

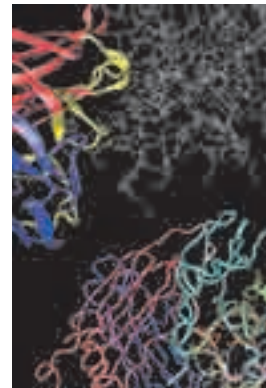
# Immunogénicité de protéines d'intérêt thérapeutique

## Les anticorps monoclonaux thérapeutiques

Philippe Stas, Ignace Lasters

Traduction française de Laure Coulombel

► Le potentiel thérapeutique des anticorps monoclonaux ne cesse de croître avec d'indiscutables succès. Mais le bénéfice clinique de leur utilisation peut être compromis par l'induction d'anticorps contre ces anticorps, réalisant une réponse de type ADA (*anti-drug antibodies*) bien connue pour d'autres agents médicamenteux. Si la conception d'anticorps chimères contenant des séquences humaines, humanisés voire totalement humains, a substantiellement réduit leur immunogénicité, ce risque ne pourra pas être entièrement éradiqué. Nous discutons dans cette revue les aspects spécifiques aux réactions induites par l'administration d'Acm, qu'ils soient inhérents au produit thérapeutique ou au patient ; nous évoquerons aussi le programme de gestion des risques mis en place par les instances réglementaires et notamment l'*European Medicines Agency* (EMA), et dont le rôle est d'évaluer, chez le patient, mais aussi en amont lors des étapes de recherche et développement précédant la mise sur le marché du produit (démarche prédictive), non seulement la probabilité d'une réponse immune dirigée contre cette protéine mais aussi son intensité. Cela implique le développement de méthodes *in silico*, de tests *in vitro* détectant l'activation T et finalement l'analyse fine des ADA à la recherche de l'épitope immunogène. ◀



P. Stas, I. Lasters :  
Algonomics NV, Technologiepark  
4, B-9052 Gent, Belgique.  
[philippe.stas@algonomics.com](mailto:philippe.stas@algonomics.com)

fait, l'expérience accumulée dans l'utilisation des Acm actuellement disponibles confirme la réalité de ce problème [1]. Cette immunogénicité peut être définie comme la fraction de patients ou d'individus traités qui développent des anticorps contre ces Acm (*anti-drug antibodies* ou ADA, ou plus spécifiquement *human antihuman antibody* ou HAHA). Le *Tableau 1* fournit les principales données sur l'immunogénicité des Acm. Les Acm thérapeutiques et diagnostiques de la première génération étaient très fortement immunogènes, et l'on avait attribué cette réaction à l'utilisation d'immunoglobulines d'origine murine. Les développements technologiques permettant la mise au point ultérieure d'Acm chimériques, voire totalement humains ou humanisés (→), ont de fait réduit cette immunogénicité. L'optimisation de la production et de la formulation a aussi contribué à cette amélioration (→). Mais si les anticorps entièrement humains sont certainement moins immunogènes que les anticorps murins, selon la classification des Acm thérapeutiques établie en 2005 [2], certains suscitent toujours un degré élevé de réponse immunitaire. En 2008, l'*European medicines agency* (EMA) a édité des recommandations et un programme de gestion des risques pour répondre à ce problème, qui traitent à la fois de la probabilité de ce risque et de la sévérité de

(→) voir M. Cogné *et al.*, page 1149 ; A. Beck *et al.*, page 1024

(→) voir O. Cochet et M. Chartrain, page 1078

Les anticorps monoclonaux (Acm) thérapeutiques représentent l'une des classes de médicaments du secteur pharmaceutique dont la progression est la plus rapide. Plus de vingt Acm sont disponibles sur le marché, et une centaine au moins est actuellement testée dans des essais cliniques. Ce développement rapide requiert de la part des industriels, mais aussi des instances réglementaires, un approfondissement de la connaissance des spécificités propres à cette classe de produits thérapeutiques. L'un des principaux défis à résoudre est celui de l'immunogénicité, et de

Nom	Type	Cible	Immunogénicité
Bexxar/tositumomab	murin	CD20	9
Zevalin/ibritumomab-tiuxétan	murin	CD20	3
OKT3	murin	CD3	54
Rituxan/rituximab	chimérique	CD20	0-65
Erbix/cétuximab	“	EGFR	5
Réopro/abciximab	“	GPIIb/IIIa	4-21
Simulect/basiliximab	“	IL2R	< 2
Rémicade/infliximab	“	TNF $\alpha$	6-61
hu-A33	humanisé	A33	33-73
Tysabri/natalizumab	“	intégrine $\alpha$ 4	7
MLN02	“	intégrine $\alpha$ 4 $\beta$ 7	44
Éculizumab	“	C5	< 2
Cantuzumab-mertansine	“	Can	< 2
Raptiva/éfalizumab	“	CD11a	2,3-6
Épratuzumab	“	CD22	19
Mylotarg/gemtuzumab-ozogamicin	“	CD33	< 2
Campath-1H/alemtuzumab	“	CD52	10-75
Herceptin/trastuzumab	“	HER2	< 2
Xolair/omalizumab	“	IgE	< 2
Zénapax/HAT/daclizumab	“	IL2R	8-34
Synagis/palivizumab	“	RSV	< 2
Humicade/CDP571	“	TNF $\alpha$	7
Avastin/bévacizumab	“	VEGF	< 2
Humira/adalimumab	humain	TNF $\alpha$	1-87

**Tableau 1. Immunogénicité des Acm thérapeutiques.** Les chiffres (colonne de droite) indiquent la proportion de patients ayant développé une réaction immunitaire dans les études rapportées dans la littérature. Lorsque pour un même Acm plusieurs données étaient disponibles, les valeurs minimale et maximale sont indiquées [1].

l'immunogénicité secondaire aux médicaments (→). Même si ce guide n'est pas spécifiquement dédié aux Acm, il représente une solide base de travail pour l'évaluation de l'immunogénicité des Acm thérapeutiques. En 2009-2010, l'EMA éditera une première version de recommandations destinées à la prise en charge de l'immunogénicité des Acm thérapeutiques.

(→) voir F. Lackner et M.E. Behr-Gross, page 1183

## Sources d'immunogénicité des protéines thérapeutiques

De nombreux paramètres contribuent au pouvoir immunogène d'une protéine lorsqu'elle est administrée à un patient [3] : certains sont inhérents au patient ou à la maladie, d'autres sont imputables au produit lui-même.

### Facteurs d'immunogénicité inhérents au patient et à la maladie

Le contexte pathologique peut influencer la réaction immunitaire du patient à l'administration d'Acm thérapeutiques. Par exemple, en général, un même Acm induira une réponse de moindre intensité s'il est prescrit pour une maladie tumorale (indication pour laquelle beaucoup d'Acm ont été initialement développés) que s'il est utilisé dans un contexte de maladie inflammatoire ou auto-immune (ce qui souvent est une indication secondaire des Acm). Un élément supplémentaire est l'évolution dans le temps de la réponse immunitaire : c'est particulièrement vrai avec les anticorps intégralement humains prescrits dans le contexte de maladies chroniques - donc à long terme - et souvent en association avec d'autres produits susceptibles à leur tour de moduler la réponse immunitaire. De plus, l'immunogénicité de l'adalimumab et de l'infliximab, deux anti-TNF (*tumor necrosis factor*) (→), est notablement réduite par l'administration concomitante de médicaments rhumatologiques [4]. Ces produits peuvent d'ailleurs avoir un effet sur la réponse immunitaire à l'Acm même s'ils ont été utilisés antérieurement.

En règle générale, l'induction d'anticorps anti-Acm (réaction HAHA) chez un patient dépend du schéma thérapeutique : l'administration de l'Acm de façon prolongée ou par cures intermittentes répétées dans des affections chroniques induira plus fréquemment une immunisation qu'un traitement de courte durée dans le contexte d'une affection aiguë [5, 6]. Indépendamment du schéma thérapeutique, l'âge intervient : le métabolisme de l'Acm est différent chez les jeunes adultes et chez les patients plus âgés. Ainsi, des doses équivalentes d'infliximab n'ont pas les mêmes conséquences en termes d'immunisation chez les patients ayant une polyarthrite rhumatoïde ou une arthrite juvénile. La voie d'injection est également un paramètre non négligeable : la voie intraveineuse induit moins de réactions immunitaires que les voies sous-cutanée ou intramusculaire. Peut-être est-ce en relation avec l'intervention de cellules effectrices différentes : les injections sous-cutanées mobilisent les cellules de Langerhans et les injections intramusculaires les cellules dendritiques du derme.

(→) voir L. Semerano et M.C. Boissier, page 1108 ; J. Sibilia, page 1033

Enfin, il ne faut pas négliger les facteurs génétiques : l'haplotype HLA du patient joue un rôle mais aussi, dans le cas de maladies dont l'origine est un défaut de synthèse d'une protéine, l'absence de tolérance vis-à-vis de la protéine absente (c'est le cas des patients hémophiles sévères vis-à-vis du facteur VIII).

### Facteurs d'immunogénicité liés au produit

Un paramètre déterminant est le degré de « non-soi » que l'organisme hôte attribue à la protéine thérapeutique étrangère. L'organisme considérera ainsi qu'une protéine thérapeutique d'origine bactérienne (staphylokinase par exemple utilisée comme thrombolytique) lui est beaucoup plus « étrangère » qu'une protéine thérapeutique ayant un fort degré d'homologie avec une protéine circulant endogène. C'est une des raisons qui expliquent l'immunogénicité beaucoup plus forte des Acm murins comparée à celle des Acm humanisés et entièrement humains [2]. La présence d'agrégats (→) et de complexes immuns dans la préparation (→) voir L. Manache et al., page 1063 sont aussi de puissants inducteurs d'une réponse immune anti-anticorps. Les agrégats sont facilement captés par les cellules présentatrices d'antigènes, déclenchant une réponse humorale importante stimulée par l'activation des lymphocytes T *helper* (voir Encadré). Certains variants d'agrégats exposant des motifs structuraux répétés peuvent même provoquer le pontage des récepteurs B, induisant la prolifération des lymphocytes B et l'activation d'une réponse immune indépendamment de l'activation des lymphocytes T [7].

La formation d'agrégats est influencée par les conditions de conservation, de manipulation et la formulation des produits, mais aussi par les caractéristiques physicochimiques du produit lui-même. Il est donc essentiel, lorsqu'une ADA est déclenchée en réponse à la présence d'agrégats, de déterminer si la structure immunogène est la structure de l'agrégat ou un épitope protéique qui existerait également dans l'immunoglobuline non agrégée.

Les endotoxines, les lipides, l'ADN utilisé lors de la production de l'Acm peuvent aussi stimuler son immunogénicité. Il en est de même de l'altération des profils de glycosylation, des réactions de déamidation ou d'oxydation [3], tout facteur concourant à la modification de l'Acm. L'optimisation des méthodes de production et de purification améliorant l'homogénéité du produit et celle des méthodes d'analyse utilisées pour détecter les produits de dégradation a réduit l'incidence des phénomènes allergiques, voire de choc anaphylactique, induits par certaines protéines thérapeutiques.

### Le programme de gestion des risques

Le développement de toute protéine à usage thérapeutique donne lieu à l'établissement d'un programme de gestion des risques : son rôle est d'évaluer non seulement la probabilité d'une réponse immune dirigée contre cette protéine mais aussi son intensité. Ce plan doit aussi proposer des réponses adéquates dans l'éventualité d'une telle occurrence. L'immunogénicité de certaines protéines peut en effet entraîner des réactions cliniquement sévères. C'était par

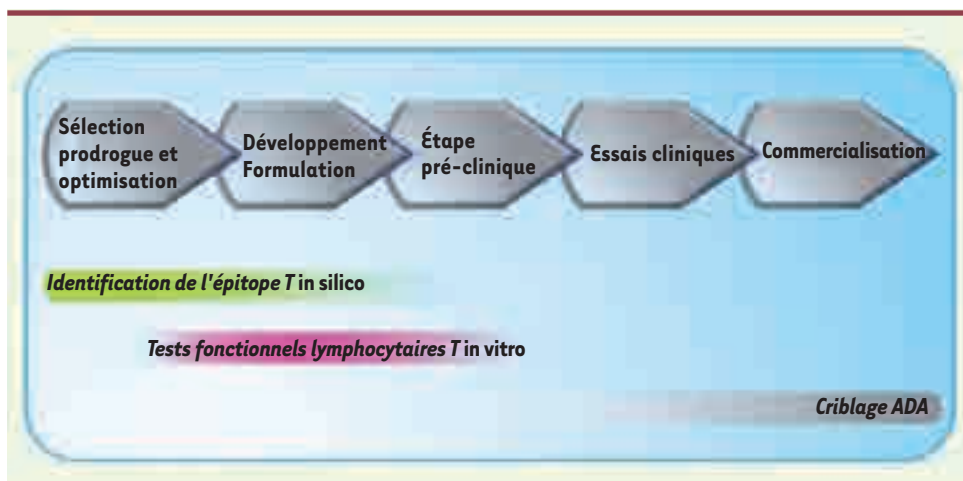
exemple le cas de l'érythropoïétine déclenchant chez les patients la production d'anti- (→) voir L. Manache et al., page 1063 corps à l'origine d'aplasies sévères [8] (→).

Les recommandations actuelles couvrent l'ensemble des protéines thérapeutiques, mais certains aspects spécifiques aux réactions induites par l'administration d'Acm doivent être soulignés : en général, les ADA contre les anticorps thérapeutiques altèrent l'efficacité du produit et ses caractéristiques pharmacocinétiques, ce qui peut aboutir à l'élimination du produit. Mais il est maintenant exceptionnel qu'une réaction d'immunogénicité entraîne des complications graves. Le pouvoir immunogène des Acm thérapeutiques peut en effet être grandement neutralisé en amont lors des étapes de formulation, évitant la formation d'agrégats ou de produits de dégradation, et par le contrôle du développement de complexes immuns (→). Il faut toutefois veiller à ce que les nouvelles techniques d'ingénierie, notamment celles qui modifient le fragment Fc (→) ou créent des produits fusionnant anticorps et protéines, ne se révèlent être source de produits immunogènes, même s'il est peu probable que la tolérance immunologique envers le fragment Fc puisse être abolie. (→) voir O. Cochet et M. Chartrain, page 1078 (→) voir R. Abès et al., page 1011

### Comment identifier les anticorps dirigés contre les protéines thérapeutiques ?

#### Évaluation clinique chez le patient

L'immunogénicité d'un produit se définit par la fraction des patients ayant reçu ce produit qui développent des ADA contre celui-ci. Les méthodes prédictives, qui sont appliquées aux étapes successives du développement préclinique d'un Acm thérapeutique (Figure 1) et utilisent des approches *in vitro*, *in silico*, ou *in vivo* peuvent apprécier le degré potentiel d'immunogénicité, et guider l'optimisation de la fabrication. Toutefois, compte tenu de sa variabilité d'expression, la mesure réelle de cette immunogénicité ne pourra se faire qu'une fois le produit administré au patient. Au cours des dernières années, des mises au point et des recommandations ont été publiées sur ce thème de la mesure des ADA chez les patients et lors des étapes précliniques [3, 9-12]. La Figure 2 décrit les niveaux successifs de mesure et de caractérisation des ADA. Un premier test de criblage identifie les réponses de type ADA dans les échantillons prélevés chez les patients. Puis un test de confirmation aura pour objectif de distinguer les échantillons positifs des faux positifs. Enfin, des tests seront mis en œuvre pour caractériser la réponse ADA, déterminer si elle est de type neutralisant et dans ce cas identifier l'isotype de l'anticorps neutralisant.



**Figure 1. Évaluation du risque d'immunogénéicité des Acm.** Une évaluation systématique et rigoureuse du risque d'immunogénéicité est réalisée tout au long du processus de développement d'un Acm : elle associe des méthodes *in silico* lors des étapes initiales, des méthodes *in vitro* pendant le développement et lors de la formulation, et l'association de diverses méthodes de détection des ADA au cours des étapes précliniques et cliniques et sur le produit commercialisé.

Les tests utilisés pour identifier puis confirmer la présence d'ADA sont en général basés sur une technique ELISA, qu'elle soit directe, indirecte ou *sandwich*. Des techniques de chimioluminescence ou de résonance plasmonique de surface (*surface plasmon resonance*) et/ou de radio-précipitation peuvent aussi être utilisées. Le pouvoir neutralisant de l'anticorps est quant à lui déterminé dans des tests cellulaires.

Le *Tableau 1* regroupe les données publiées sur l'immunogénéicité des Acm thérapeutiques. Une comparaison stricte de ces différentes études se heurte à la diversité des techniques d'analyse utilisées et à leur sensibilité très variable (→). Il faut donc veiller à ne pas surestimer ou surinterpréter ces données. Cette hétérogénéité de la réponse est illustrée par les études cliniques de l'alemtuzumab, un anticorps anti-CD52 humanisé utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (→). Six études cliniques réalisées entre 1995 et 2003 révèlent un taux de réponses ADA reflétant l'immunogénéicité de l'Acm oscillant entre 0 et 75 %. Si l'on additionne tous les patients (n = 120), cela revient à un taux moyen de 45 % de réponses immunes. L'immunogénéicité est beaucoup plus faible dans le cas des 167 patients ayant reçu ce même Acm alemtuzumab pour le traitement d'une leucémie lymphoïde chronique puisque seuls 1,9 % des patients développèrent des anticorps contre l'Acm thérapeutique. Comme nous le mentionnions ci-dessus, la nature de la maladie pour laquelle est prescrite l'Acm a une influence sur l'expression du pouvoir immunogène de l'Acm [1].

Une telle dissociation est également observée avec l'Acm chimérique anti-CD20 rituximab (→). Lorsqu'il est administré à des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique B, il n'entraîne pas de réponse immune [13, 14] ; au contraire 65 % des patients atteints de lupus érythémateux disséminé et 27 % de ceux atteints de polyarthrite rhumatoïde traités par ce même rituximab développent des ADA [15, 16]. Quant à l'adalimumab, un anticorps complètement humain, il induit un taux de réponses immunes de 1 à 12 % dans la polyarthrite rhumatoïde [17, 18]. Ce taux est proche des 18 % rapportés lors de l'analyse de patients traités à long terme [1]. Toutefois, une étude dissidente rapporte 85 % de réponses ADA [19].

### Évaluation de l'immunogénéicité par des critères non cliniques : justification et méthodes alternatives

Les recommandations de l'EMEA (EMEA/CHMP/BWP/14327/2006) mentionnent le problème posé par une évaluation de l'immunogénéicité des protéines thérapeutiques *in silico*, *in vitro* ou par des approches *in vivo* chez l'animal dans les termes suivants : « *therapeutic proteins show species differences in most cases. Thus, human proteins will be recognized as foreign proteins by animals. For this reason, the predictivity of non-clinical studies for evaluation of immunogenicity is considered low. Non-clinical studies aiming at predicting immunogenicity in humans are normally not required. However, ongoing consideration should be given to the use of emerging technologies (novel in vivo, in vitro and in silico models), which might be used as tools* » (→).

La nécessité de recourir à des études d'immunogénéicité dépendra donc essentiellement du risque que l'on peut anticiper en fonction de la connaissance que l'on a de la molécule. Les molécules à haut risque, par exemple celles qui affectent une voie de signalisation unique et sont semblables à une protéine humaine non redondante (comme l'EPO), requièrent probablement des études non cliniques plus poussées que les protéines dont le risque immunogène est faible, et parmi ces dernières, on trouve les Acm complètement humains. Même si la réglementation impose la recherche dans des modèles animaux d'une réponse ADA au cours du développement préclinique de molécules thérapeutiques, les résultats de ces tests peuvent difficilement être extrapolés à la prédiction d'une immunogénéicité chez le patient. L'intérêt des modèles animaux est avant tout d'évaluer les effets secondaires nocifs et la toxicité, ainsi que les propriétés de pharmacocinétique-pharmacodynamique des molécules thérapeutiques.

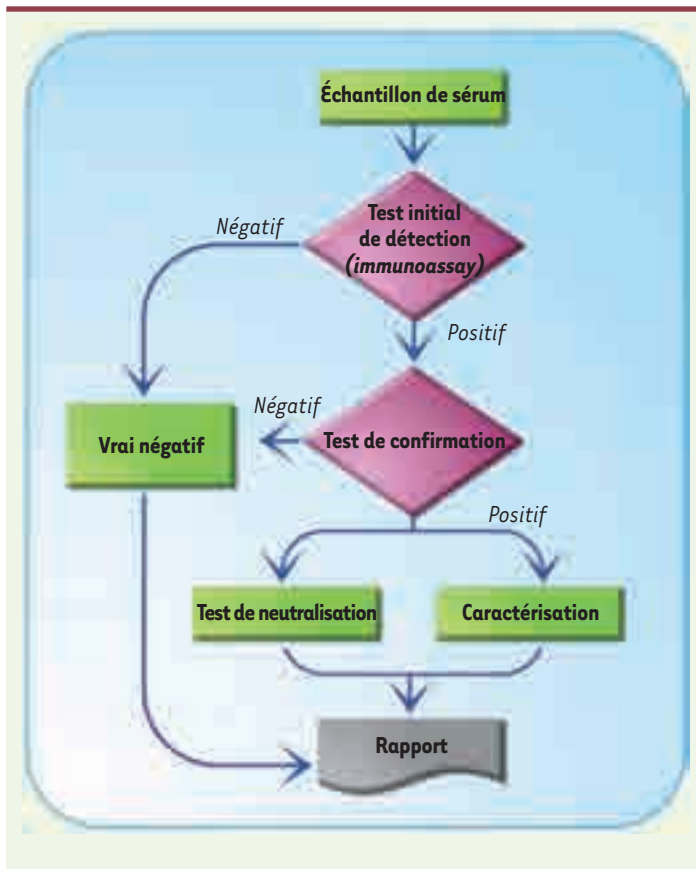


Figure 2. Approche hiérarchisée de mesure des ADA contre des protéines thérapeutiques

Il est donc nécessaire d'envisager des méthodes alternatives de prédiction d'une réaction immune de type ADA. La démarche consiste à définir, pour les éviter, les épitopes présents sur la molécule thérapeu-

tique qui pourraient être reconnus par les lymphocytes T. Elle utilise des méthodes *in vitro* et *in silico*. Les méthodes *in silico* consistent à identifier les séquences de liaison des peptides aux récepteurs HLA ; les méthodes *in vitro*, elles, mesurent cette liaison des peptides aux molécules HLA et l'activation des lymphocytes T ou peuvent même identifier directement les peptides qui sont présentés par les cellules présentatrices d'antigènes. Le choix de la méthode utilisée est fonction de la phase de développement dans laquelle se trouve l'Acm.

### Méthodes *in silico*

Elles permettent, par l'analyse informatique de la structure primaire de la molécule thérapeutique, l'identification rapide et à faible coût des épitopes susceptibles de se lier aux molécules de classe II du CMH et d'être reconnus par les lymphocytes T. Ces méthodes sont utilisées à une étape précoce du processus de sélection d'une molécule, lors du criblage initial et du choix des composés *leaders*. Elles guideront ensuite les modifications par ingénierie de la protéine, ou identifieront quelles mutations/substitutions peuvent être sélectionnées sans risque au cours du processus d'humanisation et de greffe de CDR (*complementation determining region*) (→ voir A. Beck et al., page 1024 ; R. Abès et al., page 1011

pour détecter les séquences immunogènes et les retirer par mutagenèse dirigée ou les substituer par d'autres qui ne seront pas reconnues par les lymphocytes T.

Il existe trois types différents de méthodes *in silico* : les méthodes additives ou non additives ayant recours à des approches d'inférence (prédiction informatique), et

	Méthodes <i>in silico</i>	Tests de liaison peptidique	Élution de peptides des CPA	Tests <i>in vitro</i> de prolifération et activation T	Criblage des ADA
Information					
Liaison du peptide au récepteur CMH classe II	X	X	X	X	X
Processing de l'antigène par les CPA	-	-	X	X	X
Activation des lymphocytes T helper	-	-	-	X	X
Présence d'anticorps contre le produit	-	-	-	-	X
Prérequis	• Structure primaire	• Peptides	• Protéine et/ou peptides dérivés	• Protéines très pures • Peptides ultra-purs • CMN de > 50 donneurs sains ou de patients	• Protéine de grade clinique • Sérum du patient

Tableau II. Résumé des méthodes cliniques et non cliniques identifiant l'immunogénicité d'une protéine thérapeutique. Les informations apportées par ces tests et leur prérequis sont également indiqués. CMN : cellules mononucléées ; CPA : cellules présentatrices d'antigène ; ADA : *antidrug antibodies* ; CMH : complexe majeur d'histocompatibilité.

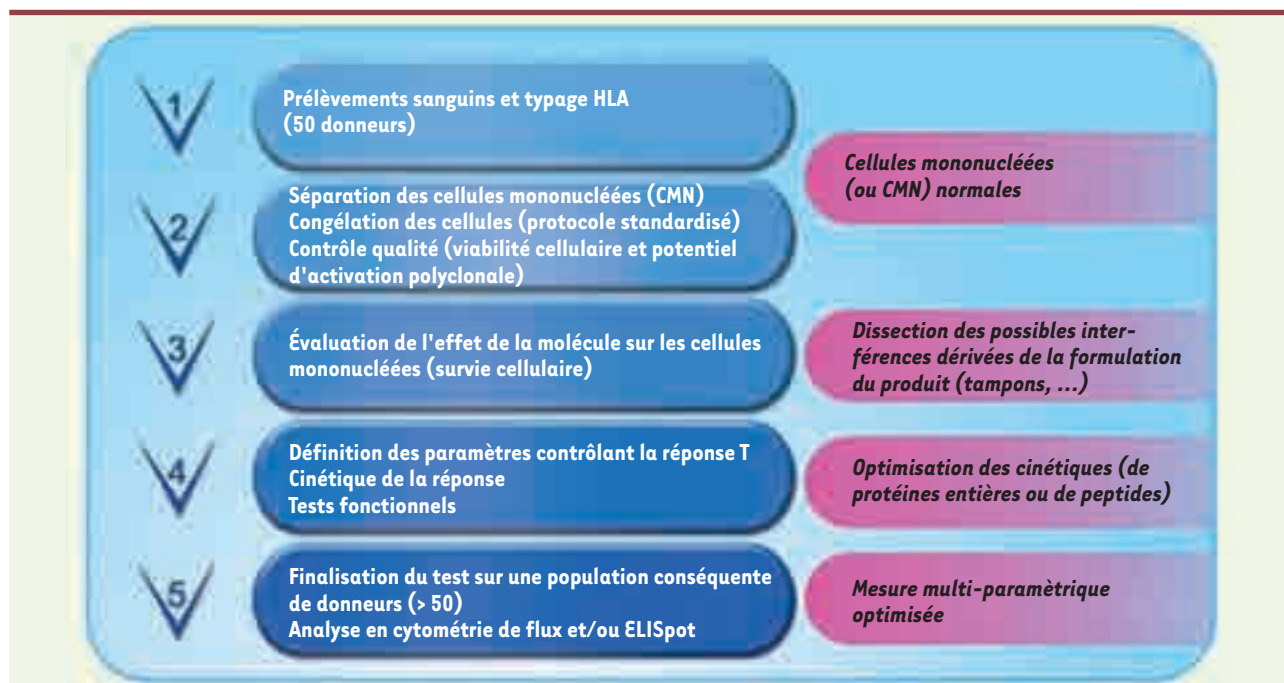


Figure 3. Schéma typique d'analyse des réponses lymphocytaires T chez des patients ou chez des donneurs.

les méthodes prenant en compte la structure moléculaire. Les premiers modèles prédictifs étaient complètement virtuels et uniquement basés sur une approche statistique, comparant l'alignement des séquences connues d'épitopes et celui des motifs sélectionnés. Depuis, de nouvelles méthodes statistiques ont fait leur apparition et offrent des outils plus sophistiqués : Rankpep, Propred, Tepitope, Epimatrix, Bimas and Syphpeiti [20, 21]. Les plus récentes vont au-delà de la simple information donnée par la séquence, et introduisent des aspects de modélisation moléculaire des interactions entre les peptides et les molécules *via* des approches de type champs de force (*forcefields*) ou en introduisant des paramètres de solvation (*solvation parameters*) ou d'autres propriétés de dynamique moléculaire basées sur la structure [22]. L'intérêt de ces nouvelles approches est qu'elles intègrent l'influence sur la dynamique de la structure moléculaire des polymorphismes, par exemple ceux des molécules CMH, ce qui élargit et enrichit l'analyse. Malgré leur amélioration si on les compare aux méthodes antérieures historiques, les méthodes par inférence n'atteignent pas le degré de précision que permettent les méthodes basées sur la structure moléculaire [1]. Les méthodes *in silico*, déduisant de l'analyse de la séquence la liaison du peptide au récepteur HLA ont remplacé les tests *in vitro* mesurant cette interaction directement *in vitro*. À l'heure actuelle, l'approche *in vitro* a évolué vers l'analyse du *processing* de l'antigène par la cellule présentatrice et l'activation de la cellule T par le complexe CMH-peptide.

#### Identification des épitopes T *in vitro*

L'identification des épitopes reconnus par les lymphocytes T repose classiquement sur l'éluotion des peptides à partir des cellules présentatrices d'antigènes puis sur la caractérisation de ces éluats par spectroscopie de masse [23, 24].

Les tests *in vitro* d'activation et de prolifération lymphocytaires T détectent si une protéine thérapeutique ou un peptide peut induire une réponse immune. Dans le cas d'Acm ou de leurs peptides dérivés, ceux-ci sont incubés en présence de cellules mononucléées sanguines isolées de donneurs sains. Après quelques jours en culture, les cellules sont à nouveau exposées à l'antigène ou aux peptides initiaux, en présence de monocytes autologues, ce qui déclenche une seconde stimulation des cellules T *helper*. Les cellules T activées sont ensuite caractérisées, soit par l'analyse de leur profil de sécrétion de cytokines (ELISpot), soit par cytométrie de flux détectant des marqueurs d'activation ou les cytokines synthétisées. Ces méthodes sont très informatives, mais il faut veiller à n'utiliser que des préparations très pures d'antigènes, si possible proches de leur formulation définitive. En effet, les excipients, les agrégats et tout produit contaminant associé au processus de production peuvent influencer et fausser le résultat final (→). Il faut également s'abstraire du polymorphisme du CMH en utilisant des cellules provenant d'au moins cinquante donneurs individuels (Figure 3).

(→) voir L. Manache et al., page 1063

#### Conclusions

Tous les Acm thérapeutiques induisent peu ou prou un certain degré d'immunogénicité. Il est donc important d'en évaluer la probabilité et la sévérité potentielle tout au long du processus de développement de ces



**Figure 4. Complexe peptide-CMH de classe II.** Le peptide est figuré en orange et les deux chaînes de la molécule CMH en vert et bleu.

molécules. La réalité d'une réponse de type ADA ne peut être identifiée que chez les patients lors des étapes de développement clinique ou une fois sur le marché, mais plusieurs méthodes non cliniques sont utilisées en amont lors des étapes de recherche et développement pour analyser l'immunogénicité des produits. Le *Tableau II* décrit ces méthodes, les informations qu'elles apportent, et à quelle étape de développement elles sont le plus utiles. L'association de méthodes *in silico*, de tests *in vitro* détectant l'activation T et finalement l'analyse fine des ADA assure à ce jour une détection précise et fiable de l'immunogénicité d'un produit thérapeutique. ♦

## SUMMARY

### Immunogenicity of therapeutic antibodies

Unwanted immunogenicity, *i.e.*, the development by patients of anti-drug antibodies is a significant problem with biologicals therapeutic reagents and can compromise clinical response. Over 20 antibodies currently on the market and over 100 drug candidates are currently in clinical trials; all therapeutic antibodies are showing some level of immunogenicity, and although it has been reduced with the advent of antibodies including human sequences, or even humanised antibodies, this concern will not be totally eradicated. Whereas the actual anti-drug response can only be addressed during clinical development or post-marketing, the industry and the regulatory instances are facing a challenge to develop accurate procedures for the assessment of immunogenicity related to antibody therapeutics, addressing both the likelihood and the severity of the drug-related immunogenicity. This review will discuss the multiple factors that can contribute to a potential immunogenicity of protein therapeutics patient/disease related, as well as related to the drug itself, and the strategies to identify anti-drug antibodies, both in clinical and non clinical assays. ♦

## Épitopes $T_h$

Une réponse humorale (sécrétion d'anticorps) provoquée par la reconnaissance d'antigènes étrangers requiert la présence de la fonction *helper* des lymphocytes T *helper* et le développement d'une mémoire immunologique. Les antigènes sont captés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), cellules dendritiques, cellules de Langerhans, macrophages ou cellules B. Les CPA digèrent l'antigène et le réduisent en peptides qui se lient aux molécules CMH de classe II et sont présentés à la surface de la CPA. Le complexe peptide-CMH II est reconnu par le récepteur des lymphocytes T  $CD4^+$  *helper*, et cette liaison, en association avec des signaux costimulateurs, entraîne la sécrétion de cytokines. Ces dernières stimulent la production, par les lymphocytes B, d'anticorps contre les antigènes étrangers ayant déclenché la réponse immune.

Les molécules CMH de classe II peuvent lier une grande variété de peptides. Ceux-ci se lient au CMH dans une conformation presque parfaitement étirée sur un plan linéaire (*Figure 4*). L'affinité de chaque peptide pour la molécule de CMH est différente, et déterminée par sa séquence primaire. Les méthodes *in silico* ont pour objectif de prédire le nombre et la proximité des épitopes reconnus par les lymphocytes T, tout en tenant compte des polymorphismes nombreux des molécules CMH II. Les tests *in vitro* quant à eux détectent la prolifération et l'activation des lymphocytes T  $CD4^+$  en présence des CPA porteuses du complexe peptide-CMH II.

## CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

## RÉFÉRENCES

1. Van Walle I, Gansemans Y, Parren PW, *et al.* Immunogenicity screening in protein drug development. *Expert Opin Biol Ther* 2007 ; 7 : 405-18.
2. Hwang W, Foote J. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* 2005 ; 36 : 3-10.
3. European agency for the evaluation of medicinal products (EMA). Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins. EMA/CHMP/BMWP/14327/2006, avril 2008.
4. Baert F, Noman M, Vermeire S, *et al.* Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med* 2003 ; 348 : 601-8.
5. Goldstein G, Fuccello AJ, Norman DJ, *et al.* OKT3 monoclonal antibody plasma levels during therapy and the subsequent development of host antibodies to OKT3. *Transplantation* 1986 ; 42 : 507-11.
6. Schroeder TJ, First MR, Hurtubise PE, *et al.* Immunologic monitoring with Orthoclone OKT3 therapy. *J Heart Transplant* 1989 ; 8 : 371-80.
7. Bachmann MF, Rohrer UH, Kundig TM, *et al.* The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 1993 ; 262 : 1448-51.
8. Casadevall N, Nataf J, Viron B, *et al.* Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med* 2002 ; 346 : 469-75.
9. Gupta S, Indelicato SR, Jethwa V, *et al.* Recommendations for the design, optimization, and qualification of cell-based assays used for the detection of neutralizing antibody responses elicited to biological therapeutics. *J Immunol Methods* 2007 ; 321 : 1-18.
10. Koren E, Smith HW, Shores E, *et al.* Recommendations on risk-based strategies for detection and characterization of antibodies against biotechnology products. *J Immunol Methods* 2008 ; 333 : 1-9.
11. Mire-Sluis AR, Barrett YC, Devanarayan V, *et al.* Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. *J Immunol Methods* 2004 ; 289 : 1-16.
12. Shankar G, Devanarayan V, Amaravadi L, *et al.* Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *Biomed Anal* 2008 online.

13. Piro LD, White CA, Grillo-López AJ, *et al.* Extended Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) therapy for relapsed or refractory low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 1999 ; 10 : 655-61.
14. Davis TA, Grillo-López AJ, White CA, *et al.* Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma : safety and efficacy of re-treatment. *J Clin Oncol* 2000 ; 18 : 3135-43.
15. Looney RJ, Anolik JH, Campbell D, *et al.* B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus : a phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis Rheum* 2004 ; 50 : 2580-9.
16. Pijpe J, van Imhoff GW, Spijkeret FK, *et al.* Rituximab treatment in patients with primary Sjögren's syndrome : an open-label phase II study. *Arthritis Rheum* 2005 ; 52 : 2740-50.
17. van de Putte LB, Atkins C, Malaise M, *et al.* Efficacy and safety of adalimumab as monotherapy in patients with rheumatoid arthritis for whom previous disease modifying antirheumatic drug treatment has failed. *Ann Rheum Dis* 2004 ; 63 : 508-16.
18. Keystone EC, Kavanaugh AF, Sharp JT, *et al.* Radiographic, clinical, and functional outcomes of treatment with adalimumab (a human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy : a randomized, placebo-controlled, 52-week trial. *Arthritis Rheum* 2004 ; 50 : 1400-11.
19. Bender NK, Heilig CE, Droll B, *et al.* Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. *Rheumatol Int* 2007 ; 27 : 269-74.
20. Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, *et al.* SYFPEITHI : database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 1999 ; 50 : 213-9.
21. Sturniolo T, Bono E, Ding J, *et al.* Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat Biotechnol* 1999 ; 17 : 555-61.
22. Desmet J, Meersseman G, Boutonnet N, *et al.* Anchor profiles of HLA-specific peptides : analysis by a novel affinity scoring method and experimental validation. *Proteins* 2005 ; 58 : 53-69.
23. Falk K, Roetzschke O, Stefanovic S, *et al.* Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991 ; 351 : 290-6.
24. Davenport MP, Smith KJ, Barouch D, *et al.* HLA Class I binding motifs derived from random peptide libraries differ at the COOH terminus from those of eluted peptides. *J Exp Med* 1997 ; 185 : 367-71.

## TIRÉS À PART

P. Stas

# Questions de santé publique

Un nouveau bulletin pour une meilleure visibilité des résultats de la recherche en santé publique

**L**es résultats de la recherche en santé publique souffrent en France d'un réel manque de visibilité. Ceci concerne aussi bien le monde académique (hors santé publique) que le grand public et les décideurs. Pour pallier ce déficit, l'IRSP a créé un bulletin à large diffusion intitulé « *Questions de santé publique* », largement inspiré du bulletin mensuel d'information de l'INED « *Populations et sociétés* ». L'objectif éditorial est de porter à la connaissance d'un large public (enseignants, étudiants, journalistes, décideurs, milieux de la recherche,

associations, public concerné) les informations les plus récentes concernant des questions importantes de santé publique, rédigées de façon facilement lisible et compréhensible pour des non spécialistes, en garantissant que les informations publiées sont validées scientifiquement. La publication concernera des faits et non des positions. Au-delà de la présentation de résultats, cette publication a également des qualités pédagogiques, permettant au lecteur de mieux comprendre comment sont formulées et abordées les questions de santé publique et quelles sont les limites de ces études.

✂

Nom .....  
 Prénom .....  
 Institution ..... Fonction .....  
 Spécialité ..... Service .....  
 Adresse .....  
 Ville .....  
 Code postal .....  
 Pays .....  
 Adresse électronique .....  
 à scier retourner par le poste ou par fax au 01 95 84 13 94

Questions de santé publique  
 Les Éditions EDK  
 2, rue Troyon - 92310 Sèvres  
 France

Réservé aux abonnés de M/S  
 Recevez gratuitement et régulièrement  
**Questions de santé publique**  
 en renvoyant ce document soigneusement rempli.

Questions de santé publique est une publication de l'Institut de Recherche en Santé Publique. ■ Directeur de la publication : Alfred Spira.  
 ■ Rédacteur en chef : Nathalie de Parseval. ■ Une réalisation des Éditions EDK.