

Nota Bene

La présentation suivante a été réalisée par un groupe d'étudiants du parcours Immunotechnologies pour la validation du module BMC532AC. Cette présentation n'a pas été corrigée et peut contenir des erreurs de forme ou de fond.

Thème 5 :

Optimisation des AcM,
glycosylation et
mutagenèse du Fc des
AcM

XXX

XXX

1/ Introduction

2/ Fc et immunostimulation /
thérapie antitumorale
(article 1 et 2)

3/ Fc et immunosuppression / rejet
d'allogreffe (article 3)

4/ Conclusion

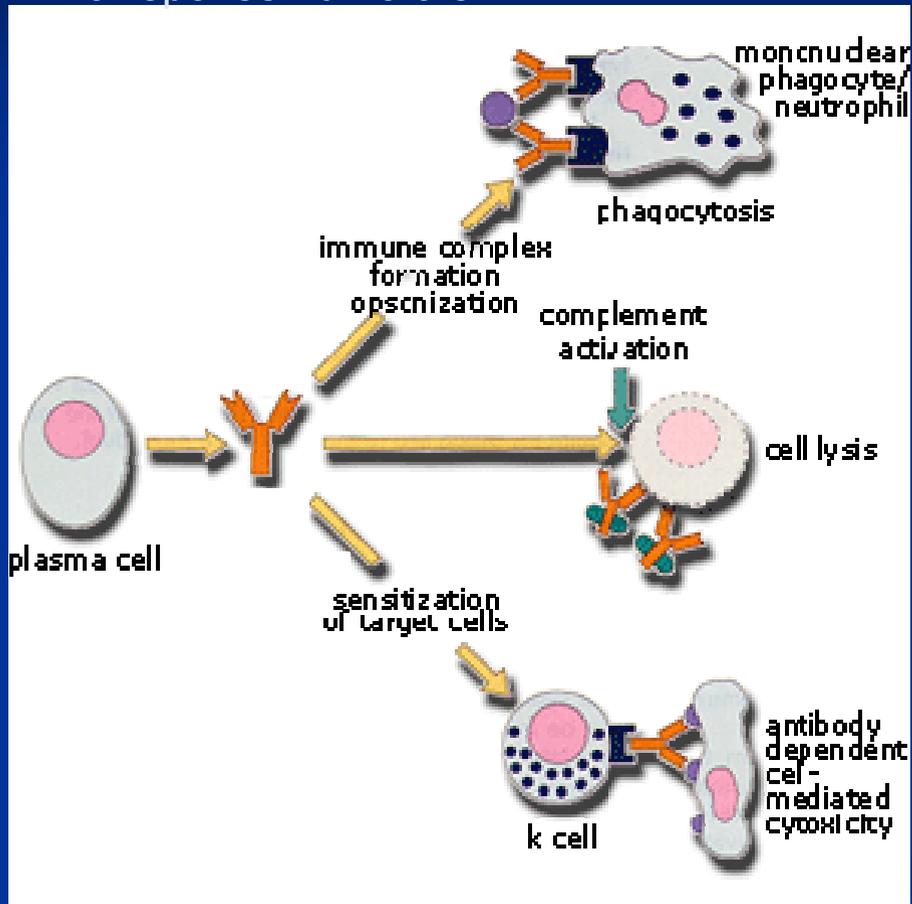
1) Introduction

- Les anticorps monoclonaux dans la réponse immunitaire:
 - Activation → lutte anti-tumorale
 - Inhibition → rejet de greffe
- Modification du fragment constant (Fc)

2) Fc et immunostimulation / thérapie antitumorale (article 1 et 2)

Rappels (1)

La réponse humorale



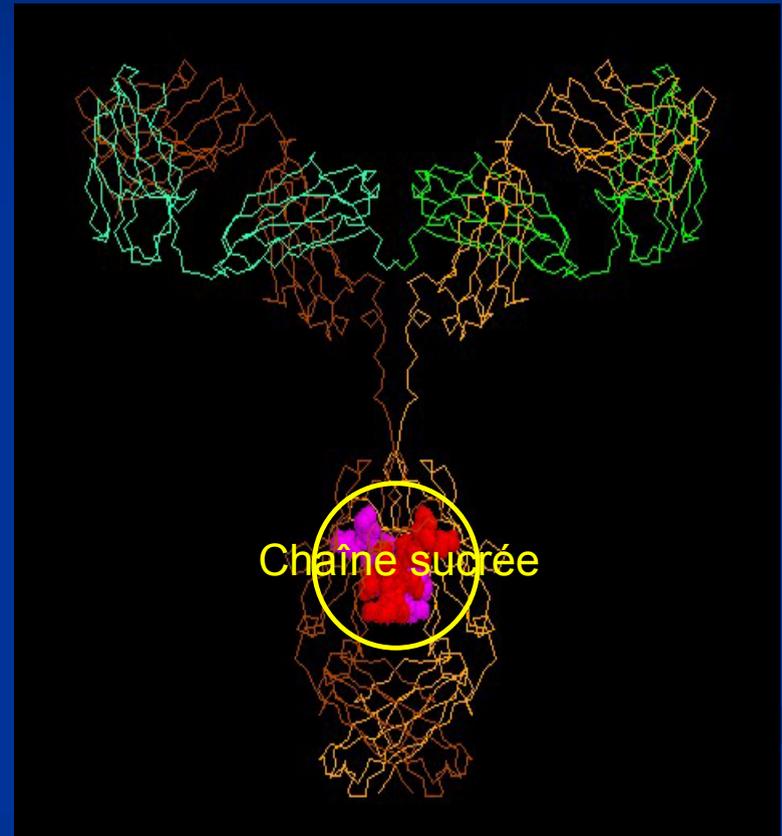
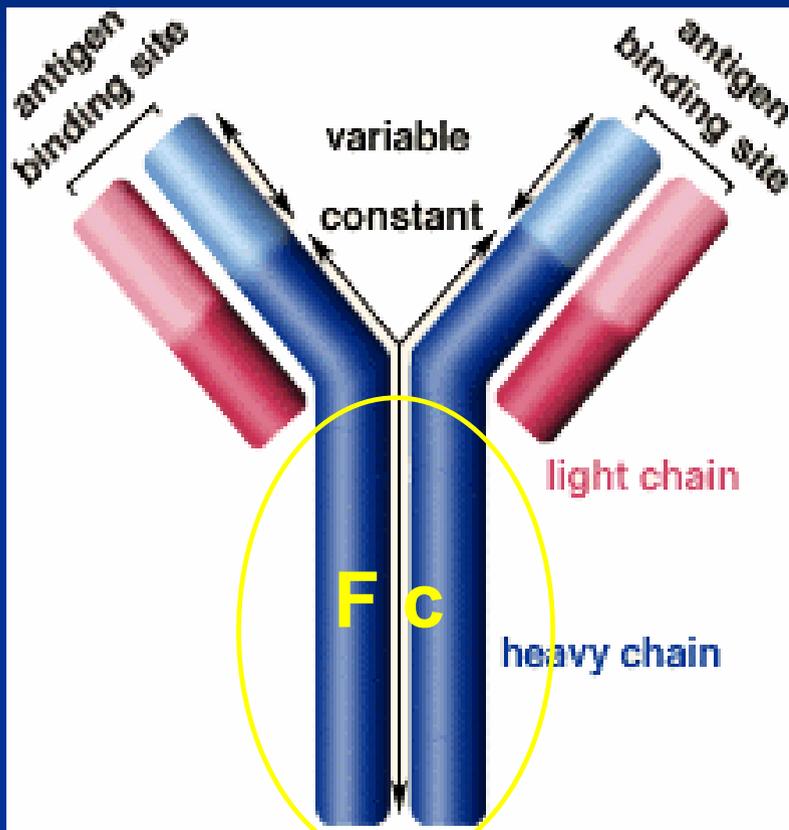
■ ADCP

■ CDC

■ ADCC

Rappels (2)

Structure de l'anticorps



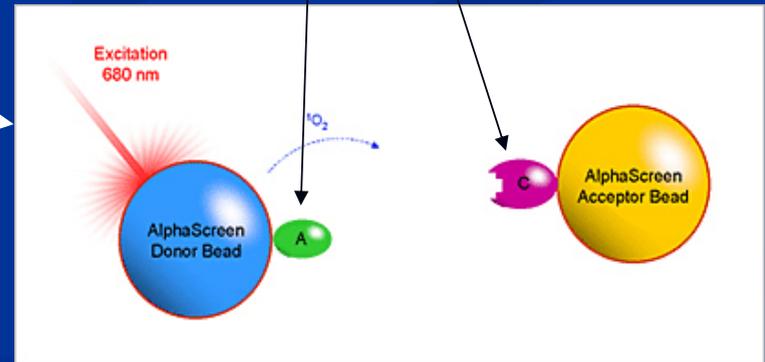
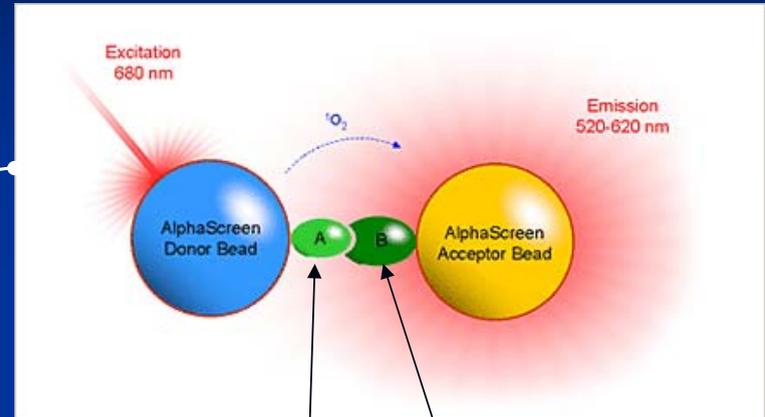
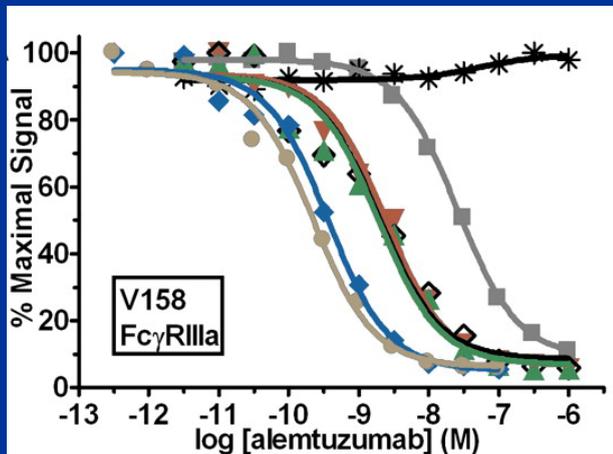
Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function

- But: Créer des anticorps thérapeutique à cytotoxicité accrue.
- Approche: optimisation de la liaison Fc / FcRs activateurs
- Méthode: mutagenèse dirigée du Fc

Résultats (1)

- Conception de mutants du Fc
- Criblage d'affinité

Compétition avec les variants Fc



L'AlphaScreen

Résultats (2)

- 5 variants à forte affinité ont été isolés par cette technique:
 - S239D et I332E
 - S239D/I332E
 - S239D/I332E/A330L
- Les variants Fc produisent:
 - Une ADCC améliorée
 - Les PBMC montrent une activité cytotoxique accrue
 - Une ADCP améliorée
 - La phagocytose est améliorée via les phagocytes
 - Une CDC qui est fonction des variants
 - S239D/I332E stimule la CDC au même titre qu'un WT
 - S239D/I332E/A330L ne stimule pas la CDC → la protéine C1q se lierait au site A330.

Résultats (3)

- Utilisation du double mutant dans une étude préclinique :
 - Test de déplétion des cellules B chez les macaques
- Résultats encourageants : taux de déplétion supérieur à celui des AcM thérapeutiques commercialisés.

Article 2:

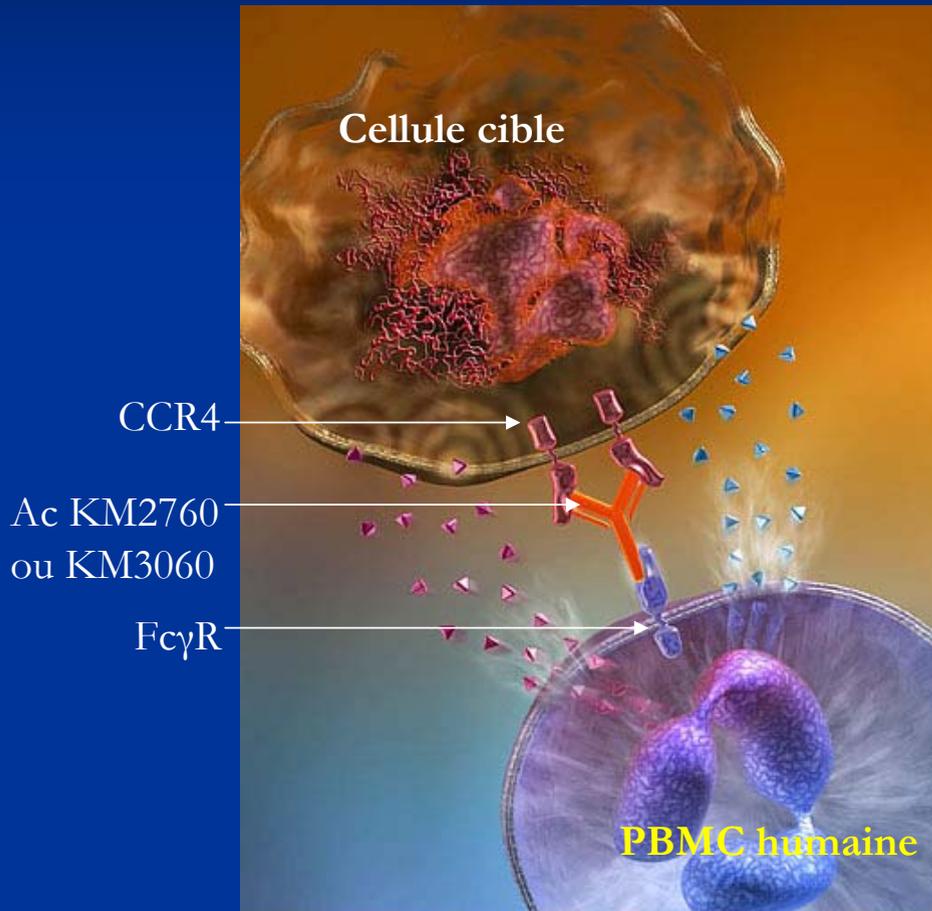
Defucosylated Chimeric Anti-CC Chemokine receptor 4 IgG1 with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity shows potent therapeutic activity to T-Cell Leukemia and Lymphoma

- But: tester un anticorps améliorant la cytotoxicité.
- Approche: utilisation d'un Fc qui a une affinité accrue pour son récepteur.
- Méthode: utilisation d'un anticorps défucosylé

Résultats (1)

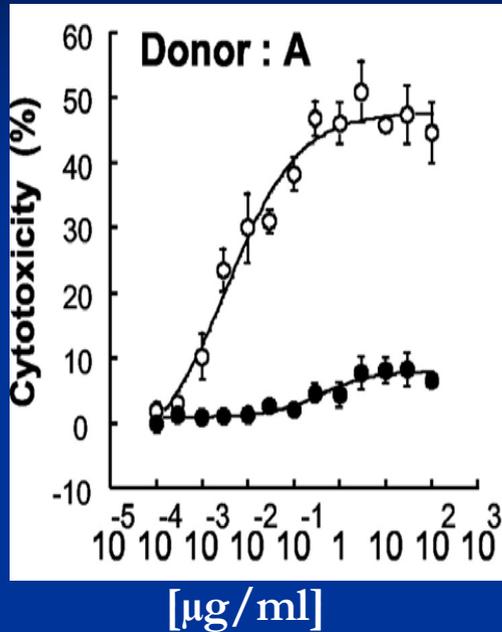
- Comparaison de la cytotoxicité induite par 2 AcMs chimériques anti-CCR4:
 - Défucosylé → KM 2760
 - Fucosylé → KM3060
- L'affinité de liaison à CCR4 est la même pour les 2 AcMs, seule la chaîne sucrée change.

Résultats(2)

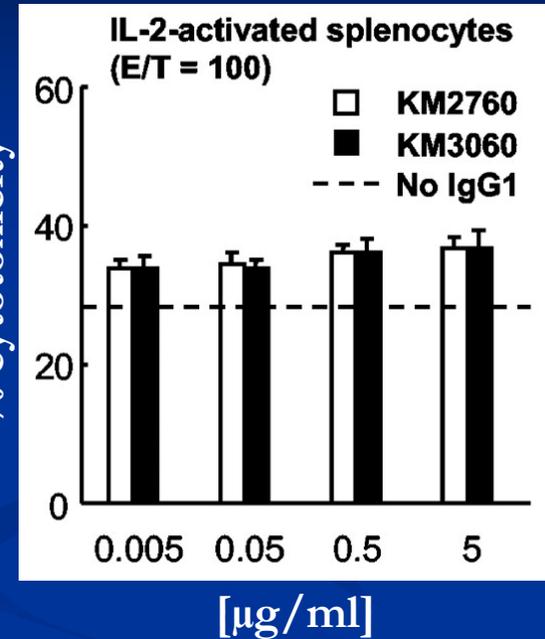


- KM 2760 induit plus de cytotoxicité que KM 3060 sur le modèle CCR4/E14 .
- Cette cytotoxicité s'applique aux tumeurs surexprimants CCR4.

Résultats(3)



- *In Vivo*, l'efficacité antitumorale des AcMs dépend entièrement de la présence de PBMC humaines chez les souris SCID.



- Dans un modèle *in-vitro*, les cellules effectrices murines ne sont pas activées par KM 2760.

Résultats(4)

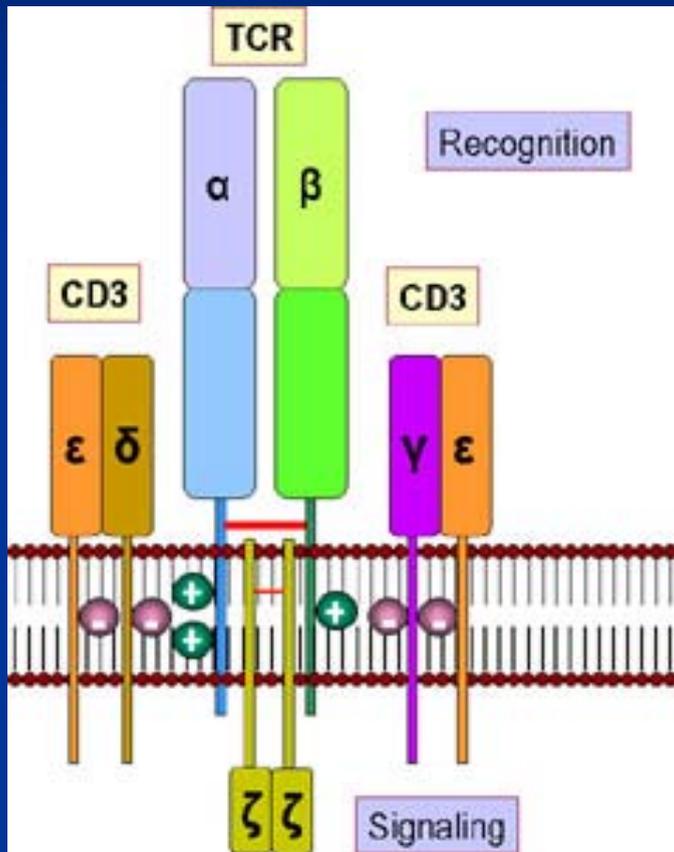
- KM2760 est efficace chez la souris
 - Mode d'action **inconnu**.
 - L'Ac défucosylé n'active pas les mêmes cellules effectrices que chez les humains.
 - Son action passe malgré tout par les **FcγR**.
- ➔ L'efficacité antitumorale est encourageante en présence d'effecteurs humains.

3) Fc et immunosuppression / rejet d'allogreffe (article 3)

Non-Fc receptor-binding humanized anti-CD3 antibodies induce apoptosis of activated Human T cells.

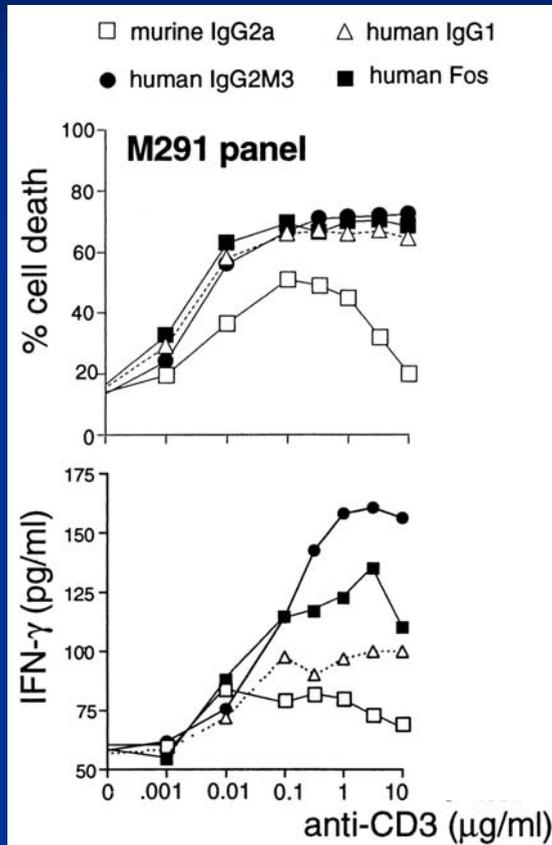
- But: tester les effets d'un anticorps anti-CD3 sur l'immunosuppression.
- Approche: inhibition de la liaison Fc / FcRs
- Méthode: utilisation d'anticorps mutés dans le Fc.

Résultats (1)

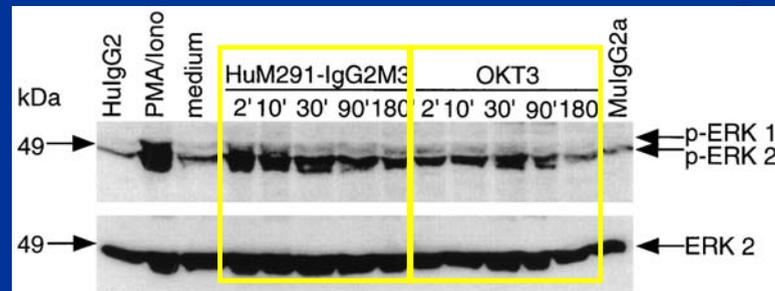


- Les anticorps anti-CD3
 - Murins / chimériques / humanisés
 - Soluble
 - Insoluble (lié au récepteur)

Résultats (2)



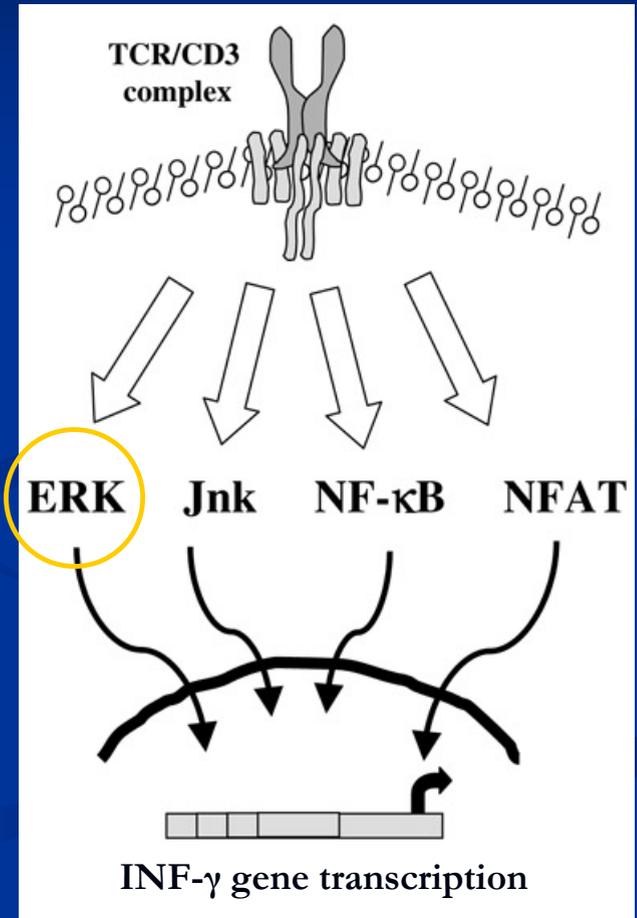
- Les anti-CD3 solubles provoquent :
 - Une apoptose des LT activés
 - une sécrétion d'INF-γ



- Les anticorps anti CD3 humanisés solubles induisent une phosphorylation soutenue de ERK2.

Résultats (3)

- Une internalisation rapide du TCR est associée à une apoptose diminuée des cellules T.
- Les anticorps anti-CD3 solubles:
 - Liaison transitoire au TCR-CD3
 - Internalisation faible du TCR
 - Stimulation prolongée de la voie signalisation ERK2
 - Apoptose accrue



Conclusion

- La réponse humorale ne dépend pas uniquement de la partie variable de l'anticorps mais également du fragment constant qui joue un rôle prépondérant dans la modulation de la réponse humorale.
- Il a été prouvé qu'en ne jouant que sur cette partie on peut au choix augmenter la réponse immunitaire ou au contraire la supprimer.
- Les anticorps thérapeutiques existants sont donc perfectibles.

MERCI

Les acteurs

■ Les FcRs :

- Activateurs: FcγR I, IIa, IIc, IIIa et IIIb
- Inhibiteur: FcγRIIb

■ Les variants du Fc:

- Simples mutants: S239D et I332E
- Double mutant: S239D/I332E
- Triple mutant: S239D/I332E/A330L

Résultats (1)

- Comment ont-ils conçu et sélectionné les variants avec une affinité accrue?
 - 2 possibilités pour la conception:
 - Des informations structurales existaient
 - Informations incomplètes ou inexistantes
 - Sélection:
 - Criblage pour leur affinité par AlphaScreen assay
 - Mesure absolue de l'affinité par SRP (profile IIIa:IIb)

Résultats (2)

- Les variants Fc produisent:
 - Une ADCC améliorée
 - Les PBMC montrent une activité cytotoxique accrue
 - mesure de la lyse cellulaire par la technique LDH ou Europium.
 - Une ADCP améliorée
 - La phagocytose est améliorée via les phagocytes
 - Mesure de la phagocytose par marquage différentiel des cellules cibles et des cellules effectrices et FACS
 - Une CDC qui est fonction des variants
 - S239D/I332E stimule la CDC au même titre qu'un WT
 - S239D/I332E/A330L ne stimule pas la CDC → A330 se lierait au site de fixation de la protéine C1q
 - Mesure de la lyse par Alamar Blue
 - déplétion améliorée des cellules B chez les macaques
 - Un test qui permet d'estimer l'efficacité chez l'Homme
 - Mesure de la déplétion par FACS en fonction des marqueurs cellulaires.

Résultats (2)

- Les anticorps solubles humanisés sont les moins enclins à induire un relargage de cytokines et la prolifération des cellules T périphériques au repos tout en induisant une apoptose accrue.

Résultats

- Les cellules T périphériques activées ou engagées dans un cycle cellulaire subissent l'apoptose suite à une exposition aux anti CD3 solubles.