

Immunoconjugués cytotoxiques, anticorps « armés » contre le cancer

Marie-Priscille Brun est responsable du groupe Immunoconjugués au sein de la plateforme Integrated Drug Discovery chez Sanofi R&D.

1 Les immunoconjugués, une réalité thérapeutique

Les immunoconjugués cytotoxiques sont des anticorps armés pour combattre le cancer. Ils sont une réalité thérapeutique pour un certain nombre de patients : cinq ont été approuvés sur le marché, dont quatre sont dédiés aux tumeurs liquides, que ce soit des leucémies² ou des lymphomes³, et un au cancer

du sein (*Figure 1*). Ce dernier immunoconjugué est la combinaison du trastuzumab avec l'emtansine, une drogue de chimiothérapie (voir le *Chapitre de J.-P. Armand* dans cet ouvrage *Chimie et nouvelles thérapies*, EDP Sciences, 2020).

Aujourd'hui la recherche est très active dans ce domaine avec plus de quatre-vingts produits en développement clinique autour de plus de 600 essais cliniques. Cinq de ces produits sont dans des phases très avancées de pré-enregistrement, et on espère que davantage arriveront sur le marché pour les patients.

1. www.sanofi.com/fr

2. Leucémie : cancer du sang.

3. Lymphome : cancer qui touche les globules blancs.



Figure 1

Les immunoconjugués sur le marché en novembre 2019.

1.1. Définition d'un immunoconjugué

Un immunoconjugué (en anglais *antibody-drug-conjugate*, ADC) est une molécule complexe qui résulte de la conjugaison (accrochage) entre un anticorps et un agent cytotoxique par le biais d'un « agent de liaison » (espaceur, « *linker* » en anglais) (Figure 2). L'agent cytotoxique (*cyto*, cellule en grec) est une molécule tueuse de cellules.

Les immunoconjugués cytotoxiques utilisent des molécules très puissantes : 100 à 1 000 plus puissantes que le Taxotère® (voir le **Chapitre J. Cossy** dans *Chimie et nouvelles thérapies*, EDP Sciences, 2020). Ces molécules ne sont pas utilisables en tant que telles en chimiothérapie car elles sont beaucoup trop toxiques. En revanche, les conjuguer à un anticorps qui cible un antigène de surface spécifique de la tumeur permet de faire une chimiothérapie ciblée à la tumeur, et

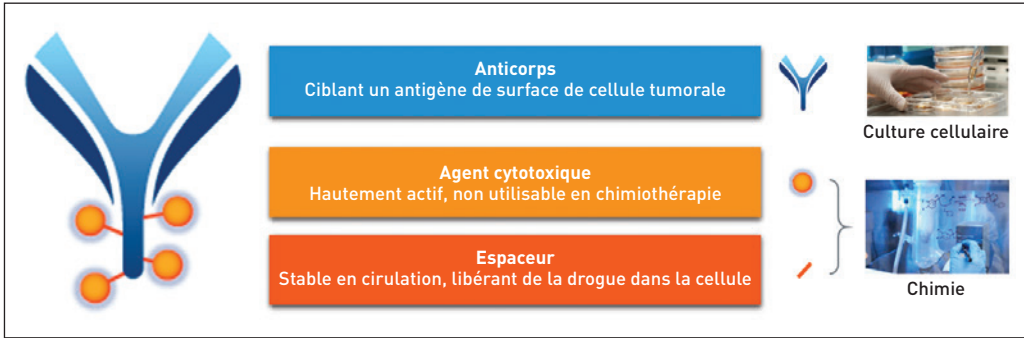
ainsi d'utiliser ce type d'agent cytotoxique en clinique.

Un paramètre important pour ces immunoconjugués est le nombre de molécules cytotoxiques que l'on conjugue par anticorps et qui définit ce qu'on appelle le DAR, « *drug-to-antibody ratio* ».

Les immunoconjugués sont des molécules complexes. Les anticorps sont produits par culture cellulaire. L'agent cytotoxique et l'agent de liaison, puis le produit d'assemblage entre l'espaceur et l'agent cytotoxique, sont produits par la chimie organique de synthèse. Il s'agit ensuite de conjuguer cette entité chimique sur l'anticorps. L'immunoconjugué est donc obtenu par mariage de la petite molécule chimique avec la grosse molécule biologique.

1.2. Mode d'action d'un immunoconjugué

Ce type de molécule, administré par injection intraveineuse,



circule dans le sang. À l'approche de la tumeur, l'ADC reconnaît l'antigène de surface de la tumeur qu'il cible. Il se fixe à l'antigène pour former un complexe immunoconjugué-antigène, qui peut alors être internalisé par la cellule, c'est-à-dire qu'il pénètre dans la cellule par un mécanisme d'endocytose⁴, et forme une vésicule⁵. Cette vésicule subit ensuite différents processus intracellulaires, entre autres l'acidification, la fusion avec des vésicules contenant des enzymes protéolytiques⁶, la dernière étape étant la formation du lysosome⁷, où l'anticorps est dégradé et la molécule active libérée soit par la dégradation de l'anticorps, soit parce que l'agent de liaison est clivable. Dans tous les cas, la molécule cytotoxique libérée peut alors atteindre sa cible dans la cellule cancéreuse, que ce soit la

4. Endocytose : mécanisme qui permet à des molécules de pénétrer dans certains types de cellules.

5. Vésicule : cavité, petit sac membraneux.

6. Enzyme protéolytique : enzyme brisant les liaisons des protéines.

7. Lysosome : organelle cellulaire contenant des enzymes qui dégradent la plupart des molécules biologiques.

tubuline⁸ (dans l'exemple de la **Figure 3**) ou l'ADN. Une fois

8. Tubuline : protéine structurale des microtubules, un constituant majeur du cytosquelette. Celui-ci est le squelette filamentueux (ensemble de polymères) formé dans le cytoplasme, qui est la partie située entre le noyau et la membrane de la cellule, dont le rôle est de contrôler la forme des cellules.

Figure 2

L'immunoconjugué est l'association d'un anticorps et d'un cytotoxique par le biais d'un agent de liaison (« espaceur »).

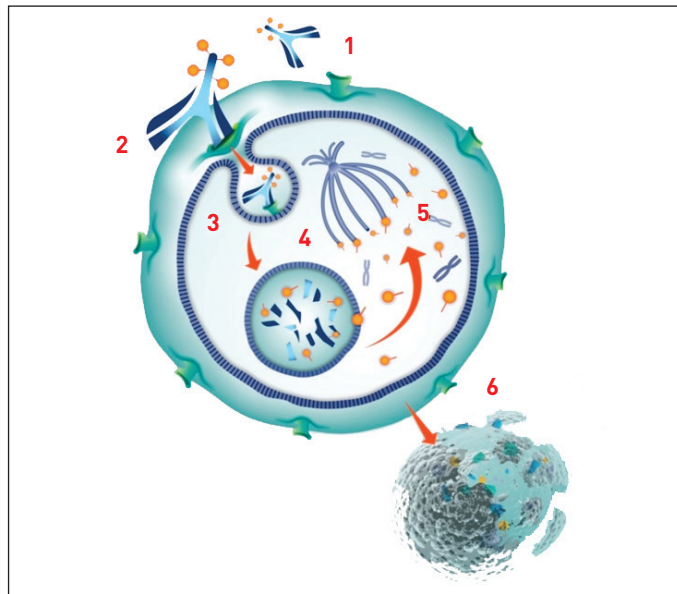


Figure 3

Les étapes du fonctionnement de l'immunoconjugué : 1) fixation sur l'antigène de surface ; 2) et 3) endocytose ; 4) dégradation à l'intérieur du lysosome formé ; 5) rupture de l'agent de liaison et libération de la molécule cytotoxique qui cible la tubuline ; 6) mort de la cellule cancéreuse.

la cible atteinte, la molécule exerce son activité pharmacologique et induit la mort de la cellule tumorale.

Le but de cette approche « immunoconjugués » est d'améliorer la fenêtre thérapeutique de la chimiothérapie (Figure 4). La chimiothérapie présente une fenêtre thérapeutique étroite définie par le ratio entre la dose maximale tolérée et la dose minimale active, et, le plus souvent, ces deux doses sont très proches. L'approche « immunoconjugués » permet non seulement d'augmenter la dose maximale tolérée en diminuant la toxicité *via* le ciblage de la tumeur par l'anticorps, mais aussi d'augmenter l'efficacité par une distribution optimale de molécules cytotoxiques très actives dans la tumeur.

2 Optimisation d'un immunoconjugué cytotoxique

Pour optimiser l'efficacité d'un immunoconjugué, on peut agir sur les trois de ses composantes, mais également sur l'antigène tumoral (Figure 5). L'optimisation de ce type de composé est complexe.

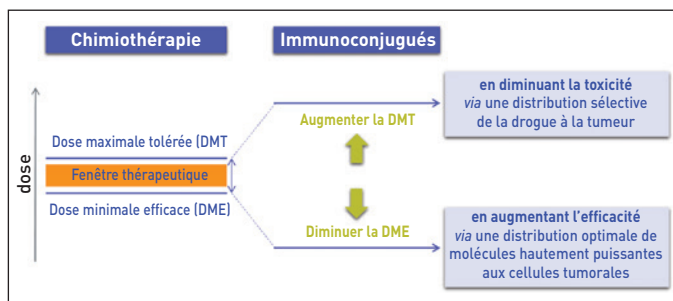
L'antigène tumoral, protéine de surface de la cellule tumorale que va reconnaître

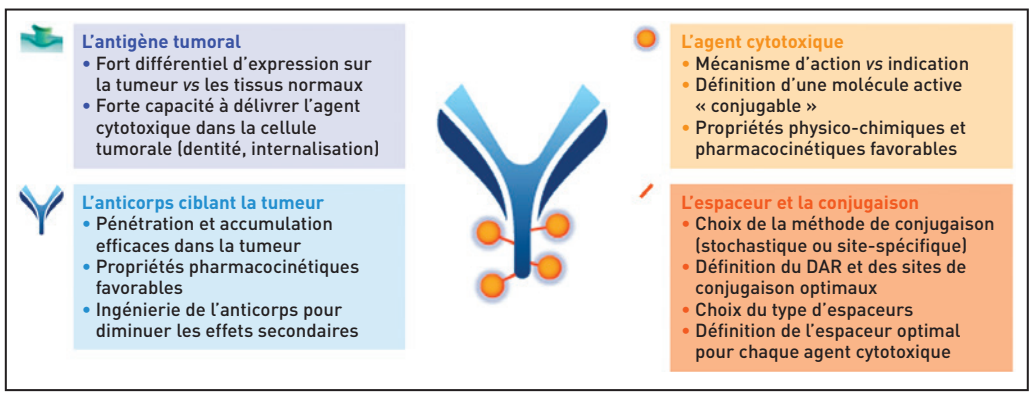
l'anticorps, doit être le plus fortement exprimé possible sur la tumeur avec une expression moindre dans les tissus normaux. Idéalement, on aimerait avoir un anticorps qui soit spécifique de la tumeur, mais ce type d'antigène est rarissime, en particulier dans le cas du cancer, et on a plutôt un antigène qui est surexprimé sur la tumeur par rapport aux tissus normaux ; il faut donc chercher un antigène qui ait le différentiel le plus important possible. L'antigène doit aussi avoir la capacité d'internaliser de façon efficace le cytotoxique à l'intérieur de la cellule cancéreuse.

L'anticorps est responsable de la distribution de la molécule à la tumeur, donc de la pénétration et de l'accumulation du cytotoxique dans la tumeur. Du fait de la taille de ce type de molécule, l'anticorps influence la pharmacocinétique de la molécule, c'est-à-dire, entre autres, sa durée de vie et sa distribution dans l'organisme. Par ailleurs, il est possible, grâce aux progrès importants réalisés ces dernières années en ingénierie des protéines, de modifier de façon spécifique cet anticorps pour conférer à l'immunoconjugué des propriétés telles que ses effets secondaires soient diminués.

Figure 4

L'utilisation d'immunoconjugués permet de diminuer la toxicité tout en augmentant l'efficacité du traitement.





Les propriétés des anticorps relevant davantage du domaine de la biologie et de la biotechnologie, focalisons-nous sur l'optimisation chimique du système, c'est-à-dire sur l'agent cytotoxique, sur l'agent de liaison et sur la conjugaison des molécules. L'objectif de cette optimisation multiparamétrique est de maximiser l'index thérapeutique de ce type de composé.

2.1. Les types d'agents cytotoxiques et les paramètres d'optimisation

Cette approche nécessite l'utilisation de molécules cytotoxiques très puissantes. Au début du développement des immunoconjugués, ont été conjuguées des molécules de chimiothérapie classique, qui en fait n'étaient pas suffisamment puissantes pour avoir

une efficacité clinique. On utilise maintenant des molécules actives à des concentrations de l'ordre du picomolaire (10^{-12} moles par litre), soit mille fois plus actives que le Taxotère®.

La connaissance du mécanisme d'action de la molécule est très importante pour optimiser l'efficacité (Figure 6). Comme pour une petite molécule cytotoxique classique, il faut optimiser les propriétés physico-chimiques, à savoir les propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisation⁹ et d'excrétion. La molécule doit pouvoir être conjuguée avec l'anticorps, donc il faut pouvoir introduire,

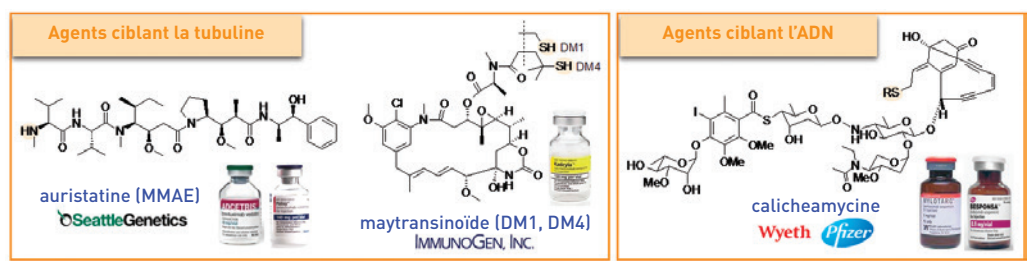
9. Métabolisation : transformation biochimique dans le cadre du métabolisme, c'est-à-dire processus de dégradation et de synthèse organique chez l'être vivant.

Figure 5

Les paramètres d'optimisation des immunoconjugués.

Figure 6

Exemples d'agents cytotoxiques composant des immunoconjugués sur le marché.



à un endroit sur la molécule, un agent de liaison (espaceur) qui permettra ensuite de libérer la molécule active dans la cellule.

Enfin, il faut que la synthèse chimique de tout cet ensemble soit relativement aisée. Les composés qui sont utilisés sont dans une très grande majorité, voire quasiment à 100 %, des molécules dérivées de produits naturels (voir le *Chapitre de J. Cossy* dans *Chimie et nouvelles thérapies*).

Pour les cinq produits sur le marché en novembre 2019, les agents cytotoxiques se divisent en deux grands mécanismes d'action (*Figure 6*) :

- les agents qui ciblent la tubuline : la tubuline est l'un des constituants du cytosquelette de la cellule qui intervient au moment de la division cellulaire et sur laquelle les chromosomes vont aller se positionner pour être répartis entre les deux cellules filles ;
- les agents qui ciblent l'ADN, composant vital pour toute cellule.

On trouve, dans la famille des agents ciblant la tubuline,

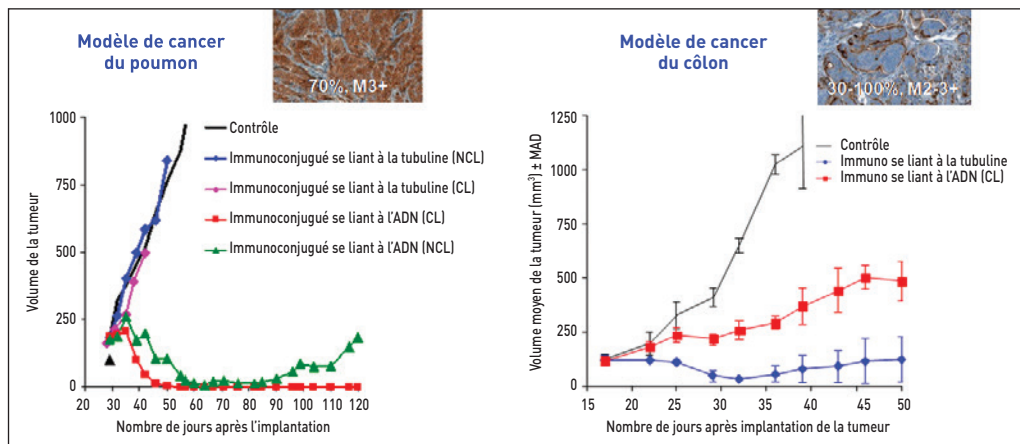
l'auristatine (MMAE) et les maytansinoïdes (DM1, DM4), dérivés du maytansinol. Comme agent ciblant l'ADN, citons la calichéamicine. De nombreux autres cytotoxiques ont été développés, qui ciblent la tubuline ou l'ADN, ou présentent d'autres mécanismes d'action.

Chez Sanofi, nous avons commencé à travailler dans le domaine des ADC en collaboration avec ImmunoGen, Inc., et nous avons démarré la phase clinique 3 d'un ADC au premier trimestre 2020, avec le DM4. Nous avons également développé, en interne, nos propres cytotoxiques, un agent ciblant la tubuline et un agent ciblant l'ADN que nous utilisons désormais dans nos projets de recherche.

Selon le type de cancer, l'efficacité de l'ADC dépend du mécanisme d'action de l'agent cytotoxique qui le compose. Sur la *Figure 7* sont représentées des données d'efficacité préclinique observées chez la souris dans un modèle du cancer du poumon et dans un modèle du cancer du côlon. Dans les deux cas, ont été

Figure 7

Données d'efficacité de deux immunoconjugués dans deux modèles de cancers différents.



testés des ADC composés du même anticorps conjugué soit à un agent ciblant la tubuline, soit à un agent ciblant l'ADN. On voit que dans le cas du cancer du poumon, seuls les immunoconjugés avec un agent ciblant l'ADN sont actifs. Dans le cadre du cancer du côlon, c'est l'ADC avec un agent ciblant la tubuline qui se révèle être le plus puissant. Il a été montré, dans le **Chapitre de J.-P. Armand** (dans *Chimie et nouvelles thérapies*), qu'en fonction de leur mécanisme d'action, les agents de chimiothérapie ne sont pas actifs de la même façon dans toutes les indications, et c'est vrai aussi dans le cas des immunoconjugés.

2.2. Optimisation de l'agent de liaison

La nature de l'agent de liaison va définir la structure de la molécule active qui sera libérée dans la cellule. La **Figure 8** montre l'exemple de la monométhylauristatine E (MMAE). Il s'agit d'un agent antiméiotique qui inhibe la division cellulaire en bloquant la polymérisation de la tubuline. L'agent de liaison à l'anticorps monoclonal est dans ce cas peptidique. Il est stable en circulation mais clivé après internalisation

dans les cellules par une enzyme présente dans les lysosomes, la cathepsine (qui reconnaît le motif entouré en bleu sur la **Figure 8**). Comme décrit sur la **Figure 9**, après clivage par l'enzyme, l'espaceur *para*-aminobenzylcarbamate (entouré en vert sur la **Figure 8**) subit une élimination intramoléculaire pour relarguer la monométhylauristatine E (MMAE, entourée en rouge sur la **Figure 8**).

Deux autres types d'agents de liaison clivables sont également utilisés, que l'on retrouve par exemple dans les immunoconjugés avec la calichémicine, antibiotique antitumoral qui a été testé sur les hémopathies myéloïdes :

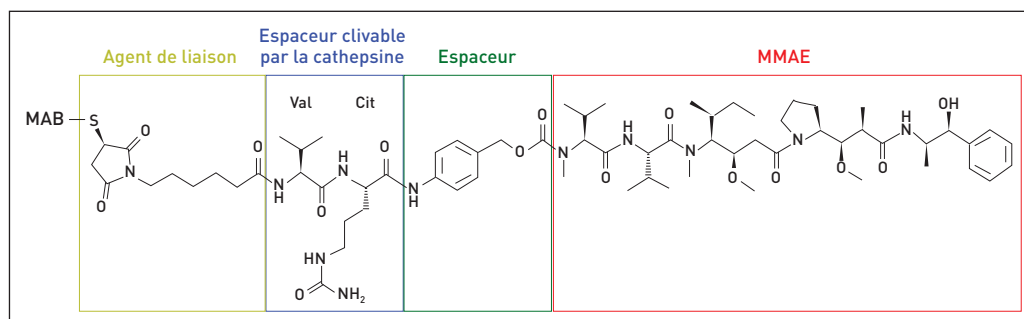
- le premier motif clivable est du type hydrazide¹⁰, sensible au pH. Cette sensibilité va permettre le clivage dans l'endosome¹¹, c'est-à-dire la

10. Fonction hydrazide : une liaison simple azote-azote (hydrazine) avec quatre substituants, l'un d'eux étant un groupe acyle -COR.

11. Endosomes : sous-compartiments de la cellule, ou organites (organelles), sur lesquels les vésicules d'endocytose s'accrochent et fusionnent pour relarguer leur contenu (les molécules qui étaient à la surface de la cellule et qui ont été internalisées à l'intérieur d'une vésicule d'endocytose).

Figure 8

Structure d'un immunoconjugé anticorps (MAB)-MMAE. La partie de l'agent de liaison composé des acides aminés valine (Val) et citrulline (Cit) est clivée par la cathepsine à l'intérieur des cellules tumorales.



première petite vésicule formée après l'internalisation de la molécule dans la cellule ;

- le deuxième motif clivable est une liaison disulfure¹², qui va être réduite dans le cytoplasme de la cellule pour y libérer le dérivé de calichéamicine, qui agit ensuite sur l'ADN.

Sont également utilisés des agents de liaison non clivables du fait de leur nature chimique, comme par exemple dans les immunoconjugués avec le maytansinoïde DM1. Il n'y a pas de motif entre l'anticorps et la molécule cytotoxique qui puisse être clivé, que ce soit par une enzyme ou par des conditions physiologiques. En revanche, dans le lysosome, la partie anticorps va être dégradée par les protéases et va finir par libérer l'ensemble agent cytotoxique, espaceur et acide aminé sur lequel l'agent cytotoxique a été conjugué (**Figure 9**). Dans ce cadre, il se forme un métabolite avec un

acide aminé, donc zwitterionique¹³. Ce type de molécule passe difficilement les membranes et il lui est difficile par exemple de sortir de la cellule dans laquelle il a été internalisé pour être actif sur les cellules voisines, contrairement au dérivé MMAE beaucoup plus polaire, qui, lui, sera capable de sortir de la cellule pour entrer dans une cellule voisine et exercer son activité toxique à distance.

Le type d'agent de liaison et le mécanisme de dégradation peuvent se traduire par une différence d'efficacité *in vivo* des conjugués. La **Figure 10** présente des données obtenues à partir d'immunoconjugués réalisés avec le même anticorps, le même cytotoxique, ils ne diffèrent que par la nature de l'agent de liaison.

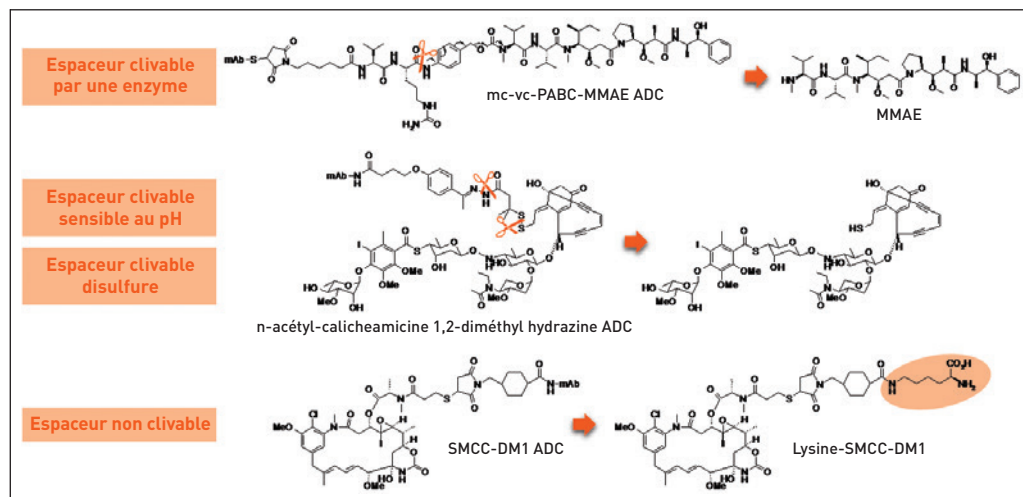
Un agent de liaison non clivable, que ce soit à la dose de 0,3 mg/kg ou de 0,6 mg/kg, n'est pas efficace, seul un

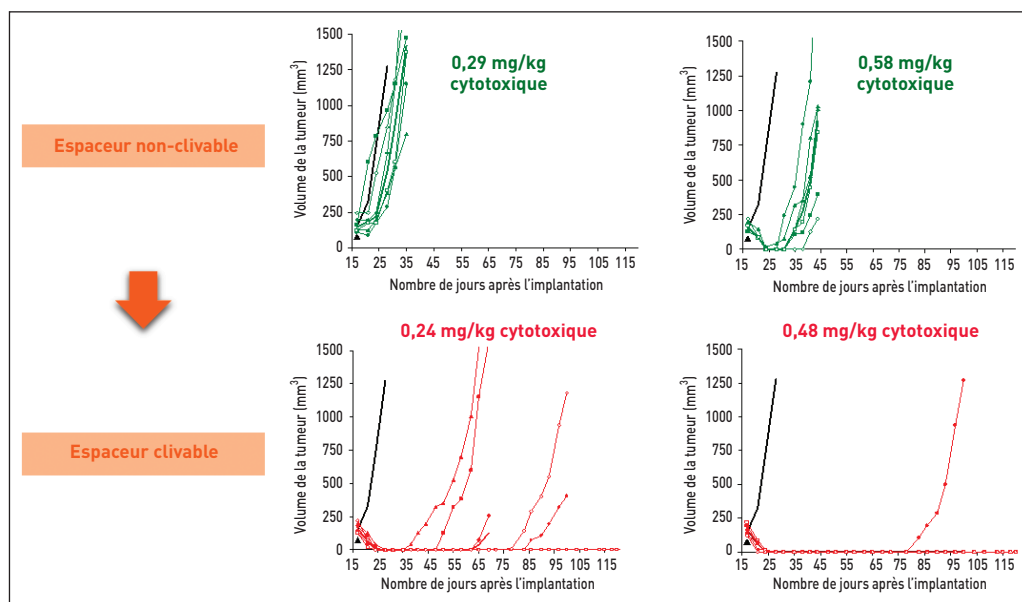
Figure 9

Les différents types d'agents de liaison et leur mode de clivage pour libérer la molécule cytotoxique.

12. Liaison disulfure : liaison simple entre deux atomes de soufre, -S-S-.

13. Zwitterionique : ion qui comporte une charge positive et une charge négative.




Figure 10

La nature de l'agent de liaison joue un rôle critique sur l'efficacité cytotoxique *in vivo* des immunoconjugués.

léger retard de croissance des cellules cancéreuses est observé à la plus forte dose.

Quand l'agent de liaison non clivable est remplacé pour un agent de liaison clivable, les deux doses induisent des régressions importantes de la tumeur, encore plus flagrantes avec la dose la plus forte. La nature chimique de l'agent de liaison joue donc un rôle critique dans l'activité *in vivo* des molécules.

2.3. Les méthodes de conjugaison

Les méthodes historiques et conventionnelles consistent à conjuguer les cytotoxiques sur les acides aminés présents à l'état naturel sur les anticorps. Ces acides aminés naturels sont de deux types :

- les lysines, qui portent une amine primaire sur leur chaîne latérale (Figure 11), sont nombreuses et accessibles à la

surface d'un anticorps (étoiles rouges de la Figure 11), donc on peut aisément les conjuguer.

- les cystéines, qui proviennent de ponts disulfure (-S-S-) formés entre les différentes chaînes de l'anticorps, peuvent être réduites pour générer une fonction thiol (-SH), que l'on peut utiliser pour la conjugaison.

Dans les deux cas, l'immunoconjugué est un mélange d'espèces, et le nombre de molécules cytotoxiques greffées par anticorps, ou DAR, (« drug-to-antibody ratio », drugs/Ab de la Figure 10), est une moyenne. Dans le cas des lysines, pour un DAR moyen de 4, on observe une répartition gaussienne avec des DAR allant de 0 à 9. Dans le cas des cystéines provenant des ponts disulfure naturels, l'hétérogénéité du mélange est plus faible dans la mesure où il n'y a que quatre ponts disulfure qui peuvent être réduits.

Depuis quelques années, avec le développement de l'ingénierie des protéines, on a évolué vers des conjugaisons sur des sites spécifiques. Sur le bas de la **Figure 11**, est représentée

une conjugaison avec un DAR de 2 quasiment exclusif qui permet d'avoir un produit homogène, une caractérisation analytique facilitée, et aussi de pouvoir moduler plus aisément

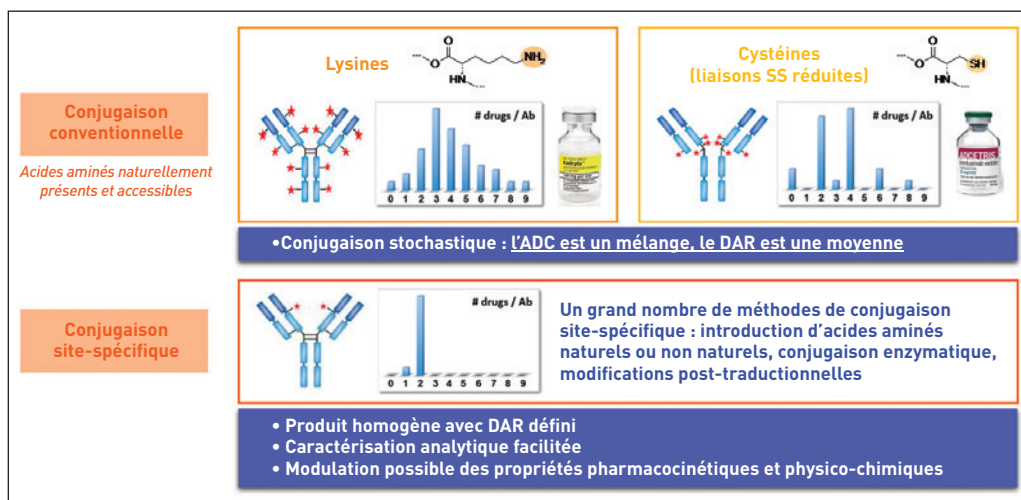


Figure 11

Méthodes de conjugaison et influence du site de conjugaison sur la stabilité et l'efficacité de l'immunoconjugé.

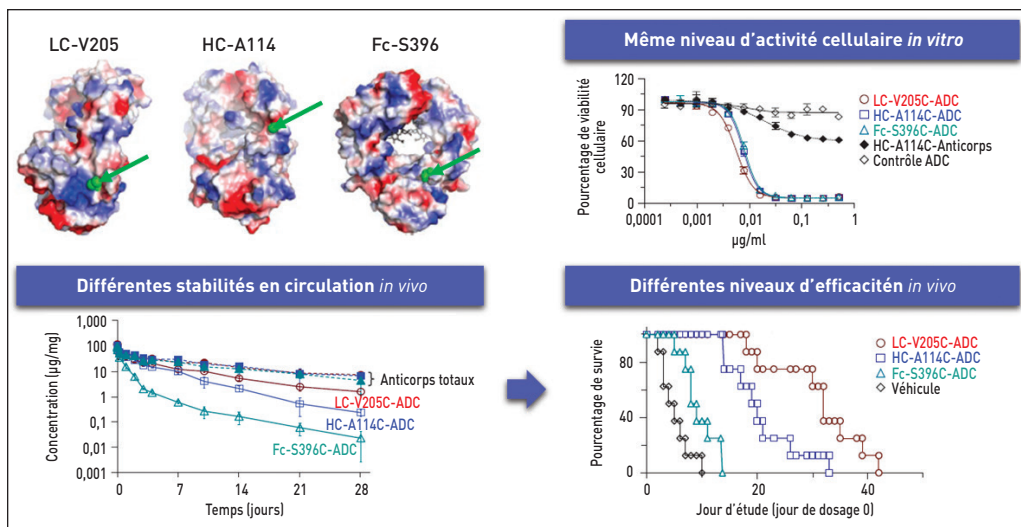


Figure 12

Le site de conjugaison a une influence importante sur la stabilité et l'efficacité de l'immunoconjugé.

Source : Shen B.-Q. et coll. (2012). *Nat Biotechnology*, 30 :184.

les propriétés pharmacocinétiques et physico-chimiques de la molécule.

Non seulement le type de conjugaison est important, mais aussi la position où cette conjugaison est réalisée. Sur la **Figure 12** sont comparés trois ADC avec trois sites de conjugaison spécifiques différents indiqués en vert, toutes choses égales par ailleurs (anticorps, agent

cytotoxique, agent de liaison, chimie de conjugaison et DAR). *In vitro*, sur un modèle cellulaire, on ne voit pas de différence en termes d'activité entre les trois molécules. La différence est observée quand on passe *in vivo* à la fois en termes de stabilité en circulation et en termes d'efficacité : la molécule la plus stable (en rouge) s'avère être la molécule la plus efficace.

L'avenir des immunoconjugués cytotoxiques

Les immunoconjugués cytotoxiques sont aujourd'hui une réalité thérapeutique pour les patients atteints de certains cancers. La fenêtre thérapeutique est clairement le paramètre clé à optimiser et maximiser pour atteindre le succès en clinique, c'est-à-dire atteindre l'efficacité avant la toxicité. Ces molécules complexes résultent d'une combinaison unique entre biotechnologie et chimie. Leur optimisation est multiparamétrique au niveau de leurs différents composants : l'anticorps, l'agent cytotoxique, l'agent de liaison et la conjugaison. Le développement de ces nouveaux médicaments demande un travail d'équipe pluridisciplinaire.