La région charnière des anticorps thérapeutiques

L'importance capitale d'une courte séquence

Quentin Deveuve¹, Valérie Gouilleux-Gruart^{1,2},
Gilles Thibault^{1,2}, Laurie Lajoie¹

► La région charnière est une courte séquence des chaînes lourdes (H) d'anticorps liant le Fab (*fragment antigen binding*) au Fc (*fragment crystallisable*). Les propriétés fonctionnelles des quatre sous-classes d'immunoglobulines d'isotype G (IgG) résultent en partie des différences de séquence de leurs régions charnières. En effet, certains acides aminés de la partie C-terminale de ces régions charnières (« partie basse ») sont situés au sein ou à proximité des sites de liaison de la molécule C1q de la voie classique du complément et des récepteurs pour la région Fc des IgG (RFcγ) sur les chaînes H d'IgG. Les régions charnières sont également sensibles au clivage protéolytique par de nombreuses protéases du microenvironnement tumoral et/ou inflammatoire pouvant altérer les réponses fonctionnelles. Le format optimal de la charnière reste donc un défi majeur pour le développement de nouveaux anticorps thérapeutiques. ◀

¹Université de Tours, EA7501 GICC (Groupe Innovation et Ciblage Cellulaire), équipe FRAME (Fc Récepteurs, Anticorps et MicroEnvironnement), 37032 Tours, France.
²Service d'immunologie, CHRU de Tours, 37044 Tours, France.
laurie.lajoie@univ-tours.fr

fonctionnelle. On distingue la région Fab (*fragment antigen binding*) permettant la liaison à l'antigène, et la région Fc (*fragment crystallisable*), assurant les fonctions effectrices de l'anticorps. En effet, cette dernière est capable d'activer la voie classique du complément par le recrutement de la protéine soluble C1q ou les effecteurs cellulaires par l'intermédiaire des récepteurs pour la région Fc des IgG (RFcγ). Ces différents effecteurs de l'immunité peuvent ainsi agir sur l'antigène ou la cellule qui l'exprime. La région Fc est également capable de se lier au récepteur néonatal pour la région Fc des IgG (FcRn) impliqué dans leur demi-vie. Ces deux régions, Fab et Fc, sont reliées par la région charnière qui est essentielle à la conformation spatiale de l'anticorps. S'il existe classiquement quatre sous-classes d'IgG chez l'homme, définies par la nature de leur chaîne lourde (γ1, γ2, γ3 et γ4), seuls des AcM au format d'IgG1, IgG2 et IgG4 sont présents sur le marché. La structure de type IgG1 est celle retenue pour les AcM dits « cytolytiques » qui ont, après leur liaison à l'antigène cible, une forte capacité à recruter les effecteurs de l'immunité. L'effet cytolytique peut résulter d'un mécanisme de cytotoxicité dépendante du complément (CDC), de la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP) ou encore de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Lorsque le recrutement des effecteurs immunitaires n'est pas désiré, la structure privilégiée est alors celle des IgG2 ou des IgG4. C'est notamment le cas des AcM qui ciblent la molécule inhibitrice PD-1 (*programmed cell death 1*), tels que le nivolumab (Opdivo®) et le pembrolizumab (Keytruda®), tous les deux des IgG4. Ces anticorps empêchent l'interaction de PD-1 avec son ligand PD-L1 (*programmed death-ligand 1*), permettant ainsi la levée de l'anergie des lymphocytes T présents dans l'environnement tumoral. Les AcM de classe IgG3

L'importance des anticorps monoclonaux (AcM) thérapeutiques a été illustrée en 2018 par le prix Nobel de physiologie ou médecine décerné à James Allison et Tasuku Honjo pour leurs recherches sur le traitement des cancers par inhibition des points de contrôle immunitaire. Actuellement, les AcM thérapeutiques sont utilisés dans diverses pathologies et agissent selon différents mécanismes (agonisme/antagonisme, neutralisation, cytotoxicité) résultant de leur dualité structurale et des nombreux formats développés par ingénierie. Ainsi, le choix du format optimal demeure un enjeu majeur dans le développement des nouveaux AcM.

Les immunoglobulines G humaines (IgG) : relation structure/fonctions

Les AcM thérapeutiques ayant obtenu à ce jour une autorisation de mise sur le marché (AMM) ont dans leur grande majorité une structure d'immunoglobuline G (IgG) humaine intégrale et possèdent ainsi une dualité

Figure 1. Représentation schématique de la structure d'une IgG1 humaine (A) et séquence protéique de la région charnière des quatre sous-classes d'IgG humaines (B). La région Fab (fragment antigen-binding) est composée du domaine variable VH (jaune) et du domaine constant CH1 (bleu foncé) de la chaîne lourde ainsi que du domaine variable VL (vert) et constant CL (bleu clair) de la chaîne légère. Chaque domaine variable contient trois CDR (complementarity determining region) qui permettent la reconnaissance spécifique de l'antigène (ronds rouges). La région Fc (fragment cristallisable) est constituée des domaines constants CH2 et CH3 de la chaîne lourde (bleu foncé). La glycosylation de l'asparagine en position 297 dans le domaine CH2 est représentée par les étoiles vertes. La structure tridimensionnelle de la région charnière est présentée dans l'encadré. La charnière, illustrée par la représentation en « ruban » en noir, débute par une glutamine en position 219 et se termine par la proline précédant le domaine CH2 (violet). Le début des domaines CH1 et CH2 sont également représentés (en bleu). L'alignement des séquences est présenté selon la notation EU. Les acides aminés impliqués dans l'interaction avec les RFcy et le C1q sont surlignés en jaune.

n'ont pas été développés à des fins thérapeutiques, essentiellement en raison de leur faible demi-vie (8 jours). Cependant, les IgG3 possèdent de très fortes capacités de recrutement des effecteurs de l'immunité et l'absence d'AcM de ce format en clinique reste discutable.

Bien que la séquence protéique de leurs chaînes lourdes soit très conservée (90 % d'homologie), chacune des sous-classes possède des capacités fonctionnelles propres résultant largement des différences localisées dans la région charnière (29 % d'homologie).

La région charnière : pivot des mécanismes de recrutement des effecteurs

La région charnière (*hinge* en anglais) est une région hydrophile longtemps considérée comme un simple lien flexible entre les régions Fab et la région Fc de l'immunoglobuline. Cependant, sa taille et sa composition protéique conditionnent la flexibilité générale des IgG ainsi que la fonctionnalité de l'anticorps de par ses interactions avec les effecteurs de l'immunité. Selon la sous-classe, la région charnière des IgG est codée par un exon (IgG1, IgG2 et IgG4) ou plusieurs (IgG3). Toutefois, la structure de la région charnière inclut une partie du domaine

CH2 de la chaîne lourde. En effet, au niveau protéique, le motif APEXX(G)GP (Figure 1), codé par l'exon du domaine CH2, possède une structure lâche et désorganisée similaire à celle de la charnière [1]. Ainsi, comme le suggère Burton *et al.*, nous définirons la région charnière en 3 sous-parties : la charnière haute qui débute au niveau du glutamate en position 219 (E219), en position C-terminale du domaine CH1, sachant que la position de ce glutamate peut être décalée de ± 2 unités selon l'AcM considéré ; la charnière centrale, riche en proline et cystéine, qui contient les ponts disulfures liant les deux chaînes lourdes ; et la charnière basse, qui s'étend jusqu'à la proline en position 241 pour les IgG1, 237 pour les IgG2, 288 pour les IgG3 et 238 pour les IgG4, précédant la partie N-terminale du premier brin β du domaine CH2 (Figure 1 et Tableau I).

La charnière basse

Cette charnière basse est composée d'une séquence d'acides aminés (AA) impliquée dans la liaison aux RFcy

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Nombre d'acides animés	23	19	70	20
Ponts disulfure (inter-chaînes lourdes)	2	4	11	2
Angle Fab-Fab en degré (moyenne $\pm$ SD)	117 $\pm$ 43	127 $\pm$ 32	136 $\pm$ 53	129 $\pm$ 39
Angle Fab-Fc en degré (moyenne $\pm$ SD)	107 $\pm$ 30	99 $\pm$ 32	86 $\pm$ 36	98 $\pm$ 25
Ratio dimère:tétramère ^a	0.83:1	0.35:1	8.4:1	0.48:1
Flexibilité	++	+	++++	+

Tableau 1. Caractéristiques de la région charnière des quatre sous-classes d'IgG humaines. ^a Le ratio dimère : tétramère représente la flexibilité de la charnière.

et au Clq (en jaune dans la *Figure 1*). Ces interactions asymétriques n'impliquent pas les mêmes AA de chacune des deux chaînes lourdes. La fixation aux RFc γ repose directement sur des liaisons avec les AA de la région charnière (*Figure 2A*). En revanche, bien que le Clq interagisse uniquement avec des AA du domaine CH2, la structure tridimensionnelle de la charnière, proche du site d'interaction, conditionne cette liaison (*Figure 2B*) [2]. Le rapprochement des régions Fc de plusieurs molécules d'anticorps, *via* des interactions au niveau de la zone d'interface CH2-CH3, est indispensable pour former une structure multimérique permettant la liaison efficace du Clq. L'hexamère d'Ig est ainsi la structure optimale pour l'ancrage des six têtes globulaires du Clq, alors que le trimère, et plus récemment le pentamère, ont été décrits comme les structures minimales pour la liaison du Clq et l'activation de la voie classique du complément [3]. Les substitutions présentes dans la séquence des IgG2 et IgG4 (*Figure 1*) sont associées à une diminution de leur interaction avec les RFc γ et le Clq [4,5], et à des activités de CDC, ADCP et ADCC faibles, voire nulles. L'ensemble de ces données montre que le choix de la charnière basse et/ou de la sous-classe d'IgG est un point clé dans le développement d'un AcM thérapeutique.

La charnière haute et centrale

Si la région basse de la charnière est nécessaire à l'activation des fonctions effectrices, elle n'est pas suffisante. Guddat *et al.* ont révélé, à l'aide de la cristallographie, qu'en l'absence des charnières haute et centrale, les régions Fab d'une IgG1 étaient très proches de la région Fc. Cet encombrement stérique empêche alors l'accès du Clq à son site de fixation, sans compromettre l'accessibilité à celui du RFc γ [6]. La charnière haute et centrale est constituée de 11 AA pour les IgG2 et les IgG4, 14 pour les IgG1, et 61 pour les IgG3. La taille que donne ce nombre d'AA joue un rôle prépondérant pour obtenir la distance suffisante entre les Fab et le Fc favorable au déclenchement des réponses effectrices. Il est important de noter que les acides aminés supplémentaires que présentent les IgG1 par rapport aux IgG2 et IgG4, favorisent le recrutement des effecteurs (*Figure 1*).

La structure protéique des charnières haute et centrale module la conformation spatiale des IgG. Plusieurs études de cristallographie et de dynamique moléculaire ont ainsi montré que les charnières haute et

centrale permettent la torsion, la flexion et l'extension des régions Fab, définissant ainsi la notion de flexibilité de la charnière des anticorps (*Figure 3*) [7]. Par une approche d'interaction entre anticorps et anticorps anti-idiotypique¹, Roux *et al.* ont montré la variabilité de cette flexibilité. Dans ce modèle, l'interaction entre des IgG1, par les régions Fab, entraîne la formation d'une grande quantité de dimères, démontrant la capacité de ces régions à adopter une conformation « fermée ». Au contraire, l'interaction entre des IgG2 génère une forte proportion de tétramères, la rigidité de la charnière de cette sous-classe ne permettant pas aux régions Fab d'adopter une conformation fermée. Un ratio important dimère/tétramère indiquera ainsi une flexibilité accrue de la charnière.

La flexibilité des sous-classes varie selon l'ordre suivant : IgG3>IgG1>IgG2=IgG4 ; la charnière des IgG3 conférant le plus de flexibilité aux régions Fab et Fc de par sa grande taille [8]. Bien que cette flexibilité soit associée à la capacité de chaque sous-classe à interagir avec les effecteurs de l'immunité, elle n'explique que partiellement leur activité. En fait, plus la structure de la charnière est flexible, plus la capacité à recruter les effecteurs de l'immunité est élevée [9]. La région charnière des IgG3, presque 4 fois plus longue que celle des IgG1, permettrait le meilleur recrutement des effecteurs immunitaires. Toutefois, la flexibilité des IgG1 permet d'offrir un angle optimal à la fixation des RFc γ et du Clq [10]. Les IgG2 possèdent une charnière courte et peu flexible. Cette rigidité s'explique par la conformation de cette sous-classe et par la présence de quatre ponts disulfures au sein de sa charnière centrale. Plusieurs appariements possibles entre les cystéines des chaînes lourdes et légères entraînent la formation d'isomères naturels de cette sous-classe dont la fonction reste à explorer [11].

¹ Un anticorps anti-idiotypique reconnaît le domaine variable d'un autre anticorps.

Figure 2. Zone d'interaction Fc-RFcγ et Fc-C1q. Vue générale du fragment Fc d'une IgG (code PDB : 1HZH) dont les domaines CH2 et CH3 sont représentés en bleu et la région charnière en noir. Les acides aminés de l'IgG (en bleu) et de la région charnière (en noir) impliqués dans cette interaction asymétrique avec le Rfγ (A) et le C1q (B) sont représentés par les sphères.

Les deux charnières centrales des IgG4, constituées de la séquence CPSC, possèdent la particularité de pouvoir se dissocier *in vivo* et générer des hémigG4. La présence d'une sérine à la place d'une proline en position 228 entraîne le rapprochement des cystéines d'une même chaîne conduisant à la formation de ponts disulfures intra-chaînes [12]. C'est le cas du natalizumab (Tysabri®, une IgG4 anti-intégrine $\alpha 4\beta 1$) qui, sous la forme d'hémigG, peut se réassocier avec une hémigG4 endogène et former un anticorps bispécifique indésirable [13]. Cette particularité résulte également de la présence d'une arginine en position 409, qui diminue les interactions entre domaines CH3. La courte charnière des IgG4 entraîne une faible flexibilité qui ne permet pas aux effecteurs immunitaires d'accéder à leur site de liaison sur l'immunoglobuline [14]. L'ensemble des caractéristiques que nous avons décrites font ainsi de la région charnière une région pivot pour la modulation de l'activité immunologique des AcM thérapeutiques. En modifiant la séquence ou le nombre de ponts disulfures de la région charnière d'un AcM, il est ainsi possible de modifier à façon ses propriétés.

L'ingénierie de la région charnière pour l'optimisation des fonctions effectrices

Les nombreux progrès en ingénierie moléculaire ont permis, par l'humanisation des AcM thérapeutiques, d'augmenter leur demi-vie, de réduire leur immunogénicité et d'accroître ainsi leur efficacité. Toutefois, au sein de la diversité des formats dérivés de la structure des IgG, les modifications de la région charnière représentent un point clé pour la modulation de leur fonctionnalité. Ainsi, la mutation S228P², en stabilisant la région charnière des IgG4 et, par conséquent, en inhibant la formation d'hémigG [15], a permis une avancée majeure dans le développement des AcM sous ce format. C'est le cas pour le nivolumab et le pembrolizumab utilisés chez les patients atteints de cancer, et de l'ixekizumab (Taltz®, IgG4 anti-IL(interleukine)17) dans le traitement du psoriasis [16]. L'introduction de cette mutation n'améliore cependant pas les fonctions effectrices de cette sous-classe, ce qui en fait la sous-classe de choix pour les AcM pour lesquels une fonction cytotoxique n'est pas recherchée. Il est à noter que la rigidité de la région

charnière des IgG4 ne permet pas une accessibilité optimale des régions Fab aux antigènes ciblés. Plusieurs laboratoires ont développé des AcM dont la structure est fondée sur celle d'une IgG1, mais dépourvue d'activité cytolytique. Il est ainsi possible de combiner les mouvements des régions Fab de cette sous-classe à des mutations de la région charnière, permettant d'éteindre les fonctions effectrices : une méthode que l'on appelle *Fc silencing*. Une première stratégie consiste à muter les acides aminés de la charnière basse directement impliqués dans l'interaction avec les effecteurs de l'immunité. Ainsi, la substitution L239A (Leucine239 en Alanine) et G241A (Glycine241 en Alanine), permet au védolizumab (Entyvio®, une IgG1 anti-intégrine $\alpha 4\beta 7$), utilisé dans des pathologies inflammatoires chroniques, d'empêcher l'accès des lymphocytes T mémoires au site inflammatoire mais les préserve de la lyse [17]. L'anifrolumab (une IgG1 anti-récepteur de l'IFN[interféron] α) est un autre exemple de *silencing* pour un AcM actuellement en phase III dans le traitement du lupus. Dans ce cas, il s'agit d'un triple mutant L234F/L235E/P331S³ qui permet d'abolir toutes les fonctions effectrices de l'immunoglobuline [18,19].

Les mutations réalisées au sein de la région charnière ont en majorité pour but d'abolir les fonctions effectrices. Toutefois, il est possible de potentialiser l'effet antagoniste d'un AcM par des mutations touchant la charnière haute. La rigidité de la structure ainsi obtenue limite les mouvements des régions Fab, empêchant la dimérisation de la cible à la surface de la cellule⁴ [20]. La mutation S219C (sérine219 remplacée par une cystéine) du rituximab (Mabthera®), une IgG1 anti-CD20, potentialise l'effet pro-apoptotique de l'AcM *in vitro* en restreignant les mouvements des régions Fab de l'anticorps. La charnière basse n'étant pas modifiée, le rituximab conserve sa capacité à activer les fonctions effectrices [21]. Ces récentes études précisent

² Sérine en position 228 remplacée par une proline.

³ Leucine234>phénylalanine ; leucine235>glutamate ; proline331>sérine.

⁴ WO2010064090: Process for the modulation of the antagonist activity of a monoclonal antibody.

l'importance de certains AA de la région charnière pour l'optimisation des AcM à usage thérapeutique.

La région charnière est également un élément clé pour la bioconjugaison des anticorps « armés » (*antibody drug-conjugated*, ADC). En effet, si le bras de conjugaison est couplé aux cystéines des ponts disulfures de l'AcM, sa structure générale pourra s'en trouver modifiée, inhibant ainsi les fonctions liées à sa région charnière. Cette région peut également être capitale dans la conception de nouveaux formats d'AcM. Wang *et al.* ont montré qu'un anticorps « triple tandem », c'est-à-dire possédant deux régions Fab et trois régions Fc reliées par une région charnière, présentait une meilleure CDC et une efficacité augmentée dans un modèle d'infection à *Klebsiella pneumoniae* [22]. Cette stratégie permet d'améliorer l'avidité de l'AcM pour les effecteurs de l'immunité en multipliant les sites d'interaction. L'ensemble des exemples que nous avons décrits montre ainsi l'intérêt majeur de considérer la région charnière comme une région clé pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques utilisant une région Fc.

Le clivage de la région charnière

Bien qu'il soit possible d'améliorer les capacités fonctionnelles d'un AcM en modifiant la région charnière, il est indispensable de préciser que cette région présente la particularité d'être sensible au clivage protéolytique. Historiquement, ce phénomène a permis l'obtention des fragments⁵ Fab et F(ab')₂ par l'utilisation respectivement de la papaine et de la pepsine [23,24]. Ces 2 protéases ont été d'une grande utilité pour caractériser et comprendre la structure des anticorps.

Implication du microenvironnement dans le clivage *in vivo*

Des études récentes ont montré que la région charnière des IgG était sensible au clivage par des protéases qui sont retrouvées dans le microenvironnement tumoral et/ou inflammatoire, telles que les métalloprotéinases matricielles (MMP3, MMP7, MMP12, MMP9) et la cathepsine G, ou encore dans des situations infectieuses (comme l'IdeS, pour *immunoglobulin-degrading enzyme of Streptococcus pyogenes* ou la glutamyl endopeptidase GluV8 de *Saphylococcus aureus*) [25]. Bien que ce phénomène ait été évalué *in vitro*, plusieurs études rapportent la détection d'IgG clivées dans des biopsies de tumeurs ainsi que dans le liquide synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde [26]. Les protéases présentes dans des biopsies issues de patients atteints de maladies inflammatoires intestinales sont d'ailleurs capables de cliver l'adalimumab (Humira®, IgG1 anti-TNF-α), l'infliximab (Remicade®, IgG1 anti-TNFα) et l'étanercept (Enbrel®, protéine de fusion TNFR-Fc) [27] ; l'étanercept, composé d'une région charnière et de la région Fc d'une IgG1, est plus facilement clivé par la MMP3 et la MMP12 que ces deux AcM anti-TNF-α. La structure de la molécule thérapeutique est donc un point clé dans ce mécanisme de clivage protéolytique puisque la nature de la charnière basse conditionne la susceptibilité au clivage.

Figure 3. Représentation schématique de la flexibilité des IgG. Les charnières haute et centrale sont responsables du mouvement des régions Fab. Ces dernières peuvent effectuer des mouvements « latéraux » (1), de « flexion » (2) ou de « torsion » (3). L'angle entre les 2 régions Fab module ainsi l'accessibilité aux antigènes dans différents plans de l'espace. Ces mouvements de « flexion » (2) facilitent également l'accès aux effecteurs immunitaires. Enfin, la fixation des régions Fab à des antigènes plus ou moins éloignés est possible par des mécanismes de « rétractation » ou « d'étirement » de la charnière haute (4). La charnière basse module la flexibilité de la région Fc par des « mouvements latéraux » (5) ou par « flexion » (6) facilitant ainsi l'interaction avec les effecteurs de l'immunité.

Cinétique de clivage

Pour la plupart, les protéases décrites clivent séquentiellement la charnière basse des IgG au niveau de sites spécifiques conservés entre les sous-classes (Figure 4). Un premier clivage rapide de l'une des deux chaînes lourdes entraîne la formation d'IgG simple clivée (sclgG). Le clivage de la seconde chaîne lourde, plus lent, produit un fragment F(ab')₂ et libère le fragment Fc. Bien que l'hypothèse n'ait pas été vérifiée, il est postulé que le premier clivage modifie la conformation des sclgG, limitant la vitesse du second clivage [28]. La cinétique de clivage est propre à chacune des protéases. Pour une même IgG1, le clivage par l'IdeS s'effectue en quelques minutes tandis que celui réalisé par la MMP3 et la MMP12 nécessite plusieurs heures [25,26]. La cinétique de clivage des IgG2 par l'IdeS est plus lente [29] et les substitutions d'AA au sein de la charnière de cette sous-classe (Figure 1) la rendent complètement résistante au clivage par les MMP, au contraire des IgG1 et IgG4. Finalement, la structure de la molécule thérapeutique (IgG versus protéine de fusion) ainsi que la composition de la région charnière sont

⁵ Le fragment F(ab')₂ est constitué de deux Fab liés par deux ponts disulfures.

Figure 4. Clivage de la charnière basse des trois sous-classes d'IgG présentes sur le marché. Les sites de clivages spécifiques de la MMP (matrix metalloproteinase) 3 et de la MMP12 (vert), de la cathepsine G (gris), de la pepsine et de MMP7 (bleu) ainsi que d'IdeS (jaune) sont représentés sur la gauche. Le clivage séquentiel des deux chaînes lourdes est représenté à droite. Le clivage d'une des deux chaînes lourdes génère des IgG simples clivées (scIgG). Le clivage de la seconde forme un fragment F(ab')₂ et un fragment Fc.

les seuls paramètres connus capables d'influencer la susceptibilité au clivage protéolytique.

Le clivage se situant dans la région charnière basse a des conséquences fonctionnelles très importantes. Il est évident que la génération de fragments F(ab')₂ d'un AcM entraîne une perte des fonctions effectrices reposant sur la région Fc et une élimination rapide de l'anticorps, qui n'est plus pris en charge par le FcRn. Pour les scIgG, en revanche, les interactions des glycanes des deux chaînes lourdes ainsi que celles des domaines CH3 permettent de conserver la structure de l'IgG (c'est-à-dire avec une région Fc complète) [25], et leur fixation au FcRn n'est pas altérée. La demi-vie *in vivo* des scAcM est ainsi comparable à celle des AcM intacts [25].

Mécanismes d'échappement aux thérapies dépendantes d'une région Fc

Le simple clivage d'un anticorps anti-CD20 entraîne une inhibition de son interaction avec les RFcγIIa, les RFcγIIIa, alors que l'interaction avec le RFcγI est peu diminuée. Les fonctions effectrices associées telles que l'ADCC ou la CDC ne sont également plus activées efficacement lorsque les effecteurs immunitaires sont stimulés par le sc-trastuzumab ou le sc-pertuzumab (Perjeta®, IgG1 anti-HER2/neu), les formes scIgG des AcM [30]. De même, Fan *et al.* ont montré que le sc-trastuzumab est incapable d'éliminer efficacement les cellules tumorales HER2/Neu⁺ chez des souris xénotransplantées [31]. Le clivage des AcM entraîne donc des conséquences fonctionnelles favorisant l'échappement au traitement par les anticorps.

Si le clivage de la charnière basse semble capital lorsqu'il s'agit des fonctions effectrices reposant sur la région Fc, il ne faut toutefois pas négliger le clivage de la charnière haute des IgG par plusieurs protéases, telles que l'élastase humaine qui est sécrétée par les neutrophiles. Ce type de clivage devient problématique lors du développe-

ment d'un anticorps bispécifique qui perdrait une des 2 régions Fab suite à la coupure protéique. Le mécanisme premier de ce type d'anticorps serait alors aboli.

Des modifications de la charnière basse peuvent être envisagées pour contrer ce phénomène protéolytique. Ainsi, une étude a récemment montré que la substitution des résidus ELLG de la charnière basse d'une IgG1 par les résidus PVA de la charnière basse d'une IgG2 permettait de rendre un AcM anti-CD20 résistant au clivage par la MMP3 et la MMP12 (Figure 1). Il a néanmoins été nécessaire d'introduire les mutations S239D et I332E afin de restaurer les fonctions effectrices de l'AcM [32]. Cette approche représente un premier pas vers l'élaboration d'anticorps résistant au clivage protéolytique.

Détection du clivage des IgG endogènes

Le clivage des IgG engendre des néoépitopes, dès la forme scIgG, qui sont à l'origine de la production d'anticorps anti-charnière (AHA ou *anti-hinge antibody*). Ces AHA sont spécifiques des AA C-terminaux du site de clivage mais ne reconnaissent pas la région charnière d'IgG non clivée [33]. Physiologiquement, ces AHA soulèvent de nombreuses questions, puisqu'une étude rapporte qu'ils sont détectables chez 70 % des sujets sains [34]. Leur présence suggère donc que le clivage des IgG se réalise *in vivo*, dans la population générale. *In vitro*, ces AHA peuvent restaurer indirectement les fonctions d'ADCC et de CDC à des scIgG et des fragments F(ab')₂, en procurant une région Fc fonctionnelle aux molécules clivées une fois fixées à celles-ci [35]. Si l'importance clinique de ces AHA reste à explorer, leur spécificité

permet de les utiliser comme outils. Par une approche d'immunisation peptidique, Ryan *et al.* ont en effet développé des AHA dirigés contre les sites de clivages de la MMP3, de la cathepsine G et d'IdeS [26]. Cette stratégie reste néanmoins discutable puisqu'elle utilise des peptides linéaires excluant ainsi la reconnaissance d'épitopes conformationnels.

Marqueur de pronostic clinique chez les patients

L'utilisation d'AHA a permis de montrer qu'une augmentation de scIgG dans le tissu tumoral chez des patientes présentant un cancer du sein était associée à une évolution clinique péjorative, en particulier à la présence de métastases dans les ganglions axillaires drainants [36]. Biancheri *et al.* ont montré qu'un niveau élevé de scIgG dans le sérum de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin est également associé à une mauvaise réponse clinique à des traitements par des anticorps anti-TNF- α [27].

Le clivage des AcM thérapeutiques *in vivo* apparaît donc possible. Si la présence des scIgG a pu être détectée *ex vivo*, la proportion des formes clivées des AcM thérapeutiques chez les patients traités n'a pas été évaluée à ce jour. Au vu des conséquences fonctionnelles du clivage, qui n'influencent cependant pas la fixation au FcRn, il paraît nécessaire de développer des méthodes de quantification de ces formes clivées chez le patient. Finalement, évaluer la quantité de formes clivées d'AcM circulantes permettrait d'améliorer les modèles pharmacocinétiques et d'adapter les doses d'anticorps dans la prise en charge des patients.

Application de la susceptibilité au clivage de la région charnière à la réduction de la pathogénicité d'(auto-)anticorps

En clinique, il est possible de tirer profit du mécanisme de clivage des anticorps dans le cas où le traitement repose sur l'élimination d'anticorps pathogènes. Dans un modèle animal du syndrome de Guillain-Barré impliquant des anticorps pathogènes développé chez le lapin, il a en effet été montré que la survie des animaux traités par l'IdeS de *Streptococcus pyogenes* (qui clive les anticorps) était augmentée en comparaison de celle de lapins contrôles [37]. L'utilisation de protéases est donc envisageable dans des maladies nécessitant une élimination rapide des anticorps responsables de la pathologie. Une étude a ainsi récemment montré que l'utilisation d'IdeS (Imfilidase®) était bénéfique dans l'élimination des anticorps anti-Human Leukocyte Antigen (HLA) (*donor specific antibody* ou DSA) pour la prévention du rejet de greffe rénale induite par ces anticorps [38,39]. Le clivage des anticorps pathogènes par l'IdeS semble également être une piste prometteuse dans le traitement des thrombocytopénies induites par l'héparine [40].

Conclusion

L'utilisation des AcM et des protéines de fusion pour le traitement de cancers et de maladies inflammatoires chroniques est aujourd'hui en plein essor. Une grande proportion de ces biomédicaments a la particularité d'être pourvue d'une région Fc capable d'interagir, *via* la charnière basse et le domaine CH2, avec les effecteurs de l'immunité.

Les progrès en ingénierie moléculaire ont permis de générer des formats d'AcM adaptés à des pathologies données. Les modifications apportées, plus particulièrement au niveau de la charnière basse, ont permis de moduler l'efficacité de ces molécules thérapeutiques. La compréhension de la relation structure/fonction des charnières haute et centrale reste cependant à approfondir. Parmi ces nombreuses innovations, la problématique du mécanisme de clivage protéolytique concerne l'ensemble des formats. De nouvelles modifications de la région charnière semblent nécessaires afin de rendre les formats d'AcM résistants à la protéolyse *in vivo*. Les conséquences fonctionnelles de ce phénomène rendent également compte de la nécessité de développer des outils permettant leur quantification *in vivo* chez les patients afin de déterminer si les formes clivées représentent des marqueurs d'intérêt en clinique humaine. Dans l'affirmative, cette approche théranostique permettrait d'améliorer la prise en charge des patients traités par ces biomédicaments. ♦

SUMMARY

The hinge region of therapeutic antibodies: major importance of a short sequence

The hinge region is a short sequence of the heavy chains (H) of antibodies linking the Fab (*Fragment antigen binding*) region to the Fc (*Fragment crystallisable*) region. The functional properties of the four IgG subclasses partly result from the sequence differences of their hinge regions as some amino acids of the lower hinge region are located within or in the close vicinity of the C1q and Fc γ R binding sites on the IgG H chains. In addition, the hinge is susceptible to proteolytic cleavage by many proteases present in tumor and/or inflammatory microenvironment capable of affecting functional responses. Thus, an optimal format of the hinge region remains a major challenge for the development of new therapeutic antibodies. ♦

REMERCIEMENTS

Q. Deuve est financé par l'agence nationale de la recherche dans le cadre du programme Investissements d'avenir (n° ANR-10-LABX-53-01).

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Burton DR. Immunoglobulin G: functional sites. *Mol Immunol* 1985 ; 22 : 161-206.
2. Ugurlar D, Howes SC, Kreuk BJ de, *et al.* Structures of C1-IgG1 provide insights into how danger pattern recognition activates complement. *Science* 2018 ; 359 : 794-7.

RÉFÉRENCES

3. Strasser J, De Jong RN, Beurskens FJ, *et al.* Unraveling the macromolecular pathways of IgG oligomerization and complement activation on antigenic surfaces. *Nano Lett* 2019 ; 19 : 4787-96.
4. Bindon CI. Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *J Exp Med* 1988 ; 168 : 127-42.
5. Morgan A, Jones ND, Nesbitt AM, *et al.* The N-terminal end of the CH2 domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for C1q, Fc gamma RI and Fc gamma RIII binding. *Immunology* 1995 ; 86 : 319-24.
6. Guddat LW, Herron JN, Edmundson AB. Three-dimensional structure of a human immunoglobulin with a hinge deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 4271-75.
7. Saphire EO, Stanfield RL, Max Crispin MD, *et al.* Contrasting IgG structures reveal extreme asymmetry and flexibility. *J Mol Biol* 2002 ; 319 : 9-18.
8. Roux KH, Strelets L, Michaelsen TE. Flexibility of human IgG subclasses. *J Immunol* 1997 ; 159 : 3372-82.
9. Bruhns P, Iannascoli B, England P, *et al.* Specificity and affinity of human Fc receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 2009 ; 113 : 3716-25.
10. Rayner LE, Hui GK, Gor J, *et al.* The solution structures of two human IgG1 antibodies show conformational stability and accommodate their C1q and FcγR ligands. *J Biol Chem* 2015 ; 290 : 8420-38.
11. Dillon TM, Ricci MS, Vezina C, *et al.* Structural and functional characterization of disulfide isoforms of the human IgG2 subclass. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 16206-15.
12. Rispens T, Ooijsaar-de Heer P, Bende O, *et al.* Mechanism of immunoglobulin G4 Fab-arm exchange. *J Am Chem Soc* 2011 ; 133 : 10302-11.
13. Labrijn AF, Buijsse AO, Bremer ETJ van den, *et al.* Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo. *Nat Biotechnol* 2009 ; 27 : 767-71.
14. Rayner LE, Hui GK, Gor J, *et al.* The Fab conformations in the solution structure of human immunoglobulin G4 (IgG4) restrict access to its Fc region: Implications for functional activity. *J Biol Chem* 2014 ; 289 : 20740-56.
15. Bloom JW, Madanat MS, Marriott D, *et al.* Intrachain disulfide bond in the core hinge region of human IgG4. *Protein Sci* 2008 ; 6 : 407-15.
16. Liu L, Lu J, Allan BW, *et al.* Generation and characterization of ixekizumab, a humanized monoclonal antibody that neutralizes interleukin-17A. *J Inflamm Res* 2016 ; 9 h39-50.
17. Wyant T, Yang L, Fedyk E. In vitro assessment of the effects of vedolizumab binding on peripheral blood lymphocytes. *mAbs* 2013 ; 5 : 842-50.
18. Peng L, Oganessian V, Wu H, *et al.* Molecular basis for antagonistic activity of anifrolumab, an anti-interferon-α receptor 1 antibody. *mAbs* 2015 ; 7 : 428-39.
19. Riggs JM, Hanna RN, Rajan B, *et al.* Characterisation of anifrolumab, a fully human anti-interferon receptor antagonist antibody for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Lupus Sci Med* 2018 ; 5 : e000261.
20. Gonzalez A, Broussas M, Beau-Larvor C, *et al.* A novel antagonist anti-cMet antibody with antitumor activities targeting both ligand-dependent and ligand-independent c-Met receptors: A full antagonist anti-c-Met MAb with in vivo activity. *Int J Cancer* 2016 ; 139 : 1851-63.
21. Könitzer JD, Sieron A, Wacker A, *et al.* Reformulating Rituximab into human IgG2 and IgG4 isotypes dramatically improves apoptosis induction in vitro. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0145633.
22. Wang Q, Chen Y, Pelletier M, *et al.* Enhancement of antibody functions through Fc multiplications. *mAbs* 2017 ; 9 : 393-403.
23. Porter RR. The hydrolysis of rabbit γ-globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J* 1959 ; 73 : 119-26.
24. Nisonoff A, Wissler FC, Lipman LN. Properties of the major component of a peptic digest of rabbit antibody. *Science* 1960 ; 132 : 1770-1.
25. Brezski RJ, Vafa O, Petrone D, *et al.* Tumor-associated and microbial proteases compromise host IgG effector functions by a single cleavage proximal to the hinge. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 17864-69.
26. Ryan MH, Petrone D, Nemeth JF, *et al.* Proteolysis of purified IgGs by human and bacterial enzymes in vitro and the detection of specific proteolytic fragments of endogenous IgG in rheumatoid synovial fluid. *Mol Immunol* 2008 ; 45 : 1837-46.
27. Biancheri P, Brezski RJ, Di Sabatino A, *et al.* Proteolytic cleavage and loss of function of biologic agents that neutralize tumor necrosis factor in the mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2015 ; 149 : 1564-74.
28. Brezski RJ, Jordan RE. Cleavage of IgGs by proteases associated with invasive diseases. *mAbs* 2010 ; 2 : 212-20.
29. Brezski RJ, Oberholtzer A, Strake B, *et al.* The in vitro resistance of IgG2 to proteolytic attack concurs with a comparative paucity of autoantibodies against peptide analogs of the IgG2 hinge. *mAbs* 2011 ; 3 : 558-67.
30. Hsiao HC, Fan X, Jordan RE, *et al.* Proteolytic single hinge cleavage of pertuzumab impairs its Fc effector function and antitumor activity in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res* 2018 ; 20 h43.
31. Fan X, Brezski RJ, Fa M, *et al.* A single proteolytic cleavage within the lower hinge of trastuzumab reduces immune effector function and in vivo efficacy. *Breast Cancer Res* 2012 ; 14 : R116.
32. Kinder M, Greenplate AR, Grugan KD, *et al.* Engineered protease-resistant antibodies with selectable cell-killing functions. *J Biol Chem* 2013 ; 288 : 30843-54.
33. Brezski RJ, Luongo JL, Petrone D, *et al.* Human anti-IgG1 hinge autoantibodies reconstitute the effector functions of proteolytically inactivated IgGs. *J Immunol* 2008 ; 181 : 3183-92.
34. Falkenburg WJ, Schaardenburg D van, Ooijsaar-de Heer P, *et al.* Anti-hinge antibodies recognize IgG subclass- and protease-restricted neopeptides. *J Immunol* 2017 ; 198 : 82-93.
35. Fan X, Brezski RJ, Deng H, *et al.* A novel therapeutic strategy to rescue the immune effector function of proteolytically inactivated cancer therapeutic antibodies. *Mol Cancer Ther* 2015 ; 14 : 681-91.
36. Zhang N, Deng H, Fan X, *et al.* Dysfunctional antibodies in the tumor microenvironment associate with impaired anticancer immunity. *Clin Cancer Res* 2015 ; 21 : 5380-90.
37. Wang Y, Shi Q, Lv H, *et al.* IgG-degrading enzyme of *Streptococcus pyogenes* (IdeS) prevents disease progression and facilitates improvement in a rabbit model of Guillain-Barré syndrome. *Exp Neurol* 2017 ; 291 : 134-40.
38. Jordan SC, Lorant T, Choi J, *et al.* IgG Endopeptidase in highly sensitized patients undergoing transplantation. *N Engl J Med* 2017 ; 377 : 442-53.
39. Lonze BE, Tatapudi VS, Weldon EP, *et al.* IdeS (Imlifidase): A novel agent that cleaves human IgG and permits successful kidney transplantation across high-strength donor-specific antibody. *Ann Surg* 2018 ; 268 : 488-96.
40. Kizlik-Masson C, Deveuve Q, Zhou Y, *et al.* Cleavage of anti-PF4/heparin IgG by a bacterial protease and potential benefit in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2019 ; 133 : 2427-35.

TIRÉS À PART

L. Lajoie

**Avec m/s, vivez en direct
les progrès et débats
de la biologie et de la médecine**

**CHAQUE MOIS / AVEC LES ARTICLES DE RÉFÉRENCE DE M/S
CHAQUE JOUR / SUR WWW.MEDECINESCIENCES.ORG**

Abonnez-vous sur

www.medecinesciences.org