

# Développement d'un immunokonjugué cytotoxique ciblant le récepteur de l'IGF-1

Jean-François Haeuw travaille au Centre d'immunologie<sup>1</sup> des Laboratoires Pierre Fabre situé à proximité de la frontière suisse.

La **Figure 1** représente le site de Saint-Julien-en-Genevois des Laboratoires Pierre Fabre, situé dans la vallée genevoise.

## 1 Présentation du récepteur du facteur de croissance IGF-1

### 1.1. Un récepteur membranaire

Le récepteur de l'IGF-1 est un récepteur du facteur de croissance IGF-1, ou « *Insulin-like*

*Growth Factor 1* » ; on parle aussi de l'IGF-1 récepteur, IGF-1R. Il appartient à la même famille que le récepteur de l'insuline<sup>2</sup> (**Figure 2**), avec lequel il partage une forte homologie (environ 60 %). Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires exprimées à la surface de certaines cellules des épithéliums glandulaires.

2. Insuline : hormone protéique sécrétée dans le pancréas et favorisant l'absorption du glucose (sucre) dans le sang vers les cellules du corps.

1. [www.cjpf.com](http://www.cjpf.com)

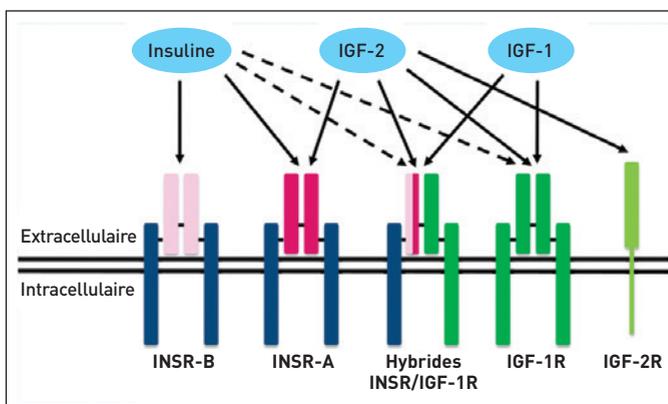


Figure 1

Site R&D du Centre d'Immunologie Pierre Fabre (CIPF) à Saint-Julien-en-Genevois. À droite, le bâtiment de recherche et développement, à gauche, l'unité de production pour les études cliniques.

Figure 2

La famille des récepteurs membranaires des facteurs de croissance : insuline, IGF-1 et IGF-2. Les récepteurs de l'insuline (INSR-A et B) et de l'IGF-1 (IGF-1R) sont des hétérotétramères, tandis que le récepteur de l'IGF-2 (IGF-2R) est un monomère. Les récepteurs hybrides sont constitués d'hétérodimères INSR/IGF-1R.



L'IGF-1R est un tétramère<sup>3</sup> formé de deux sous-unités alpha extracellulaires et deux sous-unités bêta, qui sont en

partie intracellulaires et possèdent un domaine tyrosine kinase<sup>4</sup>. Il peut fixer les ligands

3. Tétramère : polymère composé de quatre sous-unités d'oligomères (petits polymères).

4. Tyrosine kinase : enzyme agissant comme « interrupteur » d'activation/désactivation de nombreuses fonctions cellulaires.

IGF-1 et IGF-2, mais l'affinité de l'IGF-1 est quinze à vingt fois plus forte que celle de l'IGF-2.

### 1.2. Un acteur de la croissance cellulaire

L'IGF-1R est généralement considéré comme un récepteur contrôlant la croissance cellulaire, alors que l'IR est plutôt considéré comme un récepteur contrôlant le métabolisme énergétique. La liaison de l'IGF-1 à son récepteur induit à l'intérieur de la cellule une cascade de signalisations conduisant à la croissance, à la différenciation cellulaire et finalement à la survie cellulaire (Figure 3). La fixation du ligand provoque l'auto-phosphorylation du domaine tyrosine kinase sur certains résidus tyrosine, ce qui stimule l'activité tyrosine kinase envers certains substrats ou adaptateurs protéiques (Shc et IRS). La transduction du signal active ensuite les voies

intracellulaires des MAP-kinases (MEK, ERK) et de la PI3-kinase (AKT, mTOR). Ces mécanismes sont utiles pour la croissance des cellules normales, mais particulièrement appréciés des cellules tumorales pour leur permettre notamment de se multiplier au sein de la tumeur. Chez l'homme, l'IGF-1R est essentiel pour le développement de l'embryon et possède aussi d'importantes fonctions chez l'adulte.

Au niveau de la tumeur, l'IGF-1R est impliqué dans les phénomènes de tumorigenèse<sup>5</sup>, d'angiogenèse<sup>6</sup> et de métastase<sup>7</sup> ; il joue aussi un rôle

5. Tumorigenèse : étapes de formation de tumeurs.

6. Angiogenèse : processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux déjà existants.

7. Métastase : expansion de la tumeur cancéreuse dans une autre partie du corps par migration de cellules tumorales par voie sanguine.

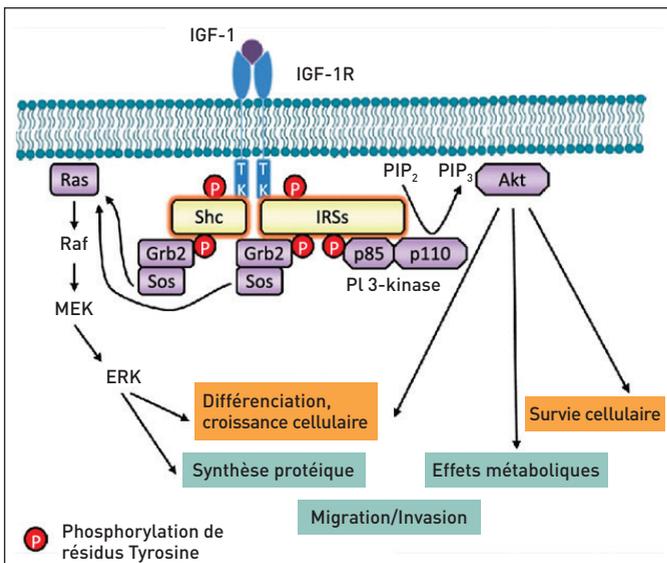


Figure 3

Schéma des mécanismes intracellulaires impliquant l'IGF-1 et l'IGF-1R.

contre l'apoptose<sup>8</sup> dans les cellules tumorales.

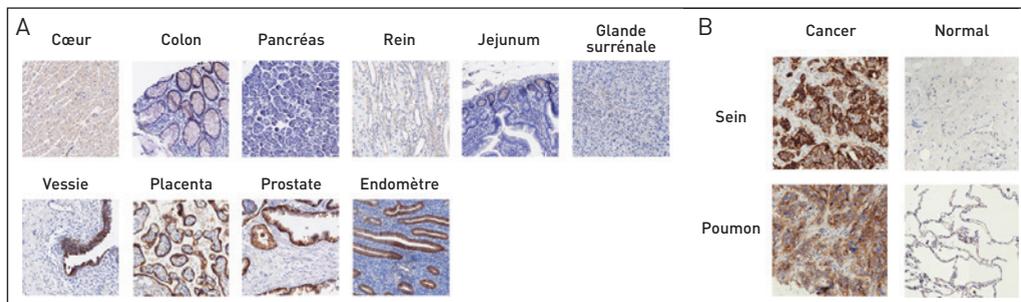
### 1.3. Pourquoi cibler l'IGF-1R ?

Quatre raisons ont motivé l'équipe du CIPF à cibler ce récepteur et à développer une approche de type immunoconjugué cytotoxique :

- l'IGF-1R est associé à la tumorigenèse, à la métastase et à la résistance à certains traitements anticancéreux ;
- une expression différentielle de ce récepteur, entre les tissus normaux et les tissus tumoraux, est observée dans de nombreux types de cancers, incluant des cancers majeurs comme le cancer du poumon et le cancer du sein ;
- de nombreuses études cliniques réalisées dans le domaine de l'oncologie ont montré l'innocuité de certains anticorps nus, non armés, dirigés contre cette cible chez l'homme et dont les essais ont pour la plupart été arrêtés, principalement pour manque d'efficacité ;
- et enfin, l'IGF-1R est aussi internalisé après liaison du ligand et de certains anticorps.

Figure 4

Expression de l'IGF-1R sur des coupes de tissus normaux (A) et tumoraux (B). Photographies microscopiques obtenues après marquage de coupes tissulaires avec un anticorps anti-IGF-1R.



Un immunoconjugué cytotoxique (« *antibody drug conjugate* », ADC, en anglais) est une molécule complexe qui résulte de la conjugaison entre un anticorps et un agent cytotoxique par le biais d'un linker (espaceur) (voir aussi le [Chapitre de M.-P. Brun](#) dans cet ouvrage *Chimie et nouvelles thérapies*, EDP Sciences, 2020).

### 1.4. Expression de l'IGF-1R

Un différentiel d'expression de l'IGF-1R entre les tissus normaux et les tissus tumoraux a été démontré par immunohistochimie<sup>9</sup>. La [Figure 4](#) compare les photographies obtenues à partir de tissus normaux ([Figure 4A](#)) et tumoraux ([Figure 4B](#)). L'expression de ce récepteur est majoritairement intracytoplasmique<sup>10</sup> dans la majorité des organes vitaux humains, ce qui limitera le ciblage de ces tissus par un anticorps. Une expression membranaire de l'IGF-1R à la surface des cellules,

9. Immunohistochimie : méthode de localisation de protéines dans les cellules d'un échantillon de tissu par l'utilisation d'anticorps.

10. Intracytoplasmique : à l'intérieur du cytoplasme de la cellule.

8. Apoptose : mécanisme de déclenchement d'autodestruction des cellules.

notamment épithéliales<sup>11</sup>, est observée dans la vessie, le placenta, la prostate et l'endomètre. Pour ces tissus, l'expression est modérée à forte.

La **Figure 4B** permet d'observer la forte expression de l'IGF-1R sur des échantillons prélevés dans la tumeur (cancer du sein et du poumon), en comparaison avec des échantillons normaux adjacents prélevés chez les mêmes patients juste à côté de la tumeur.

## 2 Des immunoconjugués pour cibler l'IGF-1R

### 2.1. État de l'art

Plusieurs groupes pharmaceutiques, dont les Laboratoires Pierre Fabre en partenariat avec Merck & Co (**Figure 5**), ont développé des anticorps anti-IGF-1R non armés mais, par manque d'efficacité, le développement de ces anticorps en oncologie a été stoppé entre la phase clinique 1 et la

11. Cellules endothéliales : cellules « épineuses » étant liées entre elles et permettant de créer une couche protectrice continue.

phase clinique<sup>12</sup> 3. L'anticorps Ganitumab de la société Amgen est actuellement en phase 3 pour différents types de sarcomes.

Le seul immunoconjugué cytotoxique en cours d'évaluation clinique est développé par les Laboratoires Pierre Fabre. Il est actuellement en phase clinique 1.

### 2.2. Mécanisme d'action de l'immunoconjugué cytotoxique

Après fixation sur l'IGF-1R, l'ADC est internalisé dans des vésicules mantelées<sup>13</sup>, qui fusionnent ensuite avec les lysosomes<sup>14</sup>. À l'intérieur des lysosomes, l'anticorps et l'antigène sont dégradés. Enfin, la libération du médicament dans

12. Phase clinique : phase de test d'un médicament ou d'un traitement pour évaluer son efficacité et la tolérance de l'homme vis-à-vis de celui-ci.

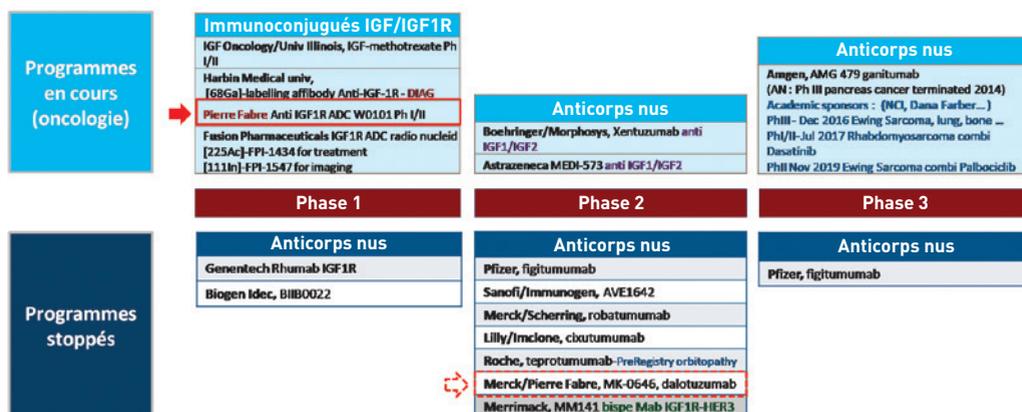
13. Vésicule mantelée : structure dans le cytoplasme pouvant stocker, transporter ou encore digérer des déchets cellulaires.

14. Lysosome : organe cellulaire présent dans le cytoplasme des cellules, responsable de la digestion intracellulaire.

**Figure 5**

Programmes ciblant l'IGF-1R et ses ligands stoppés et en cours de développement clinique en oncologie.

Mab = « monoclonal antibody » : anticorps monoclonal.



le cytoplasme aboutit à la mort de la cellule (**Figure 6**).

### 2.3. Génération et sélection de l'anticorps pour l'immunoconjugué

L'anticorps anti-IGF-1R sélectionné pour synthétiser l'ADC a été généré chez la souris par la technique dite des hybridomes<sup>15</sup>. Trois étapes de criblage successives, basées sur différents tests *in vitro* et *in silico*, ont permis de sélectionner l'anticorps 208F2 (**Figure 7A**) :

- criblage primaire : test *in vitro* de liaison sur cellules tumorales (lignée humaine de cancer du sein MCF-7) et d'internalisation : sélection de 20 anticorps ;
- criblage secondaire : mesures d'affinité pour la cible ; tests de réactivité croisée avec l'IGF-1R de macaque et de liaison à l'IR : sélection de 5 anticorps ;

- criblage tertiaire : cartographie épitopique, effets sur la prolifération cellulaire et la phosphorylation du récepteur, études *in silico* de développabilité et d'humanisabilité : sélection de l'anticorps 208F2.

La mesure par cytométrie de flux<sup>16</sup> (**Figure 7B**) de la fixation de l'anticorps 208F2 sur des cellules tumorales (MCF-7) en fonction du temps montre qu'il disparaît de la surface des cellules assez rapidement, avec un temps de demi-vie<sup>17</sup> d'environ 11 minutes.

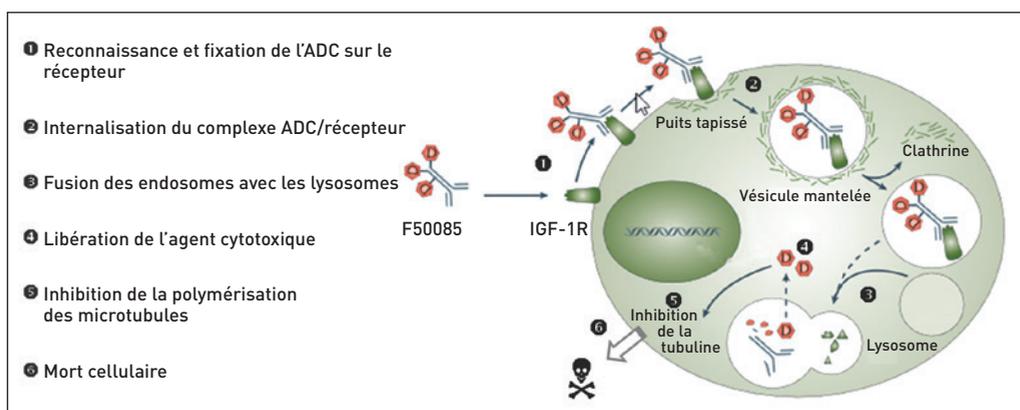
La cytométrie montre également que le 208F2 ne se fixe pas sur des cellules exprimant uniquement le récepteur de l'insuline, contrairement à un anticorps anti-insuline récepteur commercial (**Figure 7C**).

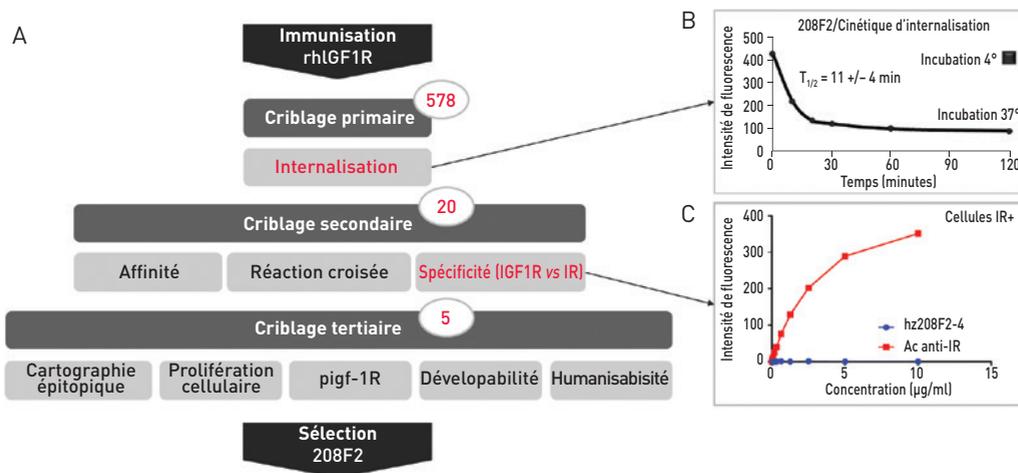
15. Hybridome : cellule provenant de l'hybridation entre des globules blancs (cellules lymphoïdes) et des cellules cancéreuses provenant de la moëlle osseuse (cellules myéломateuses).

16. Cytométrie de flux : technique de comptage et de mesure des propriétés des cellules (taille, morphologie, présence de marqueurs).  
17. Temps de demi-vie : temps pour lequel il ne reste que la moitié de la concentration initiale du composé.

**Figure 6**

Mécanisme d'action de l'ADC.





**Figure 7**  
Génération et sélection de l'anticorps anti-IGF-1R 208F2. A) Étapes de criblage des anticorps ; B) internalisation du complexe 208F2/récepteur dans les cellules tumorales MCF-7 en fonction du temps ; C) évaluation de la fixation du 208F2 sur des cellules exprimant uniquement l'IR.

**2.4. Synthèse et purification de l'ADC**

Une fois sélectionné, cet anticorps obtenu chez la souris a été « humanisé » (voir le **Chapitre de J.-P. Armand** dans cet ouvrage *Chimie et nouvelles thérapies*), pour aboutir à sa forme hz<sup>18</sup>. La **Figure 8** montre la structure de l'immunoconjugué cytotoxique hz208F2, sur lequel a été réalisée la conjugaison de l'agent cytotoxique (lien avec un espaceur). Plusieurs agents cytotoxiques dérivés de l'Auristatine, ciblant

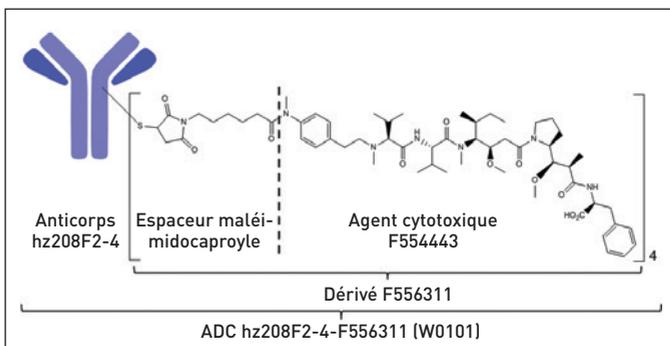
la polymérisation<sup>19</sup> de la tubuline<sup>20</sup>, ont été évalués afin de sélectionner le composé codé F556311, comportant l'agent cytotoxique F554443 et un espaceur de type maléimido-caproyle (**Figure 8**).

Ce composé est ensuite couplé sur les résidus cystéine inter-chaîne de l'anticorps

19. Polymérisation : formation d'un polymère (macromolécule) à partir d'un grand nombre d'une ou plusieurs unités de répétition appelées monomères.

20. Tubuline : protéine structurelle des microtubules, soit le constituant majeur du cytosquelette, la partie permettant à la cellule de se déplacer et de se nourrir.

18. Forme hz : forme humanisée d'un anticorps, c'est-à-dire utilisable en thérapie.



**Figure 8**  
Structure de l'immunoconjugué cytotoxique hz208F2-F556311.

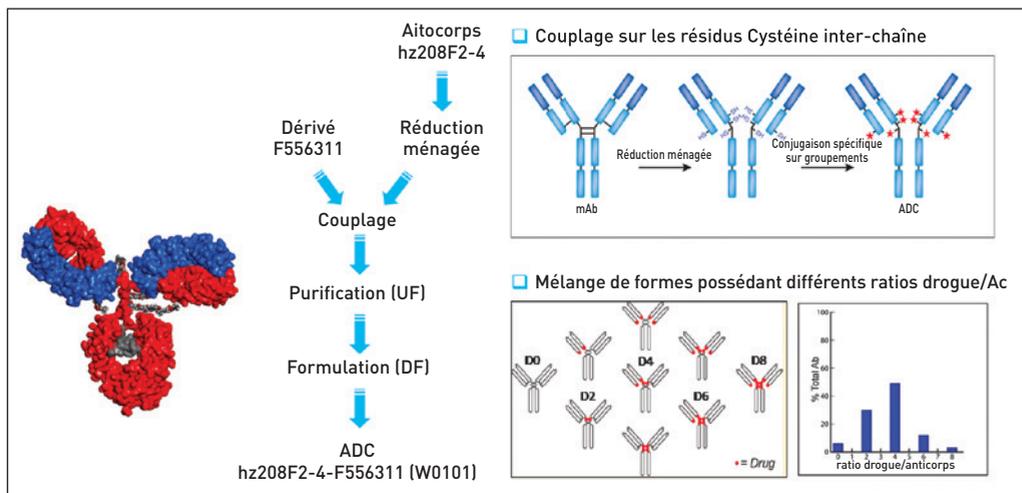


Figure 9

Synthèse, purification et formulation de l'ADC.

après réduction<sup>21</sup> ménagée (Figure 9). Le résultat de la synthèse est un mélange : on mesure un DAR<sup>22</sup> (« drug-to-antibody ratio ») de 4, mais il s'agit en fait d'un mélange d'entités comportant zéro à huit composés cytotoxiques (Figure 9, D0 à D8).

La Figure 9 décrit les différentes étapes du procédé de production de l'ADC. Après opérations de couplage, l'ADC est purifié par ultrafiltration tangentielle<sup>23</sup> afin d'éliminer le dérivé cytotoxique résiduel non couplé et formulé dans un tampon de conservation.

21. Réduction : réaction chimique où des ions ou des atomes d'une molécule gagnent des électrons.

22. DAR (« drug-to-antibody ratio ») : nombre de molécules cytotoxiques conjuguées à un anticorps.

23. Ultrafiltration tangentielle : ultrafiltration très fine avec une membrane laissant passer les molécules ayant une masse moléculaire inférieure à 30 kDa.

## 2.5. Analyse de l'ADC

Différentes méthodes physico-chimiques permettent d'analyser l'ADC W0101. À titre d'exemple, on peut citer les méthodes chromatographiques de tamisage moléculaire<sup>24</sup> et d'interaction hydrophobe utilisées pour déterminer respectivement le pourcentage de formes agrégées et le DAR. La Figure 10 présente les résultats d'analyse de lots d'ADC produits à différentes échelles, comprises entre 4 mg et 40 g, par chromatographie d'interaction hydrophobe. Les profils chromatographiques et les mesures du DAR moyen, comprises entre 3,7 et 4,3, confirment une très grande reproductibilité du procédé.

24. Tamisage moléculaire : technique de séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme.

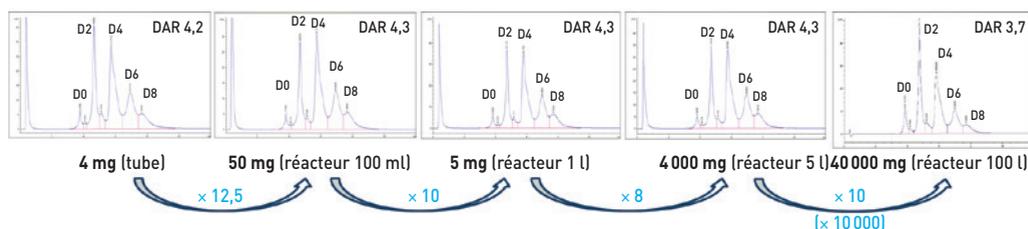


Figure 10

Analyse de lots d'ADC produits à différentes échelles par chromatographie d'interaction hydrophobe. Cette analyse permet de déterminer le DAR moyen pour chaque lot.

## 2.6. Le couplage ne modifie pas les propriétés fonctionnelles de l'anticorps

Des analyses de cytométrie de flux ont été réalisées afin de vérifier que le couplage ne modifiait pas les propriétés fonctionnelles de l'anticorps. Les **Figures 11** et **12** montrent une superposition des courbes de fixation et d'internalisation de l'anticorps non conjugué et de l'ADC, confirmant que les propriétés fonctionnelles de l'anticorps sont conservées après synthèse de l'ADC.

## 2.7. Analyse de l'activité de l'immunoconjugué sur des cellules

La cinétique d'internalisation de l'ADC a été étudiée par microscopie confocale<sup>25</sup> après incubation à 37 °C à différents temps, sur des cellules tumorales (MCF-7) exprimant assez fortement l'IGF-1 récepteur (**Figure 13**). Sur les clichés, on repère : le noyau cellulaire coloré en bleu, l'ADC en vert, un marqueur du lysosome (la protéine Lamp-1) en rouge et,

25. Microscopie confocale : technique de microscopie permettant d'obtenir une représentation tridimensionnelle d'un objet macromoléculaire (ici, cellules).

lorsqu'il y a colocalisation, une coloration jaune apparaît.

À t<sub>0</sub>, la localisation de l'ADC est essentiellement au niveau membranaire ; après 15 minutes d'incubation, une forte proportion de l'ADC se situe dans des vésicules à l'intérieur de la cellule, et celle-ci augmente encore après 30 et 60 minutes d'incubation. De plus, une colocalisation avec le marqueur des lysosomes est observée après 30 et 60 minutes d'incubation. Après 2 heures, l'ADC n'est plus détecté, celui-ci étant dégradé dans les lysosomes.

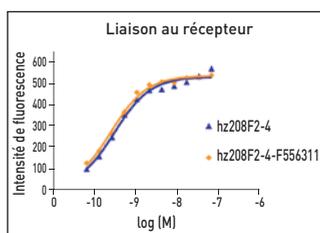


Figure 11

Comparaison de la fixation de l'anticorps non conjugué et de l'ADC sur des cellules tumorales exprimant l'IGF-1R. Des cellules MCF-7 sont incubées à 4 °C en présence de concentrations croissantes de l'anticorps et de l'ADC. La fixation est mesurée par cytométrie de flux.

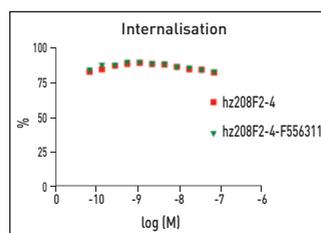


Figure 12

Comparaison de l'internalisation des anticorps seuls ou conjugués (ADC) par des cellules tumorales exprimant l'IGF-1R. Des cellules MCF-7 sont incubées à 37 °C en présence de concentrations croissantes de l'anticorps et de l'ADC. Le pourcentage d'internalisation est déterminé après analyse par cytométrie de flux.

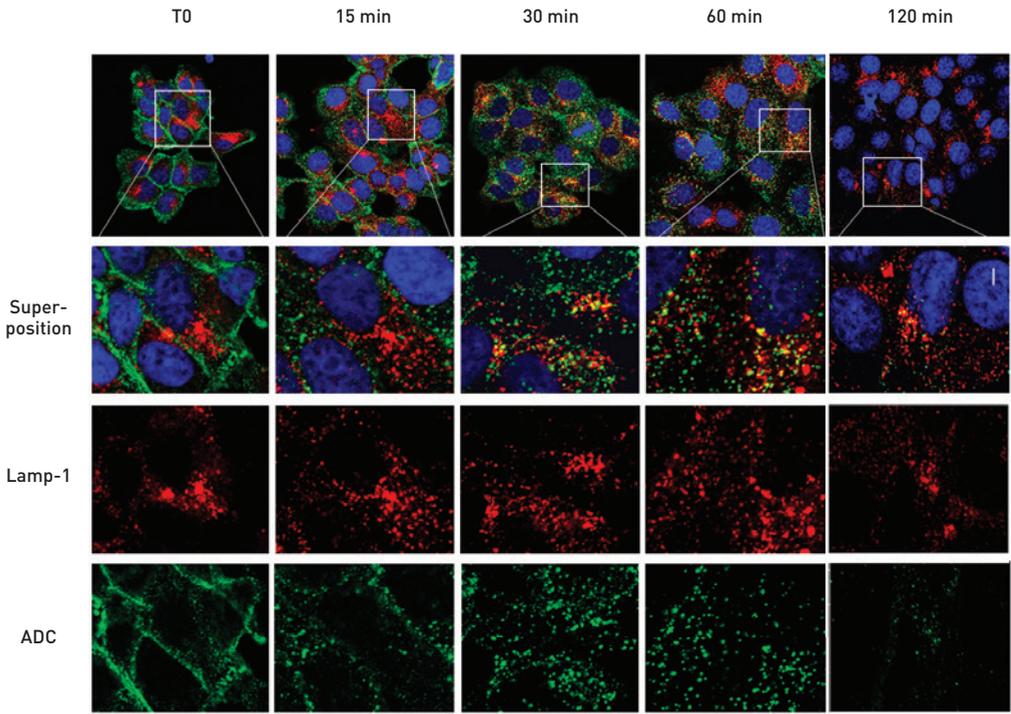


Figure 13

Mécanisme d'internalisation de l'ADC W0101 par les cellules tumorales.

### 3 Activité anti-tumorale de l'immunoconjugué

#### 3.1. Cytotoxicité *in vitro* sur cellules tumorales et normales

La cytotoxicité de l'immunoconjugué a été évaluée dans un premier temps sur une série de lignées tumorales d'origine humaine – en fait six types de cellules listés sur la [Figure 14](#), avec des niveaux d'expression d'IGF-1R faibles pour la lignée Hs746t, à forts pour les cellules MCF-7. La viabilité des cellules *in vitro* a été mesurée après incubation pendant 6 jours à 37 °C en présence de concentrations croissantes en ADC. L'ADC induit une très forte cytotoxicité sur les

lignées MCF-7 et NCI-H2122 exprimant fortement l'IGF-1R, avec une viabilité < 10 % aux concentrations d'ADC les plus élevées. Une faible cytotoxicité est par contre observée pour les lignées Hs746t et SBC5 exprimant très faiblement l'IGF-1R.

Ces résultats démontrent une étroite corrélation entre le niveau d'expression d'IGF-1R et la cytotoxicité induite par l'ADC.

Cette corrélation entre cytotoxicité et niveau d'expression a ensuite été démontrée sur des cellules humaines normales. En effet, la cytotoxicité observée sur les cellules normales, qui expriment plus faiblement l'IGF-1R, est beaucoup plus faible que celle

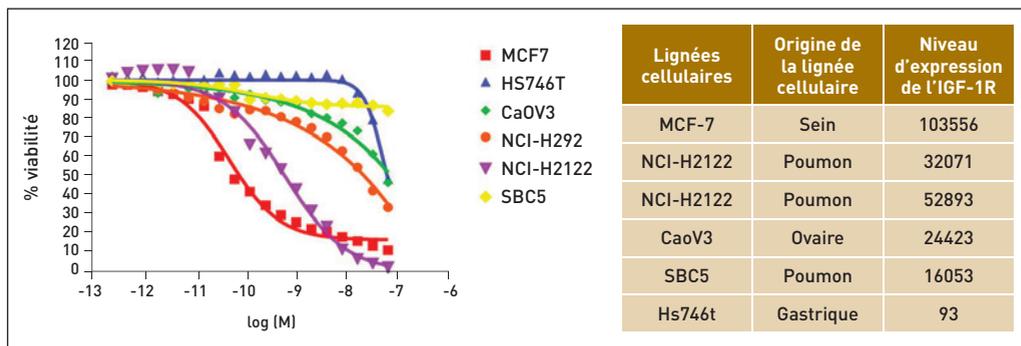


Figure 14

Cytotoxicité in vitro de l'ADC W0101 sur des cellules tumorales de différents organes humains.

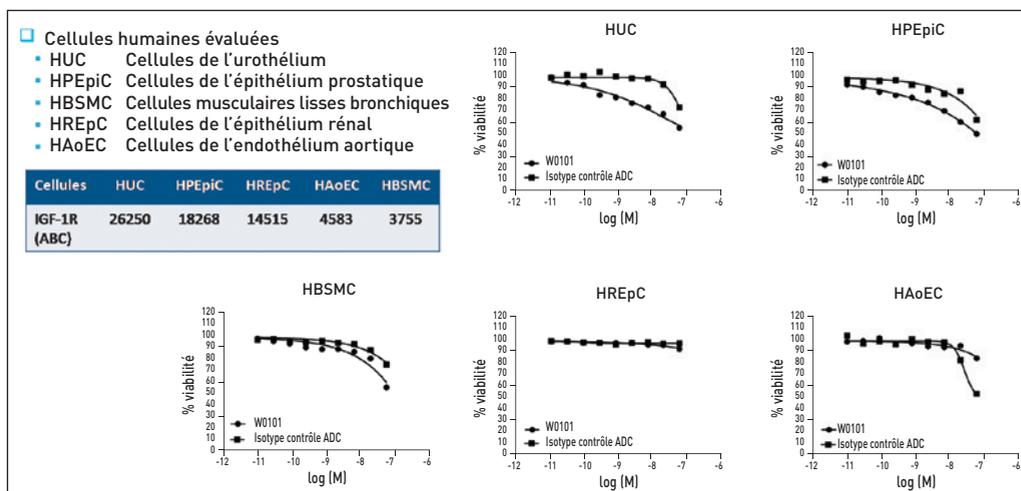


Figure 15

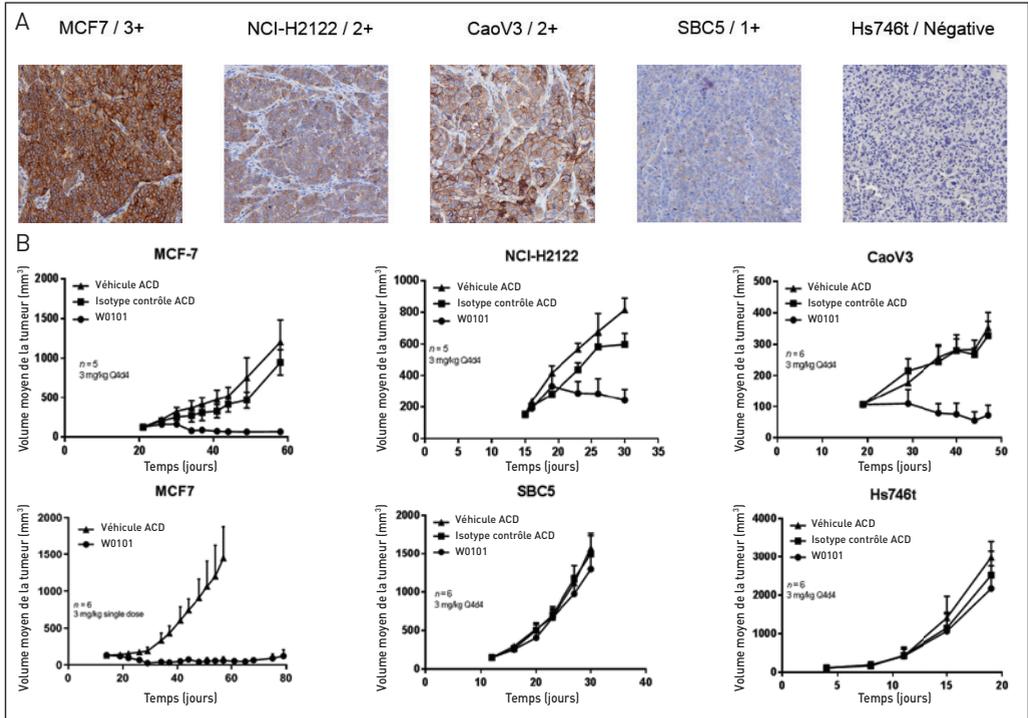
Cytotoxicité in vitro de l'ADC W0101 sur différentes cellules normales. L'effet de l'ADC W0101 est comparé à celui d'un ADC contrôle.

induite sur les cellules tumorales exprimant fortement l'IGF-1R (Figure 15).

### 3.2. Activité antitumorale in vivo

L'activité antitumorale de l'ADC a été évaluée dans des modèles de xénogreffe chez la souris (Figure 16). Une très forte activité, avec régression de la tumeur, est observée sur le modèle de cancer du sein

MCF-7 exprimant fortement l'IGF-1R (expression 3+). Cette activité est plus faible sur les modèles exprimant plus modestement la cible (2+) : régression tumorale partielle dans le modèle de cancer de l'ovaire CaoV3 et progression stabilisée dans le modèle de cancer du poumon NCI-H2122. Aucune activité n'est observée dans les autres modèles exprimant très faiblement l'IGF-1R.



**Figure 16**

Activité antitumorale de l'ADC W0101 sur différents modèles de xénogreffe. A) Évaluation du niveau d'expression de l'IGF1R par immunohistochimie sur des coupes de tumeurs. Photographies obtenues après marquage de coupes de tumeurs prélevées chez des souris greffées avec des cellules tumorales humaines ; B) Activité antitumorale dans des modèles de cancer du sein (MCF-7), du poumon (NCI-H2122 et SBC5), de l'ovaire (CaoV3) et gastrique (Hs746t). Des doses de 3 mg/kg de l'ADC sont administrées aux animaux greffés par voie intraveineuse. Deux schémas d'administration ont été évalués : un schéma Q4d4 consistant en quatre injections espacées de quatre jours, et un schéma consistant en une dose unique. L'activité de l'ADC W0101 est comparée à celle d'un ADC contrôle.

## Un immunoconjugué cytotoxique prometteur dans la lutte contre le cancer

Les études précliniques décrites dans ce chapitre ont permis de démontrer la spécificité de l'ADC W0101 pour l'IGF-1R et l'absence de liaison à l'IR. Les activités antitumorales *in vitro* et *in vivo* sont étroitement corrélées au niveau d'expression de la cible. Cet ADC constitue une nouvelle option thérapeutique très prometteuse pour les patients dont la tumeur surexprimera

l'IGF-1R. Un premier essai clinique est en cours chez des patients ayant des tumeurs solides (référence de l'essai : NCT03316638). L'objectif de cet essai est d'évaluer la tolérance des patients au traitement et identifier les éventuels effets secondaires.

*L'auteur remercie Barbara Akla, Matthieu Broussas, Alain Beck, Mariya Pavlyuk, Éric Chetaille et Nathalie Corvaïa pour leur contribution au travail décrit dans ce chapitre.*