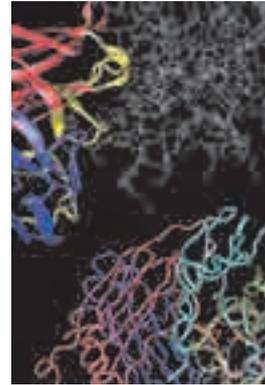


## Anticorps bispécifiques : quel avenir ?

André Pèlerin, Bruno Robert

► Les anticorps monoclonaux reconnaissent très spécifiquement un épitope antigénique et favorisent un contact entre les cellules exprimant la cible antigénique et celles qui expriment un récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines. Plusieurs stratégies ont été développées pour accroître la fonctionnalité de ces anticorps notamment dans le domaine du traitement des tumeurs, et la conception d'anticorps bispécifiques est une des plus efficaces. De multiples combinaisons ont été créées *via* diverses stratégies plus ou moins couronnées de succès - fusion d'hybridomes, couplage de fragments Fab' ou ScFv, ingénierie génétique. Deux stratégies sont particulièrement efficaces dans deux situations thérapeutiques : pour accroître l'immunocytotoxicité, *via* l'utilisation d'anticorps spécifiques à la fois de la cible tumorale et du CD3 des lymphocytes T, rapprochant ainsi l'effecteur et sa cible. L'autre se fonde sur la radio-immunothérapie, l'anticorps reconnaissant l'antigène tumoral sur la cellule cible et un haptène radio-marqué. D'autres possibilités de reconnaissance sont également testées, ciblage de multiples épitopes d'un même antigène ou de deux antigènes d'une même cellule. Si les progrès ont été retardés par des contraintes technologiques ou une toxicité importante, l'ère d'une application clinique des anticorps bispécifiques semble proche, et devrait enrichir l'arsenal des possibilités thérapeutiques utilisant ces molécules. ◀



Institut de recherche en cancérologie de Montpellier (IRCM), Montpellier, F-34298, France ; Inserm U896, Montpellier, F-34298, France ; Université Montpellier1, Montpellier, F-34298, France ; CRLC Val d'Aurelle Paul Lamarque, Montpellier, F-34298, France.  
[andre.pelegrin@inserm.fr](mailto:andre.pelegrin@inserm.fr)

en particulier les cellules T cytotoxiques, très importantes en immunothérapie des cancers ; ces cellules peuvent alors être stimulées et réagir contre des cellules tumorales exprimant des antigènes cibles intrinsèquement « inertes » comme l'antigène carcinoembryonnaire (CEA) ; (2) à d'autres domaines tels que le ciblage en deux temps pour la radio-immunothérapie ou le radio-immunodiagnostic et le cociblage d'antigènes associés aux tumeurs.

### Les formats d'anticorps bispécifiques

De nombreux formats ont été développés depuis l'avènement des anticorps bispécifiques en raison des contraintes de qualité et de quantité de ces molécules. Si l'anticorps bispécifique doit être une molécule efficace, il doit également pouvoir être produit et purifié en quantités suffisantes pour des applications cliniques [1] (→). (→) voir O. Cochet et M. Chartrain, page 1078

La première stratégie pour créer des anticorps bispécifiques a consisté à fusionner les deux hybridomes produisant les Acm correspondant aux deux spécificités visées [2]. Cette stratégie représentait un défi technique important puisque l'appariement aléatoire des chaînes lourdes et légères des Acm originaux générerait une dizaine d'anticorps différents et que la purification de l'anticorps d'intérêt, qui ne représentait que 10 % des anticorps totaux, était très difficile [1] (→). L'avantage de ces anticorps bispécifiques produits par « quadroma » était la présence de la partie Fc qui en faisait des molécules

Les anticorps monoclonaux (Acm) sont des protéines bivalentes et bifonctionnelles qui se fixent à leurs cibles (virus, bactéries, protéines, cellules, etc.) et qui peuvent générer un contact entre leurs cibles (cellules tumorales, par exemple) et des cellules exprimant les récepteurs des fragments Fc. La génération d'anticorps bispécifiques étend cette capacité de bifonctionnalité : (1) à des cellules n'exprimant pas les récepteurs du Fc,

« trispécifiques » avec des avantages (purification, pharmacocinétique, ADCC ou *antibody dependent cellular cytotoxicity*) et des inconvénients potentiels [1].

La seconde stratégie, initialement décrite par Glenny [3], consistait à lier les deux Fab' par un lien thioéther, et elle a permis de préparer de nombreux anticorps bispécifiques évalués en préclinique et lors d'études cliniques. Si cette technologie permet de préparer des molécules efficaces avec un degré de pureté compatible avec un usage clinique, les nombreuses étapes de purification et les rendements ne sont pas compatibles avec une activité commerciale.

Depuis de nombreuses années, la production d'anticorps bispécifiques recombinants par ingénierie génétique a été présentée comme la solution à tous les problèmes de production, de formats, d'immunogénicité des anticorps bispécifiques. Cependant, ce n'est que très récemment que ces techniques ont produit les molécules escomptées, entraînant une renaissance du domaine et l'entrée des anticorps bispécifiques recombinants dans l'arsenal clinique [4-6]. Si les formats des constructions envisageables sont théoriquement quasiment illimités, les molécules produites sont limitées par les contraintes des structures tridimensionnelles. Dans ce cadre, il faut mentionner l'intérêt des anticorps de camélidés dont le domaine variable monocaténaire (VHH) est plus facile à manipuler que les scFv bicaténaires (→) [7] et celui des *tribodies* utilisant les régions naturelles de dimérisation des anticorps [8].

Récemment, le développement et la production d'anticorps bispécifiques bivalents et trifonctionnels (DVD-Ig) très proches du format des anticorps intacts amplifie les perspectives d'utilisation en clinique des anticorps bispécifiques [9].

## Les domaines d'application

Les anticorps bispécifiques anti-cellules tumorales/anti-CD3 sont les premiers à avoir été développés [2]. L'idée est de permettre l'attaque des cellules tumorales par les cellules du système immunitaire les plus compétentes, les cellules T. Le choix du CD3 (→), exprimé par les lymphocytes T, permet à l'anticorps de lier et de stimuler les cellules T indépendamment de leur CMH et de leur spécificité, provoquant une réponse T polyclonale [10]. Des anticorps bispécifiques ont également été développés contre les monocytes et les macrophages (CD64 et CD89) et les cellules *natural killer* (NK) (CD16) [1, 4]. Récemment, une étude clinique a montré l'efficacité d'un anticorps bispécifique recombinant anti-CD19/anti-CD3, constitué de deux scFv (*single-chain variable fragment*), dans certains lymphomes non hodgkiniens [6]. Les résultats sont impressionnants, notamment par la faiblesse des doses entraînant des réponses partielles ou complètes (0,015 à 0,060 mg/m<sup>2</sup>). Ces résultats devront être confirmés et il sera intéressant de déterminer si cette stratégie très séduisante qui utilise des anticorps bispécifiques avec un bras agoniste, il ne faut pas négliger la toxicité potentielle.

La radio-immunothérapie utilisant des anticorps directement marqués par différents isotopes radioactifs a fait ses preuves, notamment en

oncohématologie. Pour les tumeurs solides, la circulation de l'anticorps radiomarqué engendre souvent une toxicité importante avant qu'une dose efficace ne soit délivrée à la tumeur (→). Le ciblage, ou ciblage en deux temps, est

une des stratégies développées pour remédier à ce problème. Dans ce cas, l'étape de localisation de l'anticorps dans la tumeur est séparée de celle de l'injection de la molécule radioactive à visée diagnostique ou thérapeutique. Si le système avidine-biotine a été utilisé dans ce cadre, les anticorps bispécifiques avec un bras antitumeur et un bras antihaptène représentent l'approche la plus originale et la plus prometteuse en raison, notamment, de la stratégie *affinity enhancement system* (AES). Dans l'AES, l'haptène radiomarqué est bivalent afin de permettre sa fixation simultanée à deux molécules d'anticorps bispécifiques préalablement fixées sur une même cellule tumorale. Cela prolonge le temps de résidence de l'haptène radiomarqué dans la tumeur [11]. Le potentiel de l'AES a été démontré dans différentes études cliniques [12]. Afin d'augmenter encore l'efficacité de cette technique, la stratégie utilise actuellement des molécules trivalentes (deux bras antitumeur et un bras antihaptène) préparées par la méthode des *dock-and-lock* en cours d'évaluation préclinique [13].

Plus récemment, des anticorps bispécifiques ciblant deux épitopes différents d'un même antigène [14] ou deux antigènes tumoraux ont été développés avec pour objectif l'augmentation de la spécificité du ciblage et de l'efficacité antitumorale. Dans un modèle tumoral exprimant l'antigène carcinoembryonnaire (CEA) et HER2, un anticorps bispécifique anti-CEA/anti-HER2 a montré une meilleure captation tumorale que les fragments F(ab')<sub>2</sub> des anticorps parentaux [15]. Un anticorps bispécifique recombinant reliant un scFv anti-HER2 à un scFv anti-HER3 par un lien peptidique de vingt acides aminés a confirmé la nécessité de coexpression des deux antigènes cibles sur une même cellule pour observer une augmentation de la captation tumorale [16]. Un anticorps bispécifique anti-EGFR/anti-IGFR (récepteurs de l'*epidermal growth factor* et de l'*insulin growth factor*) est capable de bloquer la fixation de ces deux ligands et d'inhiber *in vitro* et *in vivo* la prolifération de cellules tumorales avec la même efficacité qu'une association des anticorps parentaux [17] (→). Un anticorps bispécifique anti-CD20/anti-CD22 inhibe la prolifération de certaines lignées de lymphomes B plus efficacement que les anticorps parentaux et, *a priori*, avec un mécanisme d'action différent [18].

Ces quelques exemples de ciblage de plusieurs antigènes tumoraux à la surface d'une même cellule tumorale

(→) voir J. Barbet et al., page 1039

(→) voir P. Chames et D. Baty, page 1159

(→) voir B. Vanhove, page 1121

(→) voir A. Bodmer et al., page 1090

montrent tout l'intérêt de cette stratégie qui devrait se développer dans les prochaines années. Le positionnement de ces anticorps bispécifiques vis-à-vis d'associations d'anticorps parentaux qui montrent généralement des propriétés antitumorales très similaires dépendra de la facilité de production de ces différentes molécules.

### Éléments de conclusion provisoire

Les anticorps bispécifiques sont des molécules de ciblage originales permettant des stratégies inenvisageables avec les Acm (stimulation de cellules différentes de celles stimulées par les Acm, attaque de cellules tumorales en ciblant plusieurs antigènes tumoraux simultanément, ciblage en deux temps). Ils constituent certainement la prochaine génération de « molécules dérivées des anticorps ». La variété des formats disponibles engendre autant de pharmacocinétiques qu'il faudra étudier et moduler en fonction des objectifs [5].

Jusqu'à présent, les difficultés des systèmes de synthèse traditionnels des anticorps bispécifiques (*quadroma*, synthèse chimique) ont été responsables de leur développement limité. L'ingénierie des anticorps a mis de nombreuses années pour développer des systèmes de synthèse et de production efficaces et adaptés à la clinique (→). La disponibilité de ces méthodes (→) devrait permettre maintenant un développement plus rapide des anticorps bispécifiques tout en résolvant certains problèmes de propriété intellectuelle liés aux méthodes conventionnelles.

Les anticorps bispécifiques ne sont donc pas encore d'un usage clinique quotidien. La définition de leurs fenêtres thérapeutiques viendra des études cliniques en cours. Si l'on se réfère à l'histoire récente des Acm, l'avènement des anticorps bispécifiques pourrait être proche. ♦

### SUMMARY

#### Bisppecific antibodies: what future?

Monoclonal antibodies have emerged as a very successful class of therapeutic agents. In their native format, monoclonal antibodies are monospecific in that they recognize only one epitope, but their Fc domain also binds to FcR-expressing cells. Attempts to improve the cytotoxicity of antibodies, particularly in the cancer field, have led to the design of bispecific antibodies: this can occur through various strategies, such as *quadroma*, thioether-linked Fab' gamma fragments or genetic engineering. Such bispecific antibodies have been developed to enhance immunotherapy, by bridging tumor cells and T cells, or radioimmunotherapy by combining bispecific antibodies and radiolabeled bivalent haptens that bind cooperatively to target cells. Multiple further applications can be envisaged such as targeting two different antigens on the same cell, or two epitopes of the same antigen. Although progresses have been slowed by technical constraints, there is little doubt that this class of novel antibodies derivatives will experience a promising development. ♦

### CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

### RÉFÉRENCES

1. Kufer P, Lutterbüse R, Baeuerle PA. A revival of bispecific antibodies. *Trends Biotechnol* 2004; 22 : 238-44.
2. Staerz UD, Kanagawa O, Bevan MJ. Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells. *Nature* 1985; 314 : 628-31.
3. Glennie MJ, McBride HM, Worth AT, Stevenson GT. Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments. *J Immunol* 1987; 139 : 2367-75.
4. Behar G, Sibéris S, Groulet A, et al. Isolation and characterization of anti-Fc gamma RIII (CD16) llama single-domain antibodies that activate natural killer cells. *Protein Eng Des Sel* 2008; 21 : 1-10.
5. Müller D, Kontermann RE. Recombinant bispecific antibodies for cellular cancer immunotherapy. *Curr Opin Mol Ther* 2007; 9 : 319-26.
6. Bargou R, Leo E, Zugmaier G, et al. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* 2008; 321 : 974-7.
7. Hamers-Casterman A, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 1993; 363 : 446-8.
8. Willems A, Schoonooghe S, Eeckhout D, et al. CD3 x CD28 cross-interacting bispecific antibodies improve tumor cell dependent T-cell activation. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54 : 1059-71.
9. Wu C, Ying H, Grinnell C, et al. Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin. *Nat Biotechnol* 2007; 25 : 1290-7.
10. Baeuerle PA, Reinhardt C, Kufer P. BiTE : a new class of antibodies that recruit T-cells. *Drugs of the Future* 2008; 33 : 137-47.
11. Le Doussal JM, Martin M, Gautherot E, et al. In vitro and in vivo targeting of radiolabeled monovalent and divalent haptens with dual specificity monoclonal antibody conjugates : enhanced divalent hapten affinity for cell-bound antibody conjugate. *J Nucl Med* 1989; 30 : 1358-66.
12. Goldenberg DM, Chatal J, Barbet J, et al. Cancer imaging and therapy with bispecific antibody pretargeting. *Update Cancer Ther* 2007; 2 : 19-31.
13. Goldenberg DM, Rossi EA, Sharkey RM, et al. Multifunctional antibodies by the Dock-and-Lock method for improved cancer imaging and therapy by pretargeting. *J Nucl Med* 2008; 49 : 158-63.
14. Robert B, Dorvillius M, Buchegger F, et al. Tumor targeting with newly designed biparatopic antibodies directed against two different epitopes of the carcinoembryonic antigen (CEA). *Int J Cancer* 1999; 81 : 285-91.
15. Dorvillius M, Garambois V, Pourquier D, et al. Targeting of human breast cancer by a bispecific antibody directed against two tumour-associated antigens : ErbB-2 and carcinoembryonic antigen. *Tumour Biol* 2002; 23 : 337-47.
16. Robinson MK, Hodge KM, Horak E, et al. Targeting ErbB2 and ErbB3 with a bispecific single-chain Fv enhances targeting selectivity and induces a therapeutic effect *in vitro*. *Br J Cancer* 2008; 99 : 1415-25.
17. Lu D, Zhang H, Koo H, et al. A fully human recombinant IgG-like bispecific antibody to both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor for enhanced antitumor activity. *J Biol Chem* 2005; 280 : 19665-72.
18. Qu Z, Goldenberg DM, Cardillo TM, et al. Bispecific anti-CD20/22 antibodies inhibit B-cell lymphoma proliferation by a unique mechanism of action. *Blood* 2008; 111 : 2211-9.

### TIRÉS À PART

A. Pèlerin

