUDIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VERGOTE	Jackie	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VIERRON	Emilie	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

1 DIRECTEUR DE RECHERCHE

CHALON	Sylvie	INSERM
---------------	---------------	--------

2 CHARGES DE RECHERCHE

MEVELEC	Marie-Noëlle	INRA
MOIRE	Nathalie	INRA

1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
------------------------	--------------	---------

1 AHU

RESPAUD	Renaud	CHIMIE ANALYTIQUE
----------------	---------------	-------------------

2 ATER

**BOUVIN-PLEY
CORBIN**

**Mélanie
Cyrielle**

MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE



UNIVERSITÉ FRANÇOIS RABELAIS
TOURS

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES
“PHILIPPE MAUPAS”

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e)

déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :

SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

Le(s) Directeur(s) de Thèse :

Tours, le :

Vu et Transmis :

Le Doyen



Remerciements

Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans quelques conversations et interactions, avec toutes ces personnes à la curiosité débordante. J'aimerais les remercier ici.

Merci tout d'abord à l'ensemble du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Merci également à Hervé Watier, pour toutes vos idées, vos conseils, le temps pris pour m'aider à tracer ma route, et pour votre disponibilité.

Merci à Philippe Billiald, pour m'avoir fait tomber dans les venins quand j'étais petit et pour votre bienveillance permanente.

Un grand merci à Côme Pasqualin, dont la brillante thèse d'exercice a inspiré cette approche, et qui s'est aussi chargé de la rédaction du programme de calcul sous « R ». Merci pour m'avoir accordé tes rares heures calmes, pour ton enthousiasme et pour ta patience.

Merci à Valérie Gouilleux-Gruart, pour ta bienveillance, pour ton aide, en particulier pour m'aider à revenir sur Terre quand je m'éparpille...

Merci à Renaud Respaud, de me supporter depuis le début, pendant les moments difficiles, et aussi peut-être plus dur, de supporter mon humour dans les bons moments ; d'avoir accepté de m'encadrer alors que tu étais au fait de mes aptitudes en chimie analytique, merci d'avoir relu mes « torchons », celui-ci notamment ; et merci pour ton humanité, ton goût pour la vie et ta simplicité.

Merci à la Bulle et à la plateforme PC Biomed, pour la mise à disposition de tout le matériel et des anticorps ; à toute l'équipe 1 du GICC, « Calou », « Alban pour le moral », « Vieux Boudin », « Plaquette », « M'ame Mychak & M'ame Yvon », William, Mira, Diana, Claire, J. Pottier et tous les autres pour la bonne ambiance;

Merci à Mie Bot', de me supporter au quotidien depuis tout ce temps, pour les relectures, l'aide, et tout le reste.

Merci à mes parents, ma famille et les copains, pour tout.

Merci à Kohler et Milstein, pour m'avoir donné du boulot.

« Ah ! Si l'on ôtait leurs chimères aux hommes, quels plaisirs leur resteraient. » *Fontenelle*



Manticore thérapeutique

Image d'origine : Joannes Jonstonus, 1678

Table des matières

Sommaire	1
Abréviations	2
Partie I : Introduction et contexte	3
Partie II : Analyse physico-chimique	10
II.1) Introduction	10
II.2) Matériel et Méthodes	11
II.3) Résultats et discussion	12
Partie III : Analyse bio-informatique	18
III.1) Introduction	18
III.2) Matériel et Méthodes	19
III.3) Résultats et discussion	21
Partie IV : validation externe	32
IV.1) Introduction	32
IV.2) Matériel et Méthodes	32
IV.3) Résultats et discussion	32
Partie V : Discussion et conclusion	34
Partie VI : Références	38
Partie VII : Indexe des tables et figures	45
Partie VIII : Annexes	46

Abréviations

ADCC : Antibody Dependent Cell Cytotoxicity ou cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ; CH1: premier domaine constant de la chaîne lourde ; CH2 : second domaine constant de la chaîne lourde ; CH3 : troisième domaine constant de la chaîne lourde ; CDC: Complement Dependent Cytotoxicity ou cytotoxicité dépendante du complément ; Fab: fragment antigen binding ; Fc: Fragment constant ; Fv: fragment variable ; IgG: Immunoglobuline de type G ; PBS : Phosphate Buffer Saline ou tampon phosphate ; TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha, ou facteur de nécrose tumorale alpha ; TLR : Toll-Like Receptors ou Récepteurs Toll-like.

Partie I : Introduction et contexte

Les anticorps : relation structure-fonction

Le système immunitaire est constitué d'un ensemble de cellules et de molécules fabriquées et activées en réponse à des stimuli externes. Il comporte deux composantes complémentaires et intriquées, que sont l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée correspond à un ensemble d'acteurs cellulaires et moléculaires immédiatement actifs, qui constituent une première barrière contre l'attaque par les agents pathogènes. Parmi ceux-ci, certains présentent à leur surface des molécules qui seront reconnues directement par des cellules du système immunitaire, comme les macrophages ou les polynucléaires neutrophiles, *via* des récepteurs spécifiques, par exemple les Toll-Like Receptors ou TLR. Ce mécanisme, qui est le fruit de la coévolution entre l'Homme et les agents pathogènes, est nécessaire, mais parfois insuffisant pour aboutir à l'élimination de ces derniers.

L'immunité adaptative est une autre composante du système immunitaire, complémentaire à l'immunité innée. Elle est constituée d'un ensemble de mécanismes intervenant lorsque l'agent pathogène est déjà entré dans l'organisme, et aboutit à la synthèse de protéines de défenses générées spécifiquement en réponse à ce dernier. Elle s'appuie sur la capacité des lymphocytes à générer au hasard une immense diversité de récepteurs, par des mécanismes de recombinaisons génétiques et d'hypermutations somatiques.

Les anticorps font partie de ces protéines extrêmement diverses générées par l'immunité adaptative. Ils servent d'adaptateurs entre une cible moléculaire sur une entité à détruire et un effecteur du système immunitaire. Ces protéines sont constituées de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères, associées en forme de « Y ». Les anticorps comportent deux parties distinctes en termes de structure et de fonction (Figure 1). Le Fab est la partie qui reconnaît la cible, ou « antigène », les bras du Y. Il est constitué de deux fragments variables, et de deux domaines CH1. Les domaines CH1 et CH2 des chaînes lourdes sont séparés par la charnière, très mobile, qui donne une importante flexibilité à l'anticorps. Le Fc quant à lui, correspond au corps du « Y » et est constitué par les domaines CH2 et CH3 des chaînes lourdes. Il a pour fonction de recruter des cellules et molécules du système immunitaire,

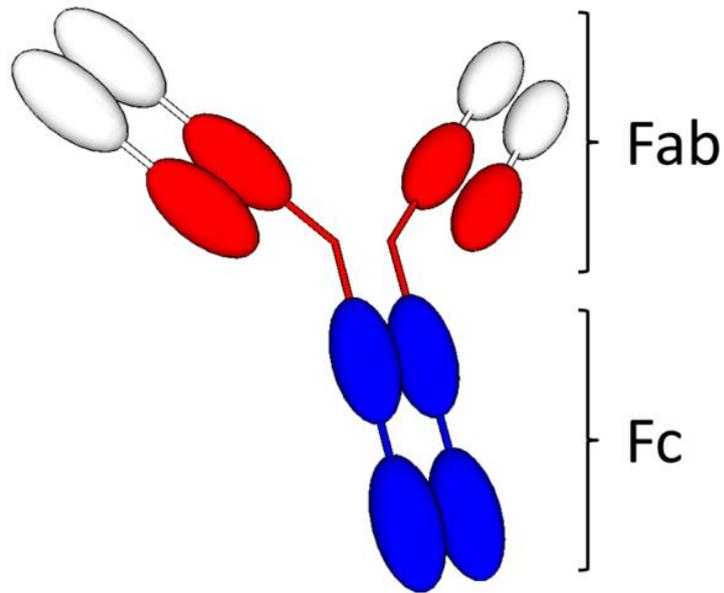


Figure 1. Schéma d'un anticorps thérapeutique. Le Fab correspond à la partie de l'anticorps chargé de reconnaître et lier la cible. Il est constitué d'un fragment variable (blanc) et du domaine constant CH1 (rouge) Le Fc (bleu) se charge de recruter les cellules et molécules du système immunitaire qui détruiront l'agent pathogène. C'est aussi la partie responsable de la longue demi-vie de ces protéines. Il est constitué des domaines CH2 (en haut) et CH3 (en bas) en bleu.

dont la fonction est de détruire l'agent pathogène qui aura été reconnu par les Fab de l'anticorps. Dans le cas des Immunoglobulines G ou IgG, ces partenaires sont représentés notamment par les macrophages, cellules chargées de phagocyter les agents pathogènes, et les protéines du système du complément. La fixation et l'activation de ces dernières par les IgG aboutira à la formation de pores dans la membrane du pathogène, qui causeront la lyse de ce dernier. La possibilité de créer des anticorps de type IgG dirigés contre une cible moléculaire prédéfinie permet donc de favoriser la dégradation d'un pathogène porteur de cette cible, en redirigeant le système immunitaire à son encontre.

Anticorps thérapeutiques : de l'ingénierie à la clinique

En 1975, Kohler et Milstein ont montré que l'on pouvait faire fusionner des lymphocytes B, synthétiseurs physiologiques d'anticorps, avec des cellules de myélome murin. Le produit de la fusion de ces cellules, appelé « hybridome », est capable de produire un anticorps unique indéfiniment. Ce procédé d'ingénierie cellulaire est toujours employé de nos jours, même si de nouvelles technologies sont apparues depuis.¹ En effet, il est désormais possible de faire fabriquer par des cellules génétiquement modifiées des anticorps dont la séquence est parfaitement déterminée à l'avance. Cela permet entre autres de modifier certains résidus voire des portions entières de séquence. Ces modifications ont pour but d'améliorer les capacités de l'anticorps en question, que ce soit pour le rendre plus efficace, mieux toléré, voire de générer des protéines chimériques, comme par exemple des récepteurs fusionnés à un Fc d'IgG, ce qui permet d'allonger leur demi-vie plasmatique.² Cette malléabilité est l'une des clés du succès de ces protéines en thérapeutique. Une autre raison à ce succès est la grande spécificité des anticorps pour leur cible, ce qui limite les effets indésirables. Les anticorps ont été introduits en thérapeutique dans les années 90 et constituent désormais une classe de médicaments à succès.³ Depuis le développement du premier blockbuster de cette classe, le rituximab, le nombre d'autorisations de mise sur le marché par an pour les anticorps thérapeutiques ne cesse d'augmenter.⁴⁻¹⁰ S'il en existe une cinquantaine à l'heure actuelle sur le marché français, le nombre de ces molécules en phase d'essai clinique est estimé à 500 environ, réparties dans de nombreux domaines thérapeutiques. En effet, il existe des anticorps monoclonaux pour le traitement de pathologies cancéreuses (rituximab, trastuzumab, cétuximab...), inflammatoires chroniques (infiximab, golimumab,

adalimumab...), mais aussi en ophtalmologie (bevacizumab, ranibizumab), ou encore dans des domaines comme la cardiologie (évolocumab, alirocumab).¹¹ Malgré leur efficacité et les nombreuses avancées en thérapeutique, les anticorps thérapeutiques présentent un certain nombre de problématiques liées à leur fabrication et à leur utilisation.

Immunogénicité des anticorps thérapeutiques

La classe des anticorps thérapeutiques, appartenant aux biomédicaments, présente des caractéristiques physicochimiques et biologiques très différentes de celles des molécules thérapeutiques issues de la chimie. Parmi les problématiques liées à l'utilisation de cette classe médicamenteuse se trouve l'immunisation, même si cette dernière ne constitue pas un phénomène spécifique. L'immunisation est la conséquence de la reconnaissance de l'anticorps thérapeutique par l'immunité adaptative du patient comme une protéine étrangère ou « xéno-antigène ». Le médicament devient alors à son tour, au regard du système immunitaire, un agent potentiellement dangereux que l'organisme du patient contre-attaque en fabriquant des anticorps anti-médicament. Ces anticorps-anti-anticorps se lient au médicament, accélérant son élimination.¹²

L'immunisation à l'encontre d'un anticorps thérapeutique est favorisée par plusieurs facteurs liés à la séquence, à la stabilité ou au mode d'administration de ces médicaments. Dans certaines pathologies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, elle pose des problèmes de par sa fréquence.¹³ Dans ces pathologies à forte composante inflammatoire, il est fréquemment observé une immunisation à l'encontre de l'anticorps, pouvant être limitée par la co-administration de médicaments immunosuppresseurs, comme le méthotrexate.¹⁴ Dans ce contexte, le suivi biologique de l'apparition des anticorps anti-anticorps thérapeutique peut amener le prescripteur à changer de ligne de traitement afin d'anticiper les conséquences cliniques de la perte d'efficacité liée à l'immunisation.¹⁵

Parmi les facteurs d'immunisation liés au schéma d'administration, l'exposition quantitative au médicament semble jouer un rôle important. En effet, dans le cas des anti-TNF α , l'apparition d'anticorps anti-anticorps, en favorisant une sous-exposition au médicament majorerait l'immunisation à son égard, et l'administration de doses d'anticorps plus importantes diminuerait le risque d'immunisation.¹⁶ A l'inverse, l'administration de doses

importantes, en permettant une forte exposition et surtout continue au médicament, favoriserait la tolérance de l'organisme à ces protéines thérapeutiques.^{13,17} Ce phénomène a été décrit dans la littérature comme « high-zone tolerance » ou tolérance induite par une forte exposition.¹⁶

Certains facteurs potentiels comme le degré d'humanisation, soit la ressemblance avec les anticorps « naturels » de l'Homme, même si toujours évoqués, sont largement discutés. Si certains anticorps entièrement murins, comme le muromonab, se sont montrés immunogènes, c'est également le cas pour beaucoup d'anticorps humanisés ou humains.¹⁸

On considère de plus en plus que la principale source d'immunisation directement liée à la séquence est la présence d'épitopes reconnus par les lymphocytes B et T.^{19,20}

Enfin, parmi les autres facteurs potentiellement impliqués dans l'immunisation, on trouve des problématiques liées à la stabilité du médicament en lui-même. Alors que la péremption des médicaments « classiques », issus de la chimie se traduit souvent par la transformation du principe actif, soit en une ou plusieurs molécules inefficaces ou toxiques, le vieillissement des biomédicaments aboutit à une diminution de leur stabilité colloïdale en solution.²¹ Cette baisse de stabilité se traduit, notamment, par une augmentation de la proportion d'agrégats contenus dans la solution thérapeutique. Chez la souris, il a été décrit de plus forts taux d'immunisation à l'encontre de protéines thérapeutiques présentant de plus fortes proportions d'agrégats protéiques.^{22,23}

En effet, si les anticorps de type IgG sont des protéines exerçant leur action sous forme de monomère, il existe un équilibre thermodynamique entre cette forme et la forme dimérique, où deux anticorps s'associent entre eux de façon non covalente et réversible. Ce phénomène, appelé « nucléation », sert de base à la formation d'agrégats plus gros, qui sont des polymères d'anticorps.²⁴

L'agrégation est un problème bien connu et très décrit dans la littérature, et de nombreux facteurs facilitants ont été décrits, comme :

- De fortes concentrations en anticorps, qui sont pourtant souhaitables pour diminuer les volumes fabriqués ou également pour une administration sous-cutanée,²⁵
- Le type et le nombre de glycosylations, paramètre complexe et dépendant de la lignée d'expression,²⁶⁻³¹
- La formulation galénique, et donc les excipients employés, et notamment la force

ionique,^{32,33}

- Les conditions de stockage de l'anticorps comme la durée, la température, l'agitation, l'exposition à la lumière, ou à l'oxygène de l'air,^{21,34}

- Enfin, la séquence primaire et notamment certains motifs d'acides aminés, des séquences courtes « pro-agrégantes », bien que certains motifs soient également décrits comme « anti-agrégants »,³⁵⁻³⁷

Ces facteurs sont importants à prendre en compte car ils sont pour certains (comme la séquence primaire en acides aminés) déterminés très précocement dans le développement du candidat-médicament. La séquence primaire étant fixée pour un biomédicament donné, il est en effet impossible d'intervenir sur cette séquence sans devoir recommencer les essais précliniques.

Dans ce travail, nous avons donc cherché à savoir si la nature des acides aminés exposés à la surface d'un anticorps pouvait avoir un impact sur sa propension à l'agrégation en solution. Nous avons étudié les séquences d'anticorps ayant déjà obtenu leur autorisation de mise sur le marché, et observé à l'aide de techniques chromatographiques la proportion d'agrégats contenus dans des solutions d'anticorps analysées dans les mêmes conditions (même concentration, même tampon). Nous avons ensuite tenté d'élucider les facteurs responsables des différences de taux d'agrégats dans ces solutions à l'aide d'approches bio-informatiques telles que l'analyse des propriétés physicochimiques des résidus les plus exposés ou l'analyse de la répartition de ces résidus à la surface des anticorps.

Nom commercial	DCI	Sous-type	Concentration (mg/mL)	Tampon pH	Tensioactif	Agent de tonicité
Avastin	Bevacizumab	IgG1κ	25	Phosphate	Polysorbate 20	Tréhalose
Erbix	Cetuximab	IgG1κ	5	Citrate	Polysorbate 80	NaCl / Glycine
Empliciti	Elotuzumab	IgG1κ	25	Citrate	Polysorbate 80	Sucrose
Herceptin	Trastuzumab	IgG1κ	21	Histidine	Polysorbate 20	Tréhalose
Humira	Adalimumab	IgG1κ	50	Citrate / Phosphate	Polysorbate 80	NaCl / Mannitol
Mabthera	Rituximab	IgG1κ	10	Citrate	Polysorbate 80	NaCl
Perjeta	Pertuzumab	IgG1κ	30	Histidine	Polysorbate 20	Saccharose
Remicade	Infliximab	IgG1κ	10	Phosphate	Polysorbate 80	Saccharose
Simulect	Basiliximab	IgG1κ	4	Phosphate		Mannitol / NaCl / Saccharose / Glycine

Tableau 1. Liste des formulations commerciales d'anticorps utilisés pour cette étude. Ces formulations sont prévues pour administration intraveineuse après dilution, à l'exception de l'adalimumab qui est fourni sous forme de seringue ou de stylo pour auto-injection sous-cutanée.

Partie II : Analyse physico-chimique

II.1) Introduction

L'objectif de ce travail est de déterminer si des résidus d'acides aminés à des positions spécifiques de la séquence primaire d'un anticorps thérapeutique peuvent avoir un impact sur sa propension à l'agrégation.

L'analyse physico-chimique a pour but de mesurer la proportion d'agrégats contenus au sein de solutions comparables de ces anticorps. Les différences de proportions d'agrégats entre les anticorps seront confrontées aux différences entre leurs séquences peptidiques. Le but de l'étude est de voir si certains résidus d'acides aminés sont plus volontiers retrouvés dans les anticorps présentant plus d'agrégats. Nous avons donc choisi d'analyser des anticorps ayant reçu leur autorisation de mise sur le marché, tous de type IgG1 κ . Cette sous-classe est la plus fréquemment retrouvée à l'heure actuelle parmi les anticorps thérapeutiques, parce qu'elle présente un bon profil de recrutement des effecteurs du système immunitaire. Ceci permet d'avoir une bonne activité sur la cible notamment en termes de cytotoxicité dépendante des cellules effectrices (Antibody Dependent Cell Cytotoxicity ou ADCC) ou du complément (Complement Dependent Cytotoxicity ou CDC). Le fait d'étudier des anticorps d'une seule sous-classe permet également de s'affranchir d'un facteur de variabilité supplémentaire, même s'il n'existe pas de données de la littérature indiquant qu'une sous-classe possède une plus forte propension à l'agrégation que les autres. Afin de limiter les autres facteurs de variabilité, ces anticorps ont été préparés à une concentration identique, dans un même tampon (tampon phosphate ou PBS). En effet, des différences de salinité du tampon ou de concentration en anticorps peuvent avoir un impact sur le taux d'agrégats contenus en solution.³³ Or, les solutions commerciales de ces différents anticorps ont des compositions très variables, avec de nombreux excipients (Tableau 1). De plus, les concentrations en anticorps de ces différentes solutions commerciales sont très différentes, et vont de quatre à cent grammes par litre.

Les anticorps choisis pour l'étude possèdent majoritairement des indications en oncologie ou onco-hématologie (77,8%), mais également en rhumatologie (33,3%), ophtalmologie (11,1%), médecine interne (11,1%), et en transplantation rénale (11,1%). La somme des

proportions des indications dépasse les 100% car certains de ces anticorps possèdent des indications dans plusieurs catégories de pathologies, à l'instar du rituximab, indiqué à la fois dans le traitement de pathologies cancéreuses comme le lymphome folliculaire, de connectivites comme la polyarthrite rhumatoïde, et d'autres pathologies auto-immunes comme la maladie de Wegener.

II.2) Matériel et Méthodes

Anticorps :

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

Pour chacune de ces solutions d'anticorps, il a été prélevé un volume correspondant à deux milligrammes d'anticorps. La concentration ainsi que le tampon sont fixés, et après rinçage, l'analyse chromatographique a été effectuée et répétée trois fois à une semaine d'intervalle.

Formulation :

Le tampon de formulation commerciale a été échangé pour du tampon phosphate ou PBS, à pH 7,2. Pour effectuer cette opération, nous avons pris un volume de chaque solution commerciale contenant deux milligrammes d'anticorps afin que la concentration dans un volume final de 2mL de PBS soit égale à 1mg/mL. On effectue l'échange de solvant à l'aide de filtres ultracentrifugeables (Pierce Concentrators) équipés de membranes de cellulose régénérée d'une perméabilité limite de 9kDa. Après trois rinçages avec du PBS par centrifugation à 1100g pendant 45minutes, on ajuste le volume à 2mL par filtre, puis chaque solution est filtrée à 0,22µm et stockée dans des flacons en verre à +4°C.

Analyse chromatographique :

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

Les chromatogrammes ainsi que les signaux de diffusion de lumière sont traités à l'aide du logiciel Astra version 6.0.6 (Wyatt Technology Europe). Les résultats en proportions de dimères et d'oligomères sont exprimés en moyenne sur la totalité des injections. On évalue également la perte protéique de chaque solution d'anticorps sur la durée totale des analyses.

II.3) Résultats et discussion

Les caractéristiques des anticorps injectés ainsi que les taux de dimères obtenus sont consignés dans le tableau 2. Les taux de dimères observés sont restés constants au cours des trois semaines d'étude. La perte protéique en anticorps entre le premier et le dernier jour était contenue entre 1,5 et 8,7% de perte en masse, mesurée au réfractomètre. Pour l'elotuzumab, il a été mesuré une augmentation apparente de la quantité d'anticorps sur cette période, qui à ce jour, n'a pas pu être expliquée. En effet, la solution utilisée était la même pour toute la durée de l'étude.

Des chromatogrammes représentatifs des injections en exclusion stérique sont présentés en figures 2 et 3. Parmi ces anticorps, aucun taux de dimères n'excède les 3% (bevacizumab). Pour certains, comme l'infliximab ou le basiliximab, il y a même absence totale de dimères détectables par la technique de chromatographie d'exclusion stérique. Dans le contexte du développement d'un anticorps thérapeutique, un seuil de 5% de dimères est considéré comme la limite au-dessus de laquelle un anticorps ou sa formulation doit être optimisé.³⁶ Aucun anticorps étudié n'atteignait ce seuil, ce qui était attendu puisque ce sont des médicaments autorisés.

Tableau 2

Nom	Adalimumab Trastuzumab Infliximab Rituximab Cetuximab Bevacizumab Basiliximab Pertuzumab Elotuzumab									
Spécialité	Humira	Herceptin	Remicade	Mabthera	Erbitux	Avastin	Simulect	Perjeta	Empliciti	
Compagnie	Abbvie	Genentech	Centocor	Genentech	BMS	Genentech	Novartis	Genentech	BMS/Abbvie	
Lignée d'expression*	CHO	CHO	MM	CHO	MM	CHO	MM	CHO	CHO	MM
Dimères mesurés (%)	0,14	0,18	0,00	0,15	0,15	3,00	0,00	0,13	0,85	
Diminution de quantité mesurée entre J1 et J15 (%)	2,2	2,3	8,7	2,7	1,5	5,3	2	3	-7,5	

*CHO: Chinese Hamster Ovary; MM: Murine Myeloma

Au vu des résultats de l'analyse chromatographique, et notamment le fait que certains anticorps ne présentaient pas d'agrégats, un seuil de 0,15% d'agrégats a été choisi pour différencier deux catégories. Les anticorps possédant un taux de dimères strictement inférieur à 0,15% ont été classés dans la catégorie « BONS ». Ceux qui possédaient un taux de dimères supérieur ou égal à 0,15% ont été classés dans la catégorie « MAUVAIS ». Ce seuil arbitraire a été choisi, notamment, pour obtenir des catégories avec des effectifs suffisamment importants.

De nombreux facteurs peuvent être responsables de la propension à l'agrégation, comme:

- des paramètres extrinsèques à l'anticorps comme la force ionique du solvant ou la concentration en anticorps.^{32,33,38}

Ces paramètres sont liés à la formulation de l'anticorps. Ils sont déterminés par le fabricant en fonction de la stabilité souhaitée et de la voie d'administration,

- des paramètres de vieillissement comme la fragmentation induite par exposition à la lumière, ou l'oxydation induite par exposition à l'air,²¹

- et enfin des paramètres intrinsèques comme le profil de glycosylation, déterminé par la nature de la cellule productrice, et la séquence primaire, qui est caractéristique d'un anticorps thérapeutique.

Nos conditions ont permis de maîtriser les paramètres extrinsèques, en fixant à la fois la concentration en anticorps et la nature du tampon. Le biais lié aux paramètres de vieillissement ont été contenus en utilisant des anticorps n'ayant pas dépassé la date de péremption. Nous avons vérifié que les différences d'agrégation observées n'étaient pas dues à des facteurs évidents tels que le fabricant ou la lignée d'expression.

Les différences en termes de glycosylation sont quant à elles un biais compliqué à contourner. En effet, une lignée d'expression, qu'il s'agisse d'un hybridome murin ou d'une lignée d'ovaire de hamster, va introduire des sucres ramifiés sur l'asparagine en position 297 (N297) des chaînes lourdes de l'anticorps. Si l'absence totale de sucre sur N297 a été clairement décrite comme une cause d'agrégation,^{27,31}

Les différentes combinaisons de sucres introduites de façon hétérogène par le système d'expression sont plus difficiles à étudier.

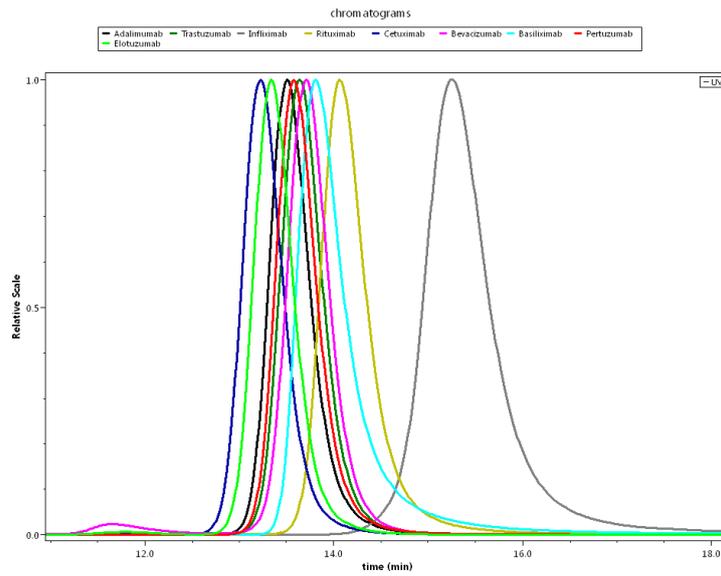


Figure 2. Chromatogrammes obtenus en chromatographie d'exclusion stérique. Les pics ayant une hauteur relative de 1 sont l'espèce monomérique, majoritaire au sein de toutes les solutions. Les pics élués aux alentours de 12 minutes sont des dimères d'anticorps.

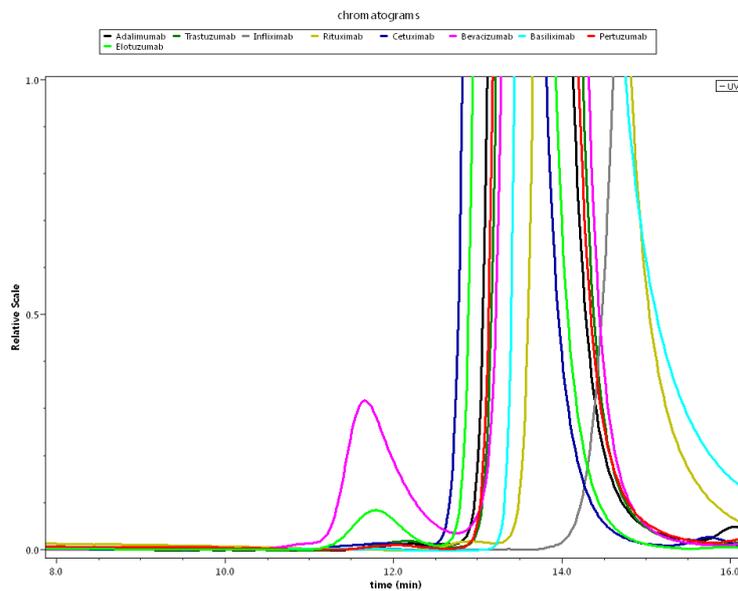


Figure 3. Détail des chromatogrammes obtenus en exclusion stérique. Les deux pics à 12 minutes sont les dimères du bevacizumab (magenta) et de l'elotuzumab (vert clair).

En effet, un seul lot d'anticorps thérapeutique peut contenir plusieurs dizaines de glycoformes différentes, dont quelques-unes seront majoritaires, et toutes les autres seront simplement détectables.³⁹

De ce fait, la caractérisation de l'effet de chaque population, bien que scientifiquement pertinente, n'est techniquement pas réalisable, de par la difficulté que représente la séparation et la collecte des différentes glycoformes. Néanmoins, certaines études ont étudié l'impact de certains sucres sur l'agrégabilité, les paramètres pharmacocinétiques ou les fonctions effectrices. Ainsi, Okbazaghi *et al.* montrent que pour des sucres tels que des formes « high-mannose », des mélanges mannose et N-acetylglucosamine ou N-acetylglucosamine seule sur la position N297, il n'existe pas de différences en termes d'agrégabilité.⁴⁰

En collectant des pics de monomères et de dimères en chromatographie d'exclusion stérique, d'autres auteurs ont quant à eux pu mettre en évidence des proportions différentes de formes galactosylées et fucosylées, avec une diminution de ces formes allant de 70 à 80% entre les fractions de dimères et de monomères.⁴¹

Cette étude portait toutefois sur un anticorps bispécifique non commercialisé et dont le sous-type n'est pas explicité, et ne permet donc pas de généraliser aux anticorps sur le marché. Une autre approche pour contourner le biais lié aux différences de glycosylation est la déglycosylation enzymatique systématique de toutes les solutions étudiées. Néanmoins, les espèces ainsi obtenues subissent des stress supplémentaires (exposition à une température de 37°C sur des temps longs, problématique d'élimination de l'enzyme...) qui rendent nécessaires des caractérisations supplémentaires des solutions traitées par chromatographie, électrophorèse et spectrométrie de masse, coûteuses, chronophages et fastidieuses. La pertinence de ces analyses n'étant pas assurée par les données de la littérature, cette approche n'a pas été retenue.

Enfin, plusieurs équipes ont étudié l'impact de la séquence en acides aminés sur l'agrégation. Il a été décrit des motifs pro-agrégants dans la séquence primaire d'anticorps en développement ou commercialisés.³⁵⁻³⁷

Des outils informatiques ayant pour but de prédire la formation de plaques amyloïdes dans des protéines, tels que le logiciel TANGO sont utilisés dans les travaux de Wang pour la recherche de régions à risque, tandis que d'autres équipes ont choisi de développer leur

propre outil de prédiction en validant ces modèles par des mesures de taux d'agrégats sur les anticorps concernés.³⁶

Nous avons donc adopté une stratégie similaire, mais en nous focalisant sur des anticorps ayant une AMM afin de chercher, au sein d'anticorps possédant déjà des caractéristiques physicochimiques intéressantes, les positions qui permettraient d'atteindre des objectifs plus stricts en termes d'agrégation.

En conclusion, l'analyse chromatographique des neuf anticorps testés révèle : d'une part, que ces anticorps sont assez stables, y compris en dehors de leur tampon d'origine (et ce malgré la centrifugation préparative qui constitue un stress mécanique) ; et d'autre part, que ces anticorps, bien que tous de type IgG1 κ , présentent des disparités en termes de taux d'agrégation (même si ces taux restent acceptables).

Nous avons donc cherché à comprendre la part d'implication de la séquence primaire sur ces différences d'agrégabilité. Deux types d'approches ont été appliqués :

- une étude par comparaison des séquences primaires, visant à mettre en évidence des différences entre les résidus les plus exposés au solvant ;

- et une approche spatiale, visant à identifier d'éventuels regroupements de résidus chargés ou hydrophobes dans les structures publiées issues de la cristallographie.

Partie III : Analyse bio-informatique

III.1) Introduction

Afin d'interpréter les données obtenues grâce à l'analyse chromatographique en exclusion stérique, nous nous sommes intéressés à la séquence primaire des anticorps étudiés. Nous avons cherché ces séquences, soit dans des bases de données en ligne, soit dans les brevets de ces anticorps. La principale source de séquences en ligne utilisée ici est IMGT. Il s'agit d'une base de données développée par Lefranc *et al.* et qui présente l'avantage d'une numérotation unique appelée IMGT numbering.^{42,43}

Ainsi, une position chiffrée donnée correspondra à une position dans l'espace, malgré les différences en termes de longueur des CDR voire des éventuelles insertions et délétions au sein de la séquence même de l'anticorps. D'autres bases de données ont été utilisées lorsque les séquences ne pouvaient être trouvées dans IMGT, comme TABS, qui est une base de données privée destinée aux développeurs d'anticorps thérapeutiques.

L'agrégation correspond à une interaction non covalente entre deux ou plusieurs anticorps de la même espèce. Cette interaction se fait par la surface des anticorps, et les résidus impliqués seront donc des résidus exposés au solvant. Afin de chercher les positions pertinentes à comparer, il faut donc connaître celles qui sont exposées à la surface de l'anticorps. L'outil ASAview permet de déterminer à partir d'une structure 3D issue de la littérature quelle proportion de la surface d'un résidu d'acide aminé est accessible au solvant.⁴⁴

Les séquences d'anticorps ont ensuite été alignées et comparées. Afin d'évaluer l'accessibilité au solvant d'un résidu, il est admis qu'une exposition de 20% est considérée comme significative dans les modèles cristallographiques.⁴⁵

Par ailleurs, chaque résidu d'acide aminé a été défini par ses propriétés physicochimiques : volume, charge, hydrophobie, polarité et capacité à donner ou accepter une liaison hydrogène.

Pour chaque position donnée, nous avons testé l'association entre chaque caractéristique d'un résidu et la propension à l'agrégation de l'anticorps.

Pour les deux extrêmes opposés en termes de quantité d'agrégats, nommément l'infliximab et le bévacizumab, nous avons également recherché visuellement des différences de répartition des résidus chargés et des résidus hydrophobes de surface.

III.2) Matériel et méthodes

Pour effectuer l'analyse statistique, nous avons classé les anticorps en deux catégories : les « bons », présentant très peu d'agrégats, et les « mauvais », qui en présentaient plus. Les paramètres physicochimiques des résidus ont été codés par des chiffres. La moyenne de la catégorie des bons anticorps a été confrontée à la moyenne de la catégorie des mauvais, pour chaque paramètre physicochimique, à chaque position testée.

Séquences d'anticorps et alignements

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

Structures

Les structures en cristallographie de l'adalimumab, du trastuzumab, de l'infliximab, du rituximab, du cétuximab, du bévacizumab, du basiliximab, et du pertuzumab utilisées sont respectivement consignées sous les identifiants PDB suivants : 3WD5, 4HKZ, 4G3Y, 2OSL, 1YY8, 1BJ1, 1MIM, et 1L7I.⁴⁶⁻⁵³

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

Les paramètres étudiés sont au nombre de cinq : l'hydropathie, le volume, la charge, la

polarité, et le statut de donneur ou accepteur d'hydrogène. Ces catégories sont respectivement nommées « hydropathy », « volume », « charge », « polarity », et « hydrogen ». La matrice est ainsi dupliquée, afin de pouvoir remplacer chaque acide aminé par le nombre qui chiffrera le paramètre considéré, selon les classes décrites par Pommié *et al.*⁵⁴

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

Analyse des matrices

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

Analyse de la répartition des résidus chargés et des résidus hydrophobes

Les structures de l'inflximab et du bevacizumab ont été utilisées. Les résidus chargés et hydrophobes dont l'ASA est supérieur ou égal à 20% sont consignés sous forme de tableau.

Afin de visualiser des différences de répartition qui pourraient générer des zones hydrophobes ou des zones chargées à la surface des Fab, et être la source des différences d'agrégation, ces résidus sont visualisés sur la structure issue de la cristallographie grâce au logiciel VMD.⁵⁵

III.3) Résultats et discussion

Analyse matricielle

L'analyse des facteurs favorisant l'agrégation est complexe. En effet, les causes potentielles de dimérisation sont multiples : solvant, concentration en anticorps, déglycosylation, oxydation de la protéine, et agencement des résidus d'acides aminés dans la séquence et dans l'espace.^{21,27,31-33,38,41}

Si l'on peut s'affranchir en partie de certaines causes de biais, comme les différences de concentration ou de solvant, d'autres sont inévitables comme les différences potentielles de profil de glycosylation, ou difficiles d'accès, comme le statut d'oxydation des méthionines, qui a également été incriminée dans l'agrégation de protéines thérapeutiques, même si ce phénomène n'a pas pu être confirmé pour les anticorps de type IgG1.^{56,57} Nous avons donc décidé de nous affranchir de cette analyse. La plupart des causes potentielles de biais étant ici jugulées ou identifiées, le protocole d'analyse a été validé et poursuivi.

Afin de déterminer quels étaient les résidus à comparer au sein des séquences des neuf anticorps utilisés dans l'analyse physicochimique, nous avons aligné les séquences primaires (figure 4). Les résidus les plus exposés sont identifiés par analyse des structures publiées grâce au logiciel ASAview. Seuls les résidus pour lesquels l'accessibilité au solvant était strictement supérieure à 20% (pour tous les anticorps) ont été conservés pour l'analyse.

Les matrices générées pour chaque paramètre physicochimique ont été analysées, les résultats sont consignés, par position, dans le tableau 3.

Parmi les neuf anticorps analysés, seulement huit disposaient de structures de Fab publiées (tous sauf l'élotuzumab). La plupart des différences étaient contenues dans les fragments variables. Les fragments constants étaient très conservés, et correspondaient majoritairement à deux séquences. Ces deux séquences de chaîne lourde IgG1 correspondent à un polymorphisme appelé allotype. L'allotype des différents anticorps testés n'étant pas corrélable aux différences en termes d'agrégation observées dans notre étude, la séquence des chaînes lourdes a été écartée de l'analyse.

Position	hydropathy	volume	charge	polarity	hydrogen
1	NA	0,373	0,373	NA	0,373
3	0,101	0,373	NA	0,101	0,101
9	0,101	0,637	NA	0,101	0,101
15	0,101	0,101	NA	NA	NA
18	NA	NA	NA	NA	NA
24	0,722	0,722	0,722	NA	0,722
28	0,048	0,258	0,037	0,373	0,053
40	NA	NA	NA	NA	NA
41	NA	NA	NA	0,373	0,373
42	0,373	0,373	NA	0,373	0,373
43	0,101	0,112	0,101	0,373	0,116
46	NA	NA	NA	NA	NA
55	1,000	0,373	0,722	0,766	1,000
57	NA	0,722	NA	NA	NA
61	0,165	0,860	0,239	0,373	0,165
67	0,239	0,239	0,239	0,239	0,239
71	0,373	0,373	0,373	NA	0,373
77	0,373	0,373	NA	NA	NA
78	0,637	0,377	0,637	NA	0,637
80	NA	NA	0,101	NA	0,101
102	0,112	0,101	NA	0,209	0,209
105	NA	0,637	0,637	NA	0,637

Chaîne lourde					
Position	hydropathy	volume	charge	polarity	hydrogen
1	0,637	0,637	0,758	NA	0,758
3	0,637	0,373	1,000	0,637	1,000
5	0,112	0,373	0,759	0,209	0,220
7	0,637	0,373	0,637	0,373	0,373
13	0,637	0,377	0,377	0,637	0,377
19	1,000	1,000	0,377	0,637	0,377
23	0,220	0,120	0,377	0,373	0,220
28	0,194	1,000	0,216	0,373	0,165
42	0,373	0,377	1,000	1,000	1,000
64	0,155	0,074	0,885	0,209	0,496
65	0,665	0,276	0,568	0,373	0,785
67	1,000	0,377	0,217	0,637	0,217
75	0,637	0,637	0,637	0,637	0,637
77	0,537	0,637	0,637	1,000	1,000
78	0,373	0,377	0,377	0,637	0,377
89	0,637	0,217	0,217	0,637	0,217
90	0,112	0,377	0,637	0,209	0,209
91	0,637	1,000	0,373	0,637	0,373
95	0,637	0,373	0,637	0,637	0,637
123	1,000	1,000	0,637	0,373	0,373
126	0,217	0,217	0,637	0,373	0,373
131	0,758	0,637	0,637	0,209	0,209
228	0,637	0,637	0,637	0,637	0,637

Tableau 3. Résultats de l'analyse matricielle. Les valeurs données dans le tableau sont les p-values de la différence des moyennes des paramètres entre la catégorie « BONS » et la catégorie « MAUVAIS ». Les positions avec le fond en jaune sont celles qui ont une p-value approchant de 0,1. Les positions avec un fond orangé sont celles pour lesquelles la p-value est comprise entre 0,05 et 0,1. Les positions avec un fond rouge sont celles pour lesquelles la p-value est inférieure à 0,05.

Pour le reste de l'étude, nous nous concentrons sur les Fab. Les positions strictement conservées ainsi que les positions non conservées mais dont le coefficient d'accessibilité au solvant est inférieur à 20% sont écartées. Sur les 21 positions testées, aucune ne donne de résultat significatif au sein de la chaîne lourde. Sur la chaîne légère, une position ressort statistiquement significative de cette analyse, avec une p-value de 0,048 pour le paramètre « hydrophatie » et de 0,037 pour le paramètre « charge ». Cette position correspond à la position 28 sur l'alignement et en numérotation IMGT.⁴³

Elle est incluse dans le CDR1 (figure 5). Dans le cas des anticorps de la catégorie « BONS », elle est occupée dans 3 cas sur 6 par une sérine, acide aminé non chargé (charge) et neutre (hydrophilie), et dans les trois autres cas respectivement par une glycine, résidu non chargé et neutre, une phénylalanine, non chargée et hydrophobe, et un acide aspartique, chargé et hydrophile, comme indiqué dans le tableau 4. Le pertuzumab est un cas particulier, puisqu'il présente en position 28 un acide aspartique, qui est un résidu hydrophile et chargé retrouvé à la même position pour tous les anticorps du groupe « MAUVAIS ». En effet, pour ces derniers, cette position est occupée strictement par un acide aspartique.

Ces résultats rappellent l'importance de la séquence des CDR. En effet, ces anticorps présentent des séquences très proches. La structure primaire est très étudiée car il a été montré qu'elle pouvait augmenter la propension à l'agrégation, notamment par la présence de motifs pro-agrégants.^{35,37}

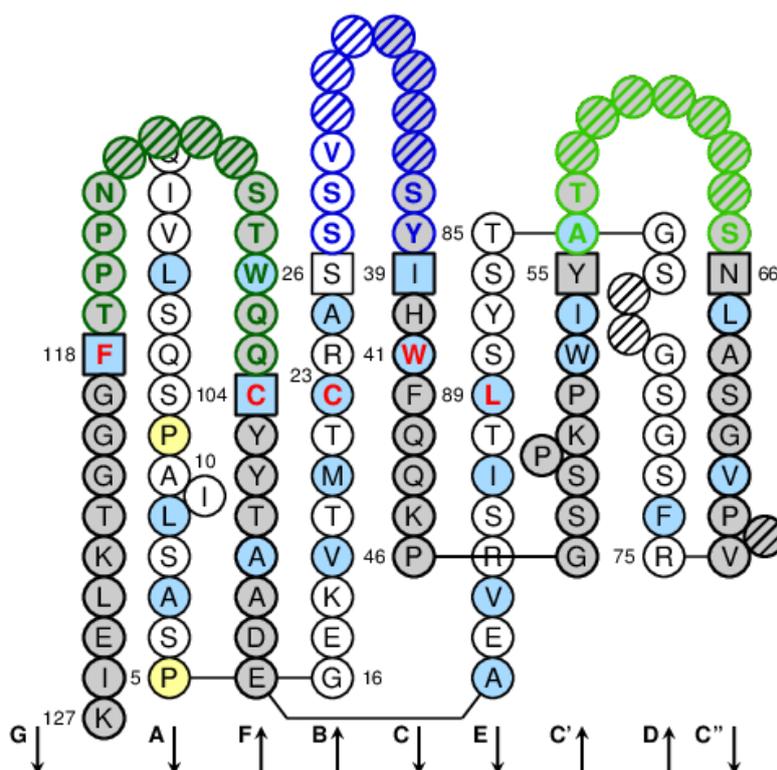


Figure 5. Représentation sur deux couches du fragment variable de la chaîne légère du rituximab, selon IMGT « Collier de Perles ». Le CDR1 est constitué par les résidus encadrés en bleu, le CDR2 par des résidus encadrés en vert clair et le CDR3 par des résidus encadrés en vert sombre. Les positions inoccupées dans le cas de cet anticorps sont représentées avec un fond hachuré.

	Bons						Mauvais		
	Ada	Ifx	Rtx	Ctx	Bsx	Ptz	Ttz	Bvz	Etz
Chaîne légère résidu 28	G	F	S	S	S	D	D	D	D
Hydrophathie	Neutre	Hydrophobe	Neutre	Neutre	Neutre	Hydrophile	Hydrophile	Hydrophile	Hydrophile
Charge	Non	Non	Non	Non	Non	Positive	Positive	Positive	Positive
%dimères	0,14	0,00	0,15	0,15	0,00	0,13	0,18	3,00	0,85

Tableau 4. Résidus présents sur la position 28 de la chaîne légère des différents anticorps analysés. Légende : adalimumab : Ada, infliximab : Ifx, rituximab : Rtx, cétximab : Ctx, basiliximab : Bsx, pertuzumab : Ptz, trastuzumab : Ttz, bévacizumab : Bvz, élotuzumab : Etz.

De nombreux outils informatiques ont été développés pour tenter de prédire la propension à l'agrégation d'un candidat-médicament.^{36,58,59} Certains de ces outils se basent sur les connaissances acquises dans les pathologies à dépôt de protéines amyloïdes, et identifient des motifs au sein d'anticorps commerciaux qui seraient source d'agrégation.³⁷ Ces motifs ont pu être retrouvés pour certains dans l'intégralité des anticorps de notre étude, comme la séquence « SVFIFP » au début du domaine constant de la chaîne légère.

D'autres études se basent sur de l'apprentissage informatique basé sur des données d'agrégation. Obrezanova *et al.* ont ainsi utilisé des séquences publiées dans la littérature et développé au hasard des centaines de séquences générées au hasard grâce à des systèmes de culture cellulaire à haut débit pour générer un grand panel de séquences dans les mêmes conditions et pouvoir générer un set d'apprentissage très étendu.³⁶ Cet algorithme semi-quantitatif montre une prédiction des risques d'agrégation aux alentours de 85% et a montré de meilleures performances que celui de Lauer *et al.*, à visée quantitative. Ce dernier se base sur la propension à l'agrégation des CDR en particulier, ainsi que sur la charge nette de l'anticorps entier. Les fragments variables, et à plus forte raison les CDR constituent à la fois une zone de grande variabilité et une zone de contrainte. En effet, si les CDR sont par essence la zone la plus variable de l'anticorps, d'un point de vue du mécanisme physiologique par lequel ils sont obtenus, le moindre remplacement d'acide aminé en leur sein fait courir le risque de perte d'affinité pour la cible. Ce concept a d'ailleurs déjà été utilisé pour induire une tolérance à certains anticorps thérapeutiques sans exercer d'effet pharmacologique en administrant un anticorps muté sur une seule position au sein d'un CDR.¹⁷

La plupart des approches retrouvées dans la littérature s'appuie sur des panels d'anticorps très étendus, voire sur des données issues de la pathologie afin de développer des outils capables de prédire *a priori* la propension à l'agrégation d'un anticorps, au vu de sa séquence primaire.

La démarche que nous avons appliquée est inverse. Nous nous sommes focalisés sur des anticorps développés et dont la tolérance et l'efficacité sont déjà connues afin de déterminer quels éléments de leur séquence leur conféraient leur plus ou moins bonne stabilité en solution. Cette démarche permet de développer un anticorps en se basant sur l'existant, et ainsi limiter les risques liés aux erreurs de prédiction des modèles *in silico*. En revanche, cette approche a pour inconvénient d'augmenter les contraintes sur la séquence

d'un nouveau candidat médicament, et de limiter les possibilités de changements d'acides aminés au sein des CDR en particulier. Notre étude propose, pour un anticorps développé avec une séquence IgG1 κ proche de celles des anticorps commerciaux testés, une piste pour limiter la propension à l'agrégation dès la phase de design. La connaissance des contraintes en termes de séquences, au sein des CDR, permet de diriger les mutations au moment du développement de la séquence et ainsi de s'épargner un développement inutile, ou au contraire de modifier un candidat avec une trop forte tendance à l'agrégation pour lui permettre de poursuivre son développement. La méthode employée, à la fois simple et ne nécessitant que très peu de dépenses, ainsi que les données qui en résultent, seront protégées par un brevet.

Malgré les grandes similitudes de séquences retrouvées ici entre les différents anticorps thérapeutiques, chaque anticorps est unique. En effet, des modifications de la séquence primaire peuvent engendrer des modifications de structure secondaire et tertiaire. Par exemple, le remplacement de deux résidus non contigus dans la séquence primaire mais proches dans la structure tertiaire peut aboutir à la naissance d'une zone hydrophobe ou chargée qui pourrait favoriser l'agrégation. C'est pourquoi nous avons également entrepris de comparer la structure spatiale d'un anticorps de la catégorie « BONS » ainsi que d'un issu de la catégorie « MAUVAIS », à la recherche de différences de répartition de résidus hydrophobes ou chargés, à titre d'exemple.

Analyse structurale

La concentration de résidus chargés ou hydrophobes à la surface de protéines a déjà été identifiée comme potentiellement impliquée dans les mécanismes de liaison d'anticorps thérapeutiques à un récepteur à la portion Fc.⁶⁰

Ici, l'interaction étudiée ne porte pas sur la liaison entre l'anticorps et un récepteur, mais entre plusieurs anticorps entre eux. Si la plupart des études s'intéressent à l'heure actuelle à la structure des CDR, le reste du Fab présente également beaucoup de variabilité en termes de séquence entre les différents anticorps étudiés. Nous avons donc choisi d'étudier la différence de répartition de résidus chargés ou hydrophobes entre l'infliximab, qui ne présente pas de dimères détectables en SEC, et le bévacizumab, qui présentait le plus fort

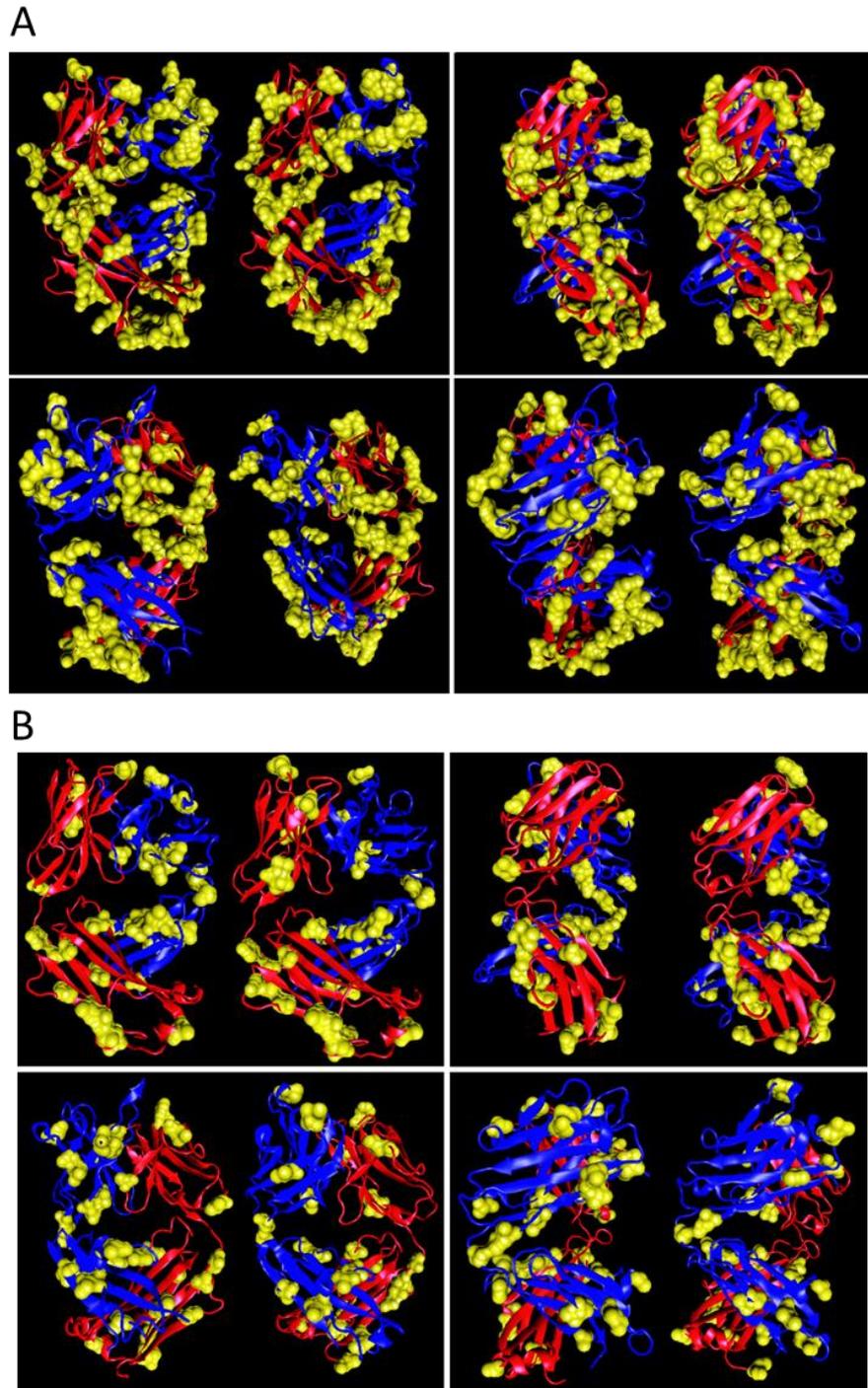


Figure 6. Comparaison de la structure tridimensionnelle des Fabs du bévacizumab et de l'infliximab sous quatre angles différents (0, 90, 180, 270°). Les CDR sont en haut sur chaque image. La chaîne légère est représentée en rouge et la chaîne lourde en bleu. A. Répartition des résidus chargés exposés (>20%) la surface du bévacizumab (à gauche dans chaque image) et de l'infliximab (à droite de chaque image). B. Répartition des résidus hydrophobes exposés (>20%) la surface du bévacizumab (à gauche dans chaque image) et de l'infliximab (à droite de chaque image).

taux de dimérisation dans l'étude physicochimique, à la recherche de différences évidentes. Les images de la répartition des résidus chargés (Figure 6A) et hydrophobes (Figure 6B) ont été juxtaposées et comparées visuellement. On ne constate pas de dissimilitudes visibles en termes de regroupement de résidus chargés ou hydrophobes par analyse directe des images. Une analyse systématique des distances séparant les différents résidus pourrait être envisagée pour poursuivre ce travail, mais le but ici était simplement de vérifier l'absence de zones hydrophobes ou électriquement chargées qui auraient pu expliquer à elles seules la propension à l'agrégation du bévacizumab et invalider les données de l'analyse informatique.⁶⁰

En conclusion, l'analyse de la répartition des résidus chargés ou hydrophobes à la surface des Fab de l'infliximab et du bévacizumab n'a pas permis d'identifier de différences évidentes. Néanmoins, l'analyse des caractéristiques physicochimiques des résidus les plus exposés sur les Fab a fait ressortir une position importante pour l'agrégation. Ce résidu est situé dans le CDR 1 de la chaîne légère, et il semble qu'il soit préférable qu'elle soit occupée par un résidu d'acide aminé neutre et non polaire. Ce résultat est nouveau, les études antérieures ayant principalement identifié des positions importantes sur les chaînes lourdes, ou dans les CDR2 des chaînes lourdes et légères.⁶¹⁻⁶³

L'analyse de l'art antérieur, ainsi que l'analyse de la propriété intellectuelle relative à cette position a prouvé qu'aucune étude à ce jour ni aucun brevet n'avait décrit l'impact des propriétés physicochimiques de la position 28 de la chaîne légère sur la propension à l'agrégation d'un anticorps thérapeutique. Pour autant, cette position est citée dans un brevet porté par Igawa *et al.*, de Roche-Chugai.⁶⁴

Dans la littérature, Igawa présente le point isoélectrique d'un anticorps thérapeutique comme un facteur à contrôler pour améliorer sa stabilité plasmatique.⁶⁵ Dans le brevet déposé en 2015, il présente cette position parmi celles dont la modification peut aider à contrôler le point isoélectrique de l'anticorps. On peut donc supposer, malgré l'absence de validation expérimentale, que cette position semble pertinente dans l'idée d'améliorer la stabilité d'un anticorps thérapeutique.

GOLIMUMAB	EIVLTQSPFATLSLSPGERATLSCRASQSV-YSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFG	100
IPILIMUMAB	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS-SPWTFG	100
GOLIMUMAB	PGTKVDIK	108
IPILIMUMAB	QGTKVEIK	108

Figure 7. Séquences des fragments variables de la chaîne légère du golimumab et de l'ipilimumab. Le résidu en rouge correspond à la position 28, identifiée dans notre étude comme impliquée dans le phénomène de dimérisation. Les tirets correspondent aux « gaps » de l'alignement.

Partie IV : Validation externe

IV.1) Introduction

Nous avons choisi de comparer les résultats de l'étude avec d'autres anticorps également utilisés en clinique, afin de vérifier si on retrouve préférentiellement des résidus non chargés et neutre du point de vue hydrophatique en position 28. Nous disposons de deux anticorps également utilisés en clinique qui n'avaient pas pu être inclus dans l'analyse initiale car seules les séquences de leurs fragments variables étaient publiées.

IV.2) Matériel et Méthodes

Nous avons utilisé les solutions d'anticorps commercialisées suivantes : ipilimumab (Yervoy, Bristol-Myers Squibb), et golimumab (Simponi, Merck Sharpe & Dohme). Les solutions commerciales ont subi le même traitement que les anticorps utilisés pour la partie II. Le matériel ainsi que les méthodes sont décrits en partie II.2.

IV.3) Résultats et discussion

Les taux de dimères observés sont restés constants au cours des trois semaines de conservation à +4°C en tampon phosphate. Pour le golimumab et l'ipilimumab, les taux de dimères s'élevaient respectivement à de 0,71 et 0,0% classant le premier dans la catégorie « MAUVAIS », et le second dans la catégorie « BONS ».

Les séquences des fragments variables des chaînes légères sont données dans la figure 7. La position 28, identifiée dans la partie III est occupée par une serine dans ces deux anticorps. Sur la position 28, les anticorps du groupe « BONS » présentent préférentiellement un résidu neutre du point de vue de l'hydrophatie et non chargé, tandis que les anticorps du groupe « MAUVAIS » présentent systématiquement un acide aspartique. En conclusion, la connaissance des caractéristiques physico-chimiques du résidu en position 28 semble insuffisante pour expliquer le taux de dimères observé.

Nous avons utilisé ici les résultats d'analyse chromatographique de deux anticorps dont nous n'avons ni la séquence complète, ni la structure cristalline, afin de voir si les résultats de la

partie III étaient vérifiés. Ce groupe d'anticorps est intéressant car il présente à la position décrite précédemment des résidus strictement identiques. De ce fait, il constitue une preuve que les anticorps utilisés pour notre étude ne permettent pas à eux seuls de mettre en évidence la totalité des résidus impliqués dans la propension à l'agrégation d'un anticorps thérapeutique. Ce résultat était attendu dans la mesure où l'agrégation est un phénomène multifactoriel, et n'invalide en rien les résultats de l'analyse matricielle.

Partie V : Discussion et conclusion

Les anticorps thérapeutiques constituent une classe médicamenteuse porteuse de multiples espoirs, mais dont le développement, long et coûteux peut être interrompu en raison de problèmes de tolérance ou de stabilité, parfois malgré une efficacité avérée sur la pathologie explorée. L'agrégation des protéines thérapeutiques et en particulier des anticorps monoclonaux est décrite dans la littérature comme un facteur favorisant l'immunisation.^{66,67} C'est pourquoi de nombreuses équipes explorent actuellement les causes d'agrégation des solutions d'anticorps thérapeutiques. Certaines présentent un challenge particulier, comme la concentration en anticorps dans la solution commerciale. En effet, de fortes concentrations en anticorps thérapeutiques sont souhaitables pour limiter le volume d'injection, ce qui permet entre autres d'utiliser des voies d'administration compatibles avec des soins à domicile, comme la voie sous-cutanée. La séquence primaire fait partie des critères d'identité d'un biomédicament, et est fixée très précocement dans le développement d'un anticorps monoclonal. Or, l'impact clinique de cette séquence primaire ne peut être totalement apprécié qu'une fois l'étape de l'essai clinique atteinte. Il est donc primordial de pouvoir prédire au mieux quel sera l'impact de la séquence primaire sur la réponse clinique.

La réponse résultant de la liaison de l'anticorps sur sa cible par son Fab, constituant son mode d'action, est la principale composante de la réponse clinique. Néanmoins, il a déjà été observé lors des essais des discordances importantes avec les résultats des études chez l'animal, notamment en raison de différences d'expression de la cible.⁶⁷

Parmi les autres paramètres cliniques liés à l'administration d'un anticorps monoclonal, la pharmacocinétique est conditionnée par plusieurs facteurs comme l'élimination médiée par fixation de l'antigène, le recyclage par le récepteur néonatal à la portion Fc et l'élimination par des anticorps anti-anticorps. L'élimination médiée par l'antigène correspond à la fraction d'anticorps qui est impliquée dans les complexes immuns avec la cible. Ainsi, plus la cible est abondante dans l'organisme, plus vite l'anticorps sera éliminé.^{69,70} Le recyclage médié par le récepteur néonatal à la portion Fc participe à la longue demi-vie des IgG, et en particulier les IgG1. Il correspond à la formation de liaisons entre le récepteur et le Fc des IgG à pH acide, au sein des endosomes, puis au retour à la membrane et au relargage extracellulaire des immunoglobulines prises en charge. Enfin, l'immunisation contre l'anticorps, aboutissant à la

synthèse d'anticorps anti-anticorps est un phénomène décrit dans la littérature, avec une pertinence clinique. Elle est causée par la reconnaissance de l'anticorps monoclonal comme une protéine étrangère par le système immunitaire, et favorisée notamment par la présence d'agrégats de cette protéine au sein de la solution administrée. Un taux de 5% d'agrégats est considéré par certains comme une limite à ne pas dépasser pour des solutions administrées chez l'homme.³⁶

Cette limite arbitraire est strictement respectée, y compris pour des anticorps thérapeutiques contre lesquels on observe fréquemment une immunisation comme l'infliximab ou l'adalimumab. Dans l'absolu, il faut donc considérer que la proportion d'agrégats n'est pas la seule cause d'immunisation et qu'il faut la contenir au mieux, indépendamment de valeurs-seuil.

Nous avons cherché ici des paramètres au sein de la séquence primaire qui pourraient expliquer en partie les phénomènes d'agrégation, afin d'apporter des solutions concrètes pour le développement d'anticorps monoclonaux plus stables.

Pour répondre à cette problématique, nous avons utilisé des anticorps de sous-classe identique, que nous avons caractérisés par chromatographie d'exclusion stérique. Les taux de dimères ont été mesurés par réfractométrie. Nous avons ensuite cherché les différences de séquence primaire qui pouvaient être corrélées avec une plus forte agrégabilité. Une position a été identifiée, dont il semble intéressant de maîtriser les paramètres physicochimiques afin de limiter le taux d'agrégats. Enfin, cette position a été étudiée dans des anticorps n'ayant pas servi à l'analyse initiale, afin de tester l'hypothèse.

L'analyse chromatographique des neuf anticorps testés a révélé que les anticorps étudiés présentent des taux stables de dimères sur quelques semaines, avec des disparités en termes de taux d'agrégation, dans la limite des 5% considérés comme acceptables pour des anticorps thérapeutiques.

L'analyse des caractéristiques physicochimiques des résidus les plus exposés a fait ressortir une position potentiellement impliquée dans l'agrégation. Cette position située dans le CDR 1 de la chaîne légère, était majoritairement occupée pour les anticorps présentant le moins d'agrégats par un résidu non chargé et avec un profil d'hydrophobie neutre. Pour les anticorps présentant des taux d'agrégats plus importants, on trouve systématiquement un acide aspartique, qui est un résidu chargé négativement et hydrophile.

Le golimumab et l'ipilimumab, utilisés pour vérifier notre hypothèse présentent tous deux une sérine en position 28 sur la chaîne légère, malgré leur différence de propension à l'agrégation, rappelant qu'un seul résidu d'acide aminé ne saurait expliquer à lui seul la propension à l'agrégation d'un anticorps.

Ces résultats, obtenus sur un faible nombre d'anticorps, ne sont donc pas exhaustifs. Les molécules utilisées présentaient l'avantage d'être toutes validées pour une utilisation en clinique, et constituaient donc un bon point de départ en vue d'une optimisation de séquence. En revanche, restreindre l'analyse à des IgG1 κ possédant une autorisation de mise sur le marché a réduit considérablement le nombre d'anticorps disposant à la fois de séquences et de structures publiées, limitant le pool de départ et donc la puissance de l'analyse. Cette étude représente donc un travail préliminaire, avec plusieurs pistes d'optimisation. D'une part, le pool d'anticorps pourrait être étendu à toutes les IgG1 disposant de séquences et structures 3D publiées dans la littérature. Ceci permettrait d'identifier d'autres positions dont les caractéristiques physico-chimiques peuvent avoir un impact sur la propension à l'agrégation.

Ensuite, les différences de taux d'agrégats dans ces solutions étaient moindres, dans la mesure où ces dernières étaient maintenues dans des conditions de stockage contrôlées. L'exposition à des stress, en modifiant la structure tertiaire de l'anticorps, pourrait exposer à la surface des résidus enfouis, modifiant leur accessibilité au solvant et donc leur implication dans les phénomènes d'agrégation. Il pourrait être intéressant de soumettre les solutions étudiées à des stress tels que l'exposition à la lumière, à des températures variables, à l'agitation, ou à l'oxydation, ce qui permettrait d'accroître la vitesse de dégradation et donc de déterminer les facteurs au sein de la séquence primaire conférant une protection contre l'agrégation ou la dégradation au cours du vieillissement du produit. Dans ce cas de figure, toutes les positions non conservées seraient comparées, car la surface accessible au solvant serait modifiée par les changements conformationnels subis par l'anticorps.

Enfin, il sera indispensable de vérifier ces résultats en fabricant des variants des anticorps testés. En remplaçant les résidus incriminés dans les phénomènes d'agrégation, on devrait en effet observer une diminution du taux observé de dimères comparativement à l'anticorps originel. Pour effectuer cette étude, il faudra développer des systèmes d'expression de ces variants, dans des conditions constantes, afin de les rendre comparables. Cela permettra en

outre de s'affranchir des disparités de glycosylations qui peuvent exister entre des anticorps thérapeutiques qui sont exprimés dans des lignées cellulaires différentes.

L'immunogénicité des biomédicaments, et en particulier des anticorps thérapeutiques est un phénomène bien connu de la communauté scientifique. Il a été admis, de façon axiomatique, que le degré d'humanisation était le principal facteur d'immunogénicité d'un anticorps. Nous nous sommes ici intéressés aux facteurs favorisant l'agrégation, et avons discuté les motifs pro-agrégants qui pouvaient être contenus dans les séquences d'anticorps thérapeutiques. Ces motifs ont pu être retrouvés dans des anticorps ne présentant aucune trace d'agrégation, et leur implication dans l'immunogénicité pourrait être remise en question. Néanmoins, ces motifs ont également été décrits comme des épitopes liant le HLA de classe 2 des lymphocytes T, et pourraient à ce titre être impliqués dans l'immunogénicité d'anticorps présentant des taux d'agrégats faibles ou nuls.⁷¹ Il s'avère donc que l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques est un phénomène multifactoriel parfois encore mal interprété, et les hypothèses initialement avancées, bien qu'aujourd'hui réfutées par certains auteurs, sont toujours avancées dans de nombreux articles.

Pour autant, la littérature fournit aujourd'hui tous les éléments liant l'immunisation à la séquence primaire, et l'existence de séquences pro-agrégantes aux épitopes T. En conclusion, l'état actuel des connaissances devrait permettre le développement d'anticorps thérapeutiques mieux tolérés et plus stables pour l'avenir.

Partie VI : Références

1. Kunert, R. & Reinhart, D. Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 3451–3461 (2016).
2. Bitonti, A. J. *et al.* Pulmonary delivery of an erythropoietin Fc fusion protein in non-human primates through an immunoglobulin transport pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9763–9768 (2004).
3. Laffly, E. & Sodoyer, R. [Monoclonal antibodies, 30 years of success]. *J. Société Biol.* **200**, 325–343 (2006).
4. Reichert, J. M. Antibodies to watch in 2016. *mAbs* **8**, 197–204 (2016).
5. Reichert, J. M. Antibodies to watch in 2014. *mAbs* **6**, 5–14 (2014).
6. Reichert, J. M. Antibodies to watch in 2015. *mAbs* **0** (2014). doi:10.4161/19420862.2015.988944
7. Reichert, J. M. Which are the antibodies to watch in 2013? *mAbs* **5**, 1–4 (2013).
8. Reichert, J. M. Which are the antibodies to watch in 2012? *mAbs* **4**, 1–3 (2012).
9. Reichert, J. M. Antibody-based therapeutics to watch in 2011. *mAbs* **3**, 76–99 (2011).
10. Reichert, J. M. Antibodies to watch in 2010. *mAbs* **2**, 84–100 (2010).
11. Dias, C. S. *et al.* Effects of AMG 145 on low-density lipoprotein cholesterol levels: results from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose phase 1 studies in healthy volunteers and hypercholesterolemic subjects on statins. *J. Am. Coll. Cardiol.* **60**, 1888–1898 (2012).
12. Piccand, M. *et al.* Neonatal Immune Tolerance Induction to Allow Long-Term Studies With an Immunogenic Therapeutic Monoclonal Antibody in Mice. *AAPS J.* **18**, 354–361 (2016).
13. Schaeferbeke, T. *et al.* Immunogenicity of biologic agents in rheumatoid arthritis patients: lessons for clinical practice. *Rheumatol. Oxf. Engl.* (2015). doi:10.1093/rheumatology/kev277
14. Garcês, S., Demengeot, J. & Benito-Garcia, E. The immunogenicity of anti-TNF therapy in immune-mediated inflammatory diseases: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 1947–1955 (2013).

15. Ben-Horin, S. & Chowers, Y. Review article: loss of response to anti-TNF treatments in Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **33**, 987–995 (2011).
16. Chaigne, B. & Watier, H. Monoclonal antibodies in excess: A simple way to avoid immunogenicity in patients? *J. Allergy Clin. Immunol.* **136**, 814–816 (2015).
17. Somerfield, J. *et al.* A novel strategy to reduce the immunogenicity of biological therapies. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 763–768 (2010).
18. van Meer, P. J. K. *et al.* Immunogenicity of mAbs in non-human primates during nonclinical safety assessment. *mAbs* **5**, 810–816 (2013).
19. De Groot, A. S., Knopp, P. M. & Martin, W. De-immunization of therapeutic proteins by T-cell epitope modification. *Dev. Biol.* **122**, 171–194 (2005).
20. Kim, K.-S., Kim, H.-J., Han, B. W., Myung, P.-K. & Hong, H. J. Construction of a humanized antibody to hepatitis B surface antigen by specificity-determining residues (SDR)-grafting and de-immunization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 231–237 (2010).
21. Hernández-Jiménez, J. *et al.* The Effects of Light-Accelerated Degradation on the Aggregation of Marketed Therapeutic Monoclonal Antibodies Evaluated by Size-Exclusion Chromatography With Diode Array Detection. *J. Pharm. Sci.* **105**, 1405–1418 (2016).
22. Hermeling, S. *et al.* Antibody response to aggregated human interferon alpha2b in wild-type and transgenic immune tolerant mice depends on type and level of aggregation. *J. Pharm. Sci.* **95**, 1084–1096 (2006).
23. Rosenberg, A. S. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J.* **8**, E501-507 (2006).
24. Bria, C. R. M., Jones, J., Charlesworth, A. & Williams, S. K. R. Probing Submicron Aggregation Kinetics of an IgG Protein by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation. *J. Pharm. Sci.* (2015). doi:10.1002/jps.24703
25. Misbah, S. *et al.* Subcutaneous immunoglobulin: opportunities and outlook. *Clin. Exp. Immunol.* **158 Suppl 1**, 51–59 (2009).

26. Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M. & Dwek, R. A. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 21–50 (2007).
27. Kayser, V. *et al.* Glycosylation influences on the aggregation propensity of therapeutic monoclonal antibodies. *Biotechnol. J.* **6**, 38–44 (2011).
28. Mimura, Y. *et al.* The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human IgG1-Fc: properties of a series of truncated glycoforms. *Mol. Immunol.* **37**, 697–706 (2000).
29. Solá, R. J. & Griebenow, K. Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.* **98**, 1223–1245 (2009).
30. Wang, W., Antonsen, K., Wang, Y. J. & Wang, D. Q. pH dependent effect of glycosylation on protein stability. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* **33**, 120–127 (2008).
31. Zheng, K., Bantog, C. & Bayer, R. The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. *mAbs* **3**, 568–576 (2011).
32. Kameoka, D., Masuzaki, E., Ueda, T. & Imoto, T. Effect of Buffer Species on the Unfolding and the Aggregation of Humanized IgG. *J. Biochem. (Tokyo)* **142**, 383–391 (2007).
33. Saito, S. *et al.* Effects of ionic strength and sugars on the aggregation propensity of monoclonal antibodies: influence of colloidal and conformational stabilities. *Pharm. Res.* **30**, 1263–1280 (2013).
34. Clark, R. H. *et al.* Remediating agitation-induced antibody aggregation by eradicating exposed hydrophobic motifs. *mAbs* **6**, 1540–1550 (2014).
35. Chennamsetty, N., Helk, B., Voynov, V., Kayser, V. & Trout, B. L. Aggregation-prone motifs in human immunoglobulin G. *J. Mol. Biol.* **391**, 404–413 (2009).
36. Obrezanova, O. *et al.* Aggregation risk prediction for antibodies and its application to biotherapeutic development. *mAbs* **7**, 352–363 (2015).

37. Wang, X., Das, T. K., Singh, S. K. & Kumar, S. Potential aggregation prone regions in biotherapeutics: A survey of commercial monoclonal antibodies. *mAbs* **1**, 254–267 (2009).
38. Shire, S. J., Shahrokh, Z. & Liu, J. Challenges in the development of high protein concentration formulations. *J. Pharm. Sci.* **93**, 1390–1402 (2004).
39. Sanchez-De Melo, I. *et al.* N-glycosylation profile analysis of Trastuzumab biosimilar candidates by Normal Phase Liquid Chromatography and MALDI-TOF MS approaches. *J. Proteomics* **127**, 225–233 (2015).
40. Okbazghi, S. Z. *et al.* Production, Characterization, and Biological Evaluation of Well-Defined IgG1 Fc Glycoforms as a Model System for Biosimilarity Analysis. *J. Pharm. Sci.* **105**, 559–574 (2016).
41. Onitsuka, M. *et al.* Glycosylation analysis of an aggregated antibody produced by Chinese hamster ovary cells in bioreactor culture. *J. Biosci. Bioeng.* **117**, 639–644 (2014).
42. Lefranc, M.-P., Ehrenmann, F., Ginestoux, C., Giudicelli, V. & Duroux, P. Use of IMGT^(®) databases and tools for antibody engineering and humanization. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **907**, 3–37 (2012).
43. Lefranc, M.-P. *et al.* IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev. Comp. Immunol.* **27**, 55–77 (2003).
44. Ahmad, S., Gromiha, M., Fawareh, H. & Sarai, A. ASAView: database and tool for solvent accessibility representation in proteins. *BMC Bioinformatics* **5**, 51 (2004).
45. Nepal, R. *et al.* Logistic regression models to predict solvent accessible residues using sequence- and homology-based qualitative and quantitative descriptors applied to a domain-complete X-ray structure learning set. *J. Appl. Crystallogr.* **48**, 1976–1984 (2015).
46. Donaldson, J. M. *et al.* Identification and grafting of a unique peptide-binding site in the Fab framework of monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 17456–17461 (2013).
47. Du, J. *et al.* Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody Rituximab. *J. Biol. Chem.* **282**, 15073–15080 (2007).

48. Hu, S. *et al.* Comparison of the inhibition mechanisms of adalimumab and infliximab in treating tumor necrosis factor α -associated diseases from a molecular view. *J. Biol. Chem.* **288**, 27059–27067 (2013).
49. Li, S. *et al.* Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* **7**, 301–311 (2005).
50. Mikol, V. Structure of the fab fragment of SDZ CHI621: a chimeric antibody against CD25. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **52**, 534–542 (1996).
51. Muller, Y. A. *et al.* VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **6**, 1153–1167 (1998).
52. Pierri, C. L. *et al.* Molecular modeling of antibodies for the treatment of TNF α -related immunological diseases. *Pharmacol. Res. Perspect.* **4**, e00197 (2016).
53. Vajdos, F. F. *et al.* Comprehensive functional maps of the antigen-binding site of an anti-ErbB2 antibody obtained with shotgun scanning mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **320**, 415–428 (2002).
54. Pommié, C., Levadoux, S., Sabatier, R., Lefranc, G. & Lefranc, M.-P. IMGT standardized criteria for statistical analysis of immunoglobulin V-REGION amino acid properties. *J. Mol. Recognit. JMR* **17**, 17–32 (2004).
55. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38, 27–28 (1996).
56. Stracke, J. *et al.* A novel approach to investigate the effect of methionine oxidation on pharmacokinetic properties of therapeutic antibodies. *mAbs* **6**, 1229–1242 (2014).
57. Haji Abdolvahab, M. *et al.* An Albumin-Free Formulation for Escherichia coli-Derived Interferon Beta-1b with Decreased Immunogenicity in Immune Tolerant Mice. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* (2016). doi:10.1089/jir.2015.0110
58. Lauer, T. M. *et al.* Developability index: a rapid in silico tool for the screening of antibody aggregation propensity. *J. Pharm. Sci.* **101**, 102–115 (2012).

59. Ojala, F., Degerman, M., Hansen, T. B., Broberg Hansen, E. & Nilsson, B. Prediction of IgG1 aggregation in solution. *Biotechnol. J.* **9**, 800–804 (2014).
60. Schoch, A. *et al.* Charge-mediated influence of the antibody variable domain on FcRn-dependent pharmacokinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 5997–6002 (2015).
61. Casaz, P. *et al.* Resolving self-association of a therapeutic antibody by formulation optimization and molecular approaches. *mAbs* **6**, 1533–1539 (2014).
62. Perchiacca, J. M., Ladiwala, A. R. A., Bhattacharya, M. & Tessier, P. M. Aggregation-resistant domain antibodies engineered with charged mutations near the edges of the complementarity-determining regions. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* **25**, 591–601 (2012).
63. Arora, J. *et al.* Hydrogen Exchange Mass Spectrometry Reveals Protein Interfaces and Distant Dynamic Coupling Effects During the Reversible Self-Association of An IgG1 Monoclonal Antibody. *mAbs* **0** (2015). doi:10.1080/19420862.2015.1029217
64. Igawa, To., Hiroyuki, T., Tatsuhiko, T. & Taichi, K. Method of modifying isoelectric point of antibody via amino acid substitution in cdr. (2015).
65. Igawa, T. *et al.* Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* **23**, 385–392 (2010).
66. Bi, V. *et al.* Development of a human antibody tolerant mouse model to assess the immunogenicity risk due to aggregated biotherapeutics. *J. Pharm. Sci.* **102**, 3545–3555 (2013).
67. Ratanji, K. D., Derrick, J. P., Dearman, R. J. & Kimber, I. Immunogenicity of therapeutic proteins: influence of aggregation. *J. Immunotoxicol.* **11**, 99–109 (2014).
68. Suntharalingam, G. *et al.* Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1018–1028 (2006).
69. Datta-Mannan, A. *et al.* Aberrant bispecific antibody pharmacokinetics linked to liver sinusoidal endothelium clearance mechanism in cynomolgus monkeys. *mAbs* **0** (2016). doi:10.1080/19420862.2016.1178435

70. Daydé, D. *et al.* Tumor burden influences exposure and response to rituximab: pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling using a syngeneic bioluminescent murine model expressing human CD20. *Blood* **113**, 3765–3772 (2009).
71. Kumar, S., Mitchell, M. A., Rup, B. & Singh, S. K. Relationship between potential aggregation-prone regions and HLA-DR-binding T-cell immune epitopes: implications for rational design of novel and follow-on therapeutic antibodies. *J. Pharm. Sci.* **101**, 2686–2701 (2012).

Partie VII : Indexe des tables et figures

Tableau 1. Liste des formulations commerciales d'anticorps utilisés pour cette étude, page 9.

Tableau 2. Caractéristiques des anticorps et résultats de l'analyse physicochimique, page 13.

Tableau 3. Résultats de l'analyse matricielle, page 24.

Tableau 4 : Résidus présents sur la position 28 de la chaîne légère des différents anticorps analysés, page 26.

Figure 1. Schéma d'un anticorps thérapeutique, page 4.

Figure 2. Chromatogrammes obtenus en chromatographie d'exclusion stérique, page 15.

Figure 3. Détail des chromatogrammes obtenus en exclusion stérique, page 15.

Figure 4. Alignements des séquences d'anticorps, page 22.

Figure 5. Représentation sur deux couches du fragment variable de la chaîne légère du rituximab, selon IMGT « Collier de Perles », page 26.

Figure 6. Comparaison de la structure tridimensionnelle des Fabs du bévacizumab et de l'infliximab sous quatre angles différents (0, 90, 180, 270°), page 29.

Figure 7. Séquences des fragments variables de la chaîne légère du golimumab et de l'ipilimumab, page 31

Partie VIII : Annexes

Annexe 1 : Séquences des anticorps utilisés

Adalimumab

Source : Brevet US8034906

>adalimumab_heavy_chain

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSV EGR
FTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

>adalimumab_light_chain

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Trastuzumab

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

>7637H|trastuzumab

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY 60
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS 120
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS 180
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG 240
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN 300
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE 360
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW 420
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 450

>7637L|trastuzumab

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS 60
RFGSRSRGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP 120
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT 180
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 214

Infliximab

Source : Therapeutic Antibodies Database > Sequence > Infliximab

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

>Infliximab_Heavy_chain_Fab

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFIFSNHWMNWVRQSPEKGLEWVAE
IRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDSKSAVYLQMTDLRTEDTGVIYCSR
NYYGSTYDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT

>Infliximab_Light_chain

DILLTQSPAILSVPGERVVFSCRASQFVGSIIHWYQQRRTNGSPRLIKY
ASEMSGIPSRFSGSGSGTDFTLSINTVESEDIADYYCQQSHSWPFTFGS
GTNLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC

Rituximab

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

>7609H|rituximab

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGGRGLEWIGAIYPGNGDTSY 60
NQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWVWAGTTVTVS 120
AASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS 180
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG 240
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY 300
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD 360
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR 420
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 451

>7609L|rituximab

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFAQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVR 60
FSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS 120
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTL 180
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 213

Cetuximab

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

>7906H|cetuximab

QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYN 60
TPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAA 120
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG 180
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP 240
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS 300
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM 360
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ 420
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 449

>7906L|cetuximab

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPS 60
RFGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP 120
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT 180
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 214

Bevacizumab

Source : Therapeutic Antibodies Database > Sequence > Bevacizumab

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

>Bevacizumab heavy

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRR
FTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYHGSSHWFYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
NHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>Bevacizumab light

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

Basiliximab

Source : Therapeutic Antibodies Database > Sequence > Basiliximab

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

>basiliximab_heavy_chain

QLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYSFTRYWMHWIKQRPQGQGLEWIGAIY
PGNSDTSYNQKFEGKAKLTAVTSASTAYMELSSLTHEDSAVYYCSRDIYGY
YDFWGGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
NHHKPSNTKVDKRVEP

>basiliximab_light_chain

QIVSTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSRSYMQWYQQKPGTSPKRWIYDT
SKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQRSSYTFGGGTK
LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGE

Pertuzumab

Source : Brevet US 20060018899

>pertuzumab_heavy_chain

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVAD
VNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNL
GPSFYFDYWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

>pertuzumab_light_chain

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYS
ASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQ
GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC

Elotuzumab

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

>9074H|elotuzumab

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSSTINY 60
APSLKDKFIISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPDGNYWYFDVWGQGTLLTVSSA 120
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG 180
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP 240
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS 300
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL 360
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ 420
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 449

>9074L|elotuzumab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRHTGVDP 60
RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYSSYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP 120
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLT 180
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 214

Annexe 2 : matrices analysées

Chaines Lourdes																								
Séquence	Hydrophathie			Volume			Charge			Polarité														
	Ada	Ttz	Iffx	Rtx	Ctx	Bsx	Ptz	Etz	Ada	Ttz	Iffx	Rtx	Ctx	Bsx	Ptz	Etz	Ada	Ttz	Iffx	Rtx	Ctx	Bsx	Ptz	Etz
1	E	E	Q	Q	E	-	E	E	1	2	2	3	3	3	-	2	2	1	1	1	1	1	1	1
3	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	3	3	3	4	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1
5	V	Q	K	V	Q	V	Q	V	5	3	3	4	3	3	3	3	5	2	2	1	1	2	2	2
7	S	S	P	S	S	S	S	S	7	1	1	2	1	1	1	1	7	1	1	2	1	1	1	1
13	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	13	3	3	4	3	3	3	3	13	1	1	1	1	1	1	1
19	R	K	K	S	R	K	R	R	19	4	4	4	4	4	4	19	1	1	1	1	1	1	1	1
23	A	V	K	T	A	K	A	A	23	1	1	3	4	2	1	4	23	2	2	1	1	2	2	2
28	T	N	I	T	S	T	S	T	28	2	4	2	1	2	1	2	28	1	2	1	1	1	1	1
42	G	E	G	G	G	G	G	G	42	1	3	1	1	1	1	1	42	2	1	2	2	2	2	2
64	D	E	Q	T	A	Q	Q	P	64	2	2	3	2	1	3	2	64	1	1	1	1	2	1	2
65	S	S	K	P	D	K	R	S	65	1	1	4	2	4	4	1	65	3	3	1	2	1	1	1
67	E	K	K	T	K	E	K	K	67	3	4	4	2	4	3	4	67	2	1	1	1	3	1	1
75	D	D	D	D	V	D	D	D	75	2	2	2	2	2	3	2	75	1	1	1	1	2	1	1
77	A	S	S	S	S	S	S	A	77	1	1	1	1	1	1	1	77	3	3	3	3	3	3	3
78	K	K	S	K	K	A	K	K	78	4	4	4	4	4	4	4	78	1	1	1	1	1	1	1
89	R	R	T	Q	R	T	R	R	89	4	4	2	3	4	2	4	89	1	1	1	1	1	1	1
90	A	T	S	S	A	H	A	A	90	1	1	2	1	1	3	1	90	3	3	3	3	3	3	3
95	V	V	V	V	V	V	V	V	95	3	3	3	3	3	3	3	95	2	2	2	2	2	2	2
123	Q	Q	A	Q	Q	Q	Q	Q	123	3	3	3	3	3	3	3	123	3	3	3	3	3	3	3
126	L	L	T	L	L	L	L	L	126	4	4	2	4	4	2	4	126	2	1	2	1	2	1	2
131	S	S	A	A	S	S	S	S	131	1	1	1	1	1	1	1	131	3	3	3	3	3	3	3
228	K	K	R	R	K	R	K	K	228	4	4	4	4	4	4	4	228	1	1	1	1	1	1	1

Chaines Légères																								
Séquence	Hydrophathie			Volume			Charge			Polarité														
	Ada	Ttz	Iffx	Rtx	Ctx	Bsx	Ptz	Etz	Ada	Ttz	Iffx	Rtx	Ctx	Bsx	Ptz	Etz	Ada	Ttz	Iffx	Rtx	Ctx	Bsx	Ptz	Etz
1	D	D	Q	D	Q	D	D	D	1	2	2	3	2	2	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1
3	Q	L	V	L	Q	V	Q	Q	3	3	4	3	4	3	3	3	3	3	1	2	2	1	1	1
9	S	A	A	V	A	S	S	S	9	2	1	1	2	1	2	2	9	1	2	2	2	2	1	1
15	V	P	P	P	P	V	V	V	15	1	2	2	2	2	3	3	15	2	2	2	2	2	2	2
18	R	R	K	R	K	R	R	R	18	4	4	4	4	4	4	4	18	1	1	1	1	1	1	1
24	R	R	R	R	S	K	K	K	24	4	4	4	4	4	4	4	24	1	1	1	1	1	1	1
28	G	D	F	S	D	S	D	S	28	1	2	5	1	2	2	2	28	2	1	2	1	1	1	1
40	K	R	K	R	K	K	K	K	40	3	3	3	3	3	3	3	40	1	1	1	1	1	1	1
41	P	T	P	T	P	P	P	P	41	2	2	2	2	2	2	2	41	2	2	1	2	2	2	2
42	G	N	G	N	G	G	G	G	42	1	2	1	2	1	1	1	42	3	3	3	3	3	3	3
43	K	G	S	G	K	T	K	K	43	4	4	1	1	4	2	4	43	1	2	1	2	1	1	1
46	K	R	K	R	K	K	K	K	46	4	4	4	4	4	4	4	46	1	1	1	1	1	1	1
55	L	L	S	L	L	R	R	R	55	4	4	4	4	4	4	4	55	3	3	3	3	3	3	3
57	S	S	S	S	S	S	S	T	57	1	1	1	1	1	1	1	57	3	3	3	3	3	3	3
61	S	S	V	S	A	S	A	S	61	1	1	3	1	1	1	1	61	1	1	2	1	2	1	1
67	G	R	G	G	G	G	G	G	67	1	4	1	1	1	1	1	67	2	1	2	2	2	2	2
71	D	S	N	S	N	S	S	D	71	2	2	2	2	2	2	2	71	1	1	1	1	1	1	1
77	S	N	S	N	S	S	S	S	77	1	2	1	2	1	1	1	77	3	3	3	3	3	3	3
78	S	T	E	S	S	S	S	S	78	1	2	4	1	1	1	1	78	3	3	1	3	3	3	3
80	Q	E	E	Q	E	Q	Q	Q	80	3	3	3	3	3	3	3	80	3	2	2	2	2	2	2
102	Q	S	G	A	Q	G	Q	Q	102	3	3	1	1	3	3	3	102	3	3	3	3	3	3	3
105	K	N	K	K	K	K	K	K	105	4	4	4	4	4	4	4	105	1	1	1	1	1	1	1

BRACHET GUILLAUME

PHYSICOCHIMIE DES ANTICORPS THERAPEUTIQUES :
IMPACT DE LA SEQUENCE PRIMAIRE SUR L'AGREGATION

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Les anticorps thérapeutiques constituent une classe médicamenteuse qui a largement contribué à améliorer le pronostic de certaines pathologies cancéreuses et auto-immunes. Malgré cette efficacité, des problèmes de tolérance ou d'immunisation surviennent parfois, compliquant leur utilisation. En particulier, l'immunisation est une cause importante d'échec thérapeutique, annulant l'efficacité de l'anticorps et forçant le clinicien à changer de ligne de traitement. Cette immunisation est due à plusieurs facteurs, parmi lesquels l'agrégation spontanée des anticorps thérapeutiques. Dans ce travail, Nous avons cherché à identifier des paramètres dans la séquence primaire des anticorps qui pourraient expliquer en partie les phénomènes d'agrégation. L'identification de positions-clé pour lesquels un type de résidu donné conférerait une plus faible propension à l'agrégation permettrait de développer *a priori* des anticorps plus stables. Afin de répondre à cette problématique, nous avons utilisé des anticorps de type IgG1 κ , qui est la sous-classe la plus utilisée en thérapeutique à l'heure actuelle, dont nous avons évalué l'agrégation par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la spectrophotométrie UV et réfractométrie. Nous avons ensuite cherché les différences de caractéristiques physicochimiques au sein de la séquence primaire qui pouvaient être corrélées avec une quantité d'agrégats plus importante, par des approches de bio-informatique. Parmi les nombreuses positions de la séquence primaire étudiées, une a été identifiée comme importante à maîtriser afin de limiter l'agrégation.

MOTS-CLÉS : anticorps thérapeutiques, séquence primaire, immunogénicité, agrégation.

JURY

Président : Pr. Gilles THIBAUT, PU-PH, Laboratoire d'immunologie, CHRU Tours, UMR CNRS 7292 GICC

Membres : Pr. Philippe BILLIALD, PU, MNHN, UMR MNHN-CNRS 7245, Paris

Pr. Hervé WATIER, PU-PH, Laboratoire d'immunologie, CHRU Tours, UMR CNRS 7292 GICC

Dr. Nicolas AUBREY, MCU, INRA UMR1282 ISP, Tours

Dr. Hélène BLASCO, MCU-PH, Laboratoire de biochimie, CHRU Tours, INSERM U930, Tours

Dr. Renaud RESPAUD, AHU, Laboratoire de contrôle, CHRU Tours, UMR CNRS 7292 GICC

Vendredi 27 Mai 2016, Faculté des Sciences Pharmaceutiques Philippe Maupas de Tours