

Transgénèse animale et humanisation des anticorps : des souris pour des hommes

Michel Cogné, Sophie Duchez et Virginie Pascal.

Université de Limoges, Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine, F-87025 LIMOGES, France ; CNRS, UMR6101, Limoges, FRANCE,

Depuis l'établissement par Kohler et Milstein des méthodes de production d'hybridomes à partir des cellules B de rongeurs immunisés, les anticorps monoclonaux constituent la référence en matière d'anticorps définis et de haute spécificité [1]. Les anticorps murins restent utilisables en thérapeutique humaine pour des traitements brefs, et l'anti-CD3 (Muromomab) introduit en 1986 a été largement utilisé pour le conditionnement immunosuppresseur avant greffe d'organe. Immunogènes chez l'homme, ces anticorps animaux peuvent cependant être neutralisés et/ou induire des réactions allergiques. Diverses voies ont donc été développées pour les rapprocher des anticorps humains et en améliorer l'efficacité et la tolérance chez l'homme. Cette « humanisation » peut être réalisée en retouchant *in vitro* la séquence d'un anticorps animal produit par biotechnologie (cf autre article de ce M/S), ou bien directement *via* l'immunisation d'animaux dont le répertoire des gènes d'immunoglobulines a été préalablement humanisé. De nombreux anticorps issus de tels animaux sont en essai ou déjà commercialisés et apparaissent comme des drogues particulièrement sûres. L'intérêt de ces animaux est lié au large répertoire d'antigènes qu'ils peuvent reconnaître, y compris s'agissant d'antigènes humains. S'y ajoute la possibilité de dériver ainsi aussi bien des anticorps monoclonaux que polyclonaux (ou des cocktails oligoclonaux). A l'inverse, le développement des méthodes de production d'anticorps humains à partir de lymphocytes humains garde des limites en termes de répertoire, notamment vis-à-vis des auto-antigènes.

Alors que la transgénèse a pu être utilisée chez de grands mammifères tels la chèvre pour la production abondante d'un anticorps défini, le seul animal permettant à ce jour de reconstituer un répertoire diversifié d'anticorps humanisés est la souris. La première description de souris exprimant un répertoire restreint de gènes d'Ig humains date de 1989 [2]. L'utilisation de longs transgènes humains qui incluaient 2 à 5 régions variables (capables de réarrangements V(D)J) et plusieurs gènes constants (capables de subir la commutation de classe) à ensuite été combinée à l'inactivation des gènes endogènes des anticorps de souris [3-5]. Ces modèles ont permis malgré un répertoire V assez restreint d'obtenir des hybridomes producteurs d'anticorps spécifiques parce qu'une part notable de la diversité des anticorps provient de la diversité jonctionnelle puis de la maturation d'affinité par hypermutation somatique, bien plus que de la diversité combinatoire des différents segments germinaux. Un nombre restreint de segments V induit cependant des lacunes du répertoire, en particulier contre des antigènes polysaccharides connus comme ciblés par des anticorps aux séquences germinales sans besoin d'hypermutation somatique [6].

En restant dans des fonds génétiques murins déficients pour les gènes d'Ig endogènes, des lignées transgéniques disposant d'un nombre plus élevé de segments V ont donc été générées, améliorant l'étendue du répertoire et permettant la reconstitution de compartiments B de taille plus proche de la normale [7, 8]. Ces lignées ont été produites tant par transgénèse classique, que par fusion de cellules ES avec des protoplastes pour le transfert de chromosomes de levure porteurs de larges transgènes humains, ou encore par fusion d'ES avec des microcellules dérivées de fibroblastes humains et apportant un minichromosome humain. Des lignées portant les locus IgH et Igk (*HuMAb mouse* de Medarex), ou portant en plus le locus Igλ (*Xenomouse* d'ABgenix) ont notamment ainsi été créées, à partir desquelles des anticorps de haute affinité ont été obtenus [9, 10][11, 12].

Des approches chimériques ont également été réalisées en parallèle, avec l'établissement de lignées murines chez lesquelles les réarrangements des segments V, D et J endogènes sont respectés, mais où les segments VDJ réarrangés peuvent s'exprimer en association à une région constante de chaîne lourde humaine. Ainsi, Zou et Rajewsky ont-ils remplacé les exons codant la partie sécrétée de la chaîne $\gamma 1$ de l'IgG1 murine par des exons $\gamma 1$ humains, substituant efficacement par des IgG1 humaines chimériques les réponses humorales IgG1 de ces animaux, tout en gardant le répertoire VDJ murin [13]. Enfin l'approche chimérique peut maintenant bénéficier de la disponibilité d'animaux qui correspondent simplement à l'insertion d'un gène constant humain $\gamma 1$ ou $\alpha 1$ en aval des clusters V, D et JH du locus IgH de la souris. Ces animaux permettent donc d'obtenir d'emblée après fusion, des hybridomes spécifiques d'antigène et d'isotype prédéfini, soit IgG1 soit IgA1, autorisant donc dès le stade des hybridomes initiaux les tests fonctionnels propres à l'isotype souhaité *in fine* (brevets Cogné et coll 2005, Cogné et coll 2008).

Tous ces animaux mutants sont caractérisés par une maturation B relativement normale en terme de taille des compartiments B, de réarrangements VDJ, de réarrangements de switch et d'hypermutation [14]. Ils ont ainsi permis de dériver un certain nombre d'anticorps de forte affinité et d'intérêt commercial, aussi bien contre de petites molécules [15], des protéines de pathogènes [16, 17], des polysaccharides [18], des protéines humaines solubles et des cytokines comme l'IL15 [19][20, 21] ou membranaires tels que l'antigène prostate-spécifique PSMA, CD20, CD30 ou le récepteur à l'EGF [22-24] et des Ag associés à des tumeurs comme l'antigène carcino embryonnaire [25].

Les premiers résultats à propos de tous ces monoclonaux semblent très encourageants quant à leur faible immunogénicité chez l'homme. Ainsi, en est-il avec le panitumumab, anti EGFR bloquant la liaison récepteur-ligand (Abgenix / Amgen, Thousand Oaks, CA, USA). Les patients traités par le panitumumab ne développent pas d'anticorps polyclonaux contre l'anticorps thérapeutique [26].

Un autre anticorps apparemment très bien toléré est le denosumab [20] (Amgen, Thousand Oaks, CA, USA), visant à combattre l'ostéoporose en ciblant le régulateur du remodelage osseux RANKL. La faible variabilité de la pharmacocinétique entre patients semble indiquer l'absence de réponse immune contre le desomumab.

Même chez des patients porteurs de pathologies inflammatoires ou auto-immunes, la même absence de réponse immune a été observée vis-à-vis du zanolimumab [27] (Genmab, Copenhagen), qui lie le marqueur spécifique des lymphocytes T CD4 (avec un intérêt dans les lymphomes T et les pathologies auto-immunes). Même constat avec l'ipilimumab, [28, 29] de Medarex (Princeton, NJ, USA) et Bristol-Myers Squibb (Wallingford, CT) prescrit dans le mélanome et activateur des réponses immunes en ciblant le récepteur inhibiteur CTLA-4. Globalement les essais cliniques semblent donc indiquer une excellente tolérance de ces anticorps. Cette observation pourrait traduire une meilleure stabilité (des CDR3 et des paires H-L) des anticorps sélectionnés chez l'animal, alors corrélée à une moindre immunogénicité [30].

Par contraste, d'autres monoclonaux thérapeutiques (tant chimériques qu'humanisés par greffe des CDR, voire issus de séquences humaines via des bibliothèques de phage display) ont pu se révéler occasionnellement immunogènes en clinique (Humira anti TNF, anti- IL-12, ...), [31]. Il convient d'ailleurs de noter que toute séquence V même strictement humaine peut être potentiellement immunogène chez l'homme et stimuler l'apparition d'anti-idiotypes.

En plus de permettre l'obtention d'anticorps stables et peu immunogènes, l'utilisation d'animaux transgéniques présente l'intérêt de fournir des molécules qui possèdent d'emblée

les fonctions effectrices souhaitées pour la molécule thérapeutique finale, et peuvent donc entrer rapidement dans des tests de screening fonctionnel. A l'inverse, les régions variables créées artificiellement ou par phage display nécessitent un processus plus long de greffe sur des régions effectrices avant de pouvoir être validées et de permettre le choix des anticorps les plus intéressants dans une application et contre une cible donnée.

L'obtention d'hybridomes peut aussi permettre d'aller de la caractérisation initiale d'un anticorps jusqu'à sa production industrielle en gardant un seul système d'expression. Cependant même s'agissant d'hybridomes, l'étape de la production industrielle à long terme sera souvent finalement réalisée par clonage dans des vecteurs d'expression et utilisation de transfectants stables.

Pour des applications où il serait intéressant de mimer une réponse physiologique et de reconstituer l'équivalent d'un sérum polyclonal ou oligoclonal capable de neutraliser simultanément un grand nombre d'épitopes d'un antigène complexe, l'utilisation d'animaux transgéniques humanisés est également intéressante parce qu'elle permet d'obtenir rapidement une variété d'anticorps de mêmes fonctions effectrices et possédant des paratopes et des affinités variés.

Pour l'ensemble de ces raisons, les souris transgéniques humanisées constituent aujourd'hui des outils directs et séduisants, parmi l'ensemble des stratégies propres à permettre l'obtention d'anticorps d'intérêt thérapeutique.

Références

Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-7.

Bruggemann M, Caskey HM, Teale C, et al. A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 6709-13.

Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, et al. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 1994; 368: 856-9.

Green LL, Hardy MC, Maynard-Currie CE, et al. Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet* 1994; 7: 13-21.

Taylor LD, Carmack CE, Huszar D, et al. Human immunoglobulin transgenes undergo rearrangement, somatic mutation and class switching in mice that lack endogenous IgM. *Int Immunol* 1994; 6: 579-91.

Adderson EE, Shackelford PG, Insel RA, Quinn A, Wilson PM, Carroll WL. Immunoglobulin light chain variable region gene sequences for human antibodies to Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide are dominated by a limited number of V kappa and V lambda segments and VJ combinations. *J Clin Invest* 1992; 89: 729-38.

Mendez MJ, Green LL, Corvalan JR, et al. Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nat Genet* 1997; 15: 146-56.

Green LL, Jakobovits A. Regulation of B cell development by variable gene complexity in mice reconstituted with human immunoglobulin yeast artificial chromosomes. *J Exp Med* 1998; 188: 483-95.

Tomizuka K, Shinohara T, Yoshida H, et al. Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 722-7.

Kuroiwa Y, Tomizuka K, Shinohara T, et al. Manipulation of human minichromosomes to carry greater than megabase-sized chromosome inserts. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 1086-90.

Popov AV, Zou X, Xian J, Nicholson IC, Bruggemann M. A human immunoglobulin lambda locus is similarly well expressed in mice and humans. *J Exp Med* 1999; 189: 1611-20.

Nicholson IC, Zou X, Popov AV, et al. Antibody repertoires of four- and five-feature translocus mice carrying human immunoglobulin heavy chain and kappa and lambda light chain yeast artificial chromosomes. *J Immunol* 1999; 163: 6898-906.

Zou YR, Muller W, Gu H, Rajewsky K. Cre-loxP-mediated gene replacement: a mouse strain producing humanized antibodies. *Curr Biol* 1994; 4: 1099-103.

Harding FA, Lonberg N. Class switching in human immunoglobulin transgenic mice. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 764: 536-46.

Ball WJ, Jr., Kasturi R, Dey P, et al. Isolation and characterization of human monoclonal antibodies to digoxin. *J Immunol* 1999; 163: 2291-8.

Mukherjee J, Chios K, Fishwild D, et al. Human Stx2-specific monoclonal antibodies prevent systemic complications of Escherichia coli O157:H7 infection. *Infect Immun* 2002; 70: 612-9.

He Y, Honnen WJ, Krachmarov CP, et al. Efficient isolation of novel human monoclonal antibodies with neutralizing activity against HIV-1 from transgenic mice expressing human Ig loci. *J Immunol* 2002; 169: 595-605.

Chang Q, Zhong Z, Lees A, Pekna M, Pirofski L. Structure-function relationships for human antibodies to pneumococcal capsular polysaccharide from transgenic mice with human immunoglobulin Loci. *Infect Immun* 2002; 70: 4977-86.

Villadsen LS, Schuurman J, Beurskens F, et al. Resolution of psoriasis upon blockade of IL-15 biological activity in a xenograft mouse model. *J Clin Invest* 2003; 112: 1571-80.

Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, et al. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 1059-66.

Yang XD, Corvalan JR, Wang P, Roy CM, Davis CG. Fully human anti-interleukin-8 monoclonal antibodies: potential therapeutics for the treatment of inflammatory disease states. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 401-10.

Teeling JL, French RR, Cragg MS, et al. Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2004; 104: 1793-800.

Schuler W, Bigaud M, Brinkmann V, et al. Efficacy and safety of ABI793, a novel human anti-human CD154 monoclonal antibody, in cynomolgus monkey renal allotransplantation. *Transplantation* 2004; 77: 717-26.

Bleeker WK, Lammerts van Bueren JJ, van Ojik HH, et al. Dual mode of action of a human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for cancer therapy. *J Immunol* 2004; 173: 4699-707.

Imakiire T, Kuroki M, Shibaguchi H, et al. Generation, immunologic characterization and antitumor effects of human monoclonal antibodies for carcinoembryonic antigen. *Int J Cancer* 2004; 108: 564-70.

Foon KA, Yang XD, Weiner LM, et al. Preclinical and clinical evaluations of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58: 984-90.

Skov L, Kragballe K, Zachariae C, et al. HuMax-CD4: a fully human monoclonal anti-CD4 antibody for the treatment of psoriasis vulgaris. *Arch Dermatol* 2003; 139: 1433-9.

Keler T, Halk E, Vitale L, et al. Activity and safety of CTLA-4 blockade combined with vaccines in cynomolgus macaques. *J Immunol* 2003; 171: 6251-9.

Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8372-7.

Hermeling S, Crommelin DJ, Schellekens H, Jiskoot W. Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. *Pharm Res* 2004; 21: 897-903.

Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, et al. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 2069-79.

Cogné M, Sirac C., Bardel M., Decourt C., Laroche C , Brevet WO2005047333 , 2005
« Mammifère non-humain transgénique pour la région constante de la chaîne lourde des IgA humaines et ses applications (monoclonaux humanisés à destinée muqueuse) »

Cogné M, Duchez S, Cogné N, Pinaud E, Brevet 08/00319, 2008, « Mammifère non-humain transgénique pour la région constante de la chaîne lourde des immunoglobulines humaines de classe G et ses applications».

Figure 1. Transgènes d'immunoglobulines humaines introduits chez la souris. Les locus des chaînes lourdes et légère λ , κ ... sont représentés en configuration germinale. Les gènes introduits par insertion aléatoire dans le génome des souris transgénique sont schématisés en précisant le nombre de segments V et de gènes constants inclus dans les transgènes.

Figure 2. Séquences d'immunoglobulines humaines introduites dans le génome de la souris. Le locus des chaînes lourdes de la souris a été ciblé de façon à y introduire par recombinaison homologue des séquences provenant de régions constantes γ ou α des gènes d'immunoglobulines humains.

Transgènes humains:

Chaîne lourde

Chaîne κ

Chaîne λ

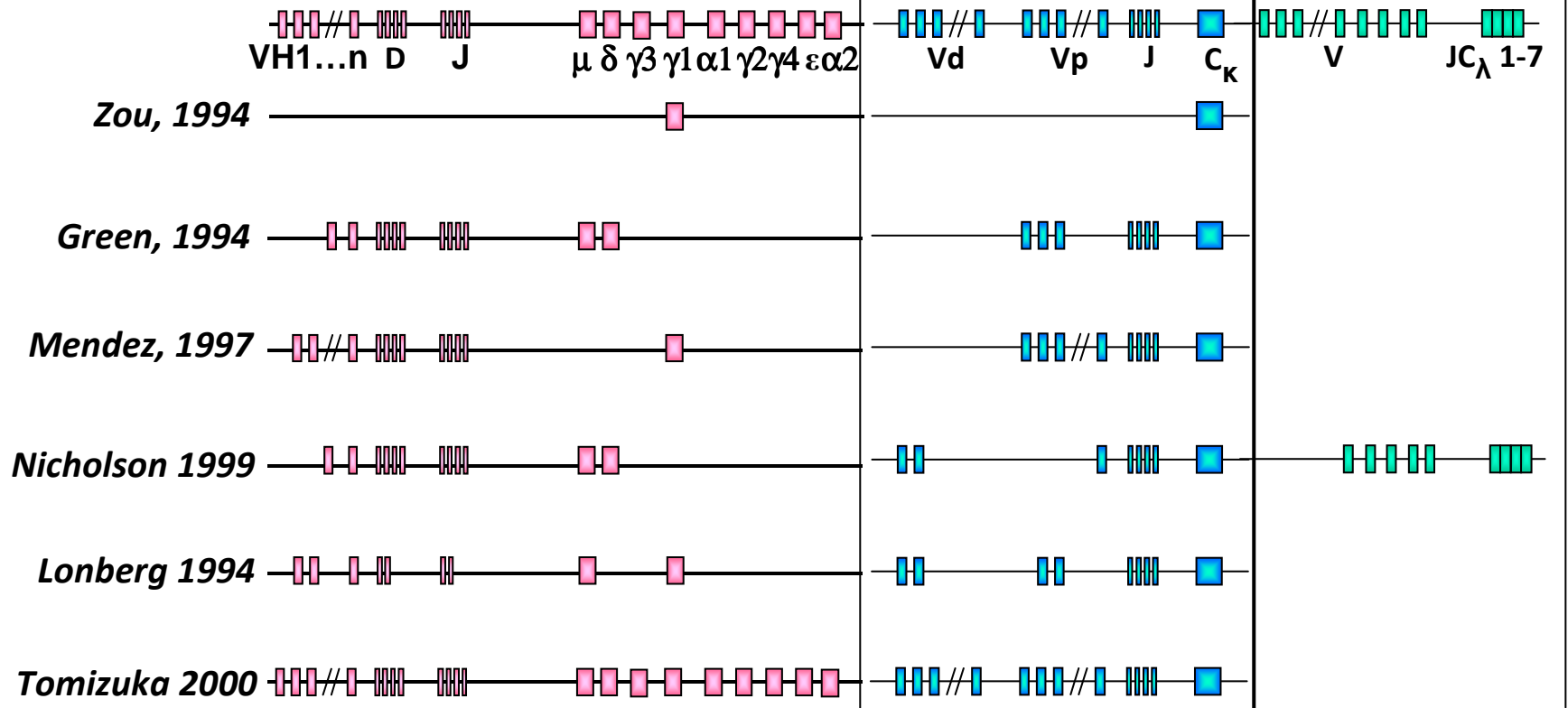
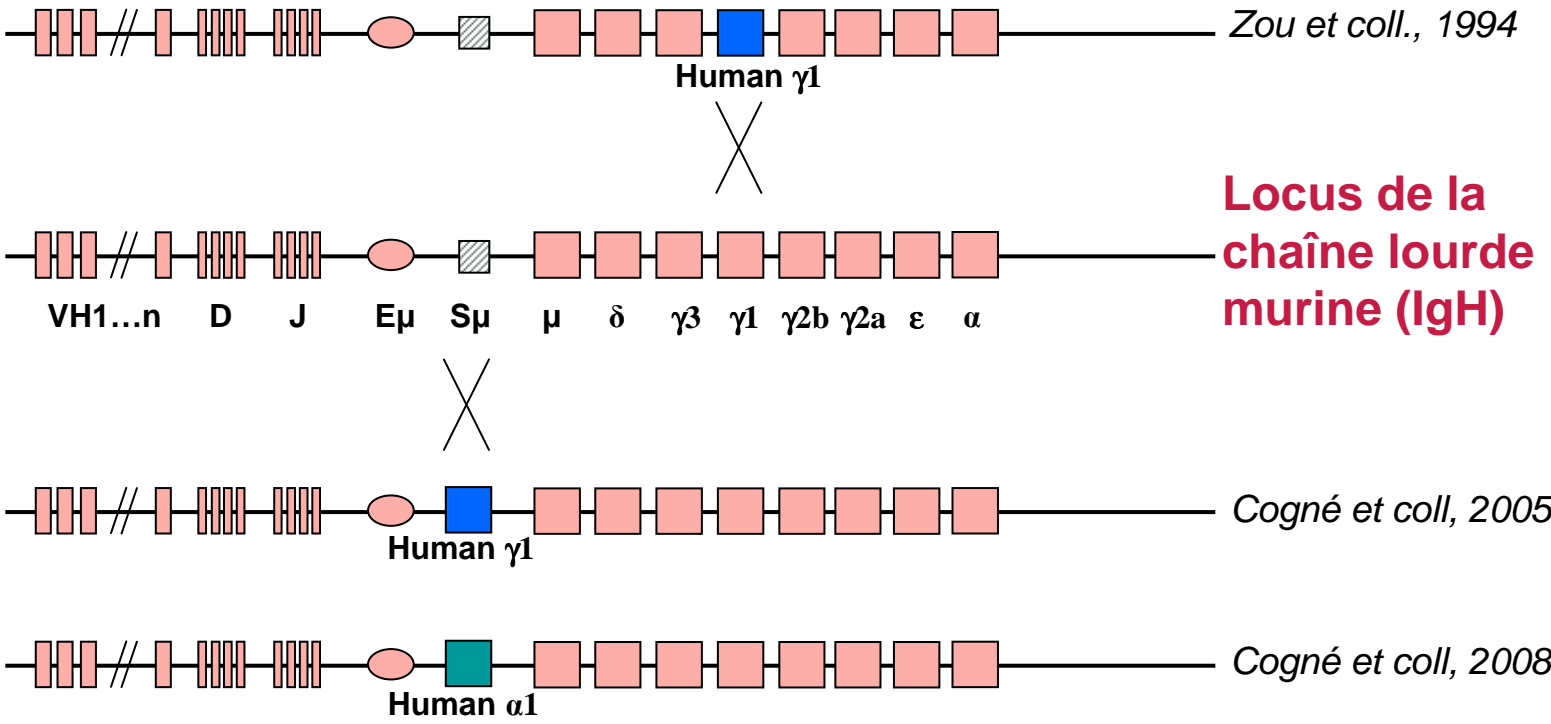


Figure 1

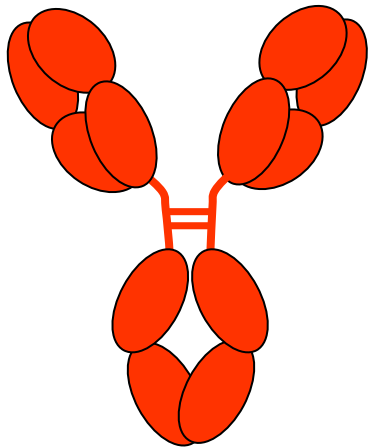


Des anticorps murins...

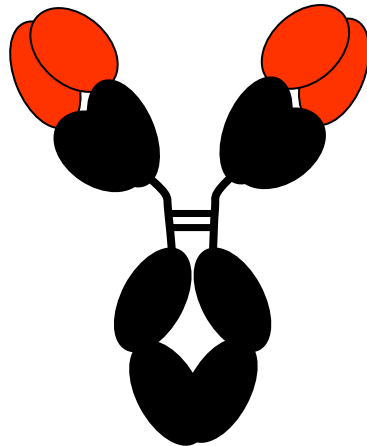
...aux anticorps humains

Fonctions effectrices
imparfaites
Acm immunogènes (HAMA)

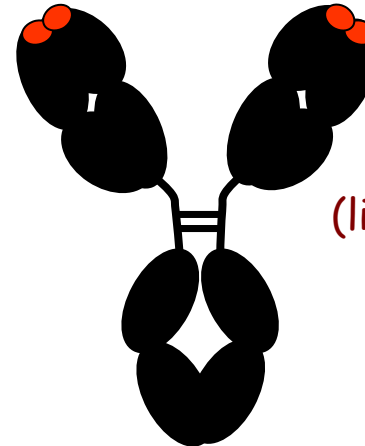
Acm plus actifs
Moins antigéniques
Demi-vie accrue



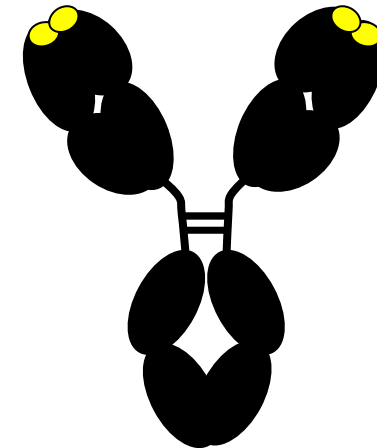
Acm murins
(hybridomes)
1975
...(m)omab



Acm chimériques
(biotechnologie / souris
chimériques humanisées)
1984 ...ximab



Acm humanisés
(biotechnologie)
1988-1991
...zumab



Acm intégralement humains
(bibliothèques humaines phage display
/ souris humanisées)
1994-1999
...(m)umab