

Immunologie / Immunology

Anticorps monoclonaux : tours et détours technologiques pour de nouveaux espoirs thérapeutiques

Dominique Bourel^a, Jean-Luc Teillaud^{b,*}

^a *Département Recherche, Laboratoire français du fractionnement et des biotechnologies, 3, av. des Tropiques, BP 305, Les Ulis, 91958 Courtabœuf, France*

^b *Inserm U 255, IFR des Cordeliers, universités Paris-5 et Paris-6, 15, rue de l'École-de-Médecine, 75270 Paris cedex 06, France*

Reçu le 2 janvier 2006 ; accepté après révision le 4 janvier 2006

Disponible sur Internet le 29 mars 2006

Présenté par Roger Monier

Résumé

L'ingénierie des anticorps monoclonaux, désormais utilisés en clinique humaine, a permis de développer une nouvelle génération d'anticorps, dont les propriétés fonctionnelles ont été optimisées. Ces anticorps vont certainement permettre des avancées significatives dans le traitement de pathologies pour lesquelles l'arsenal thérapeutique est limité. Cependant, le coût actuel des traitements par les AcM nécessite de nouvelles avancées dans le domaine de la production et de la purification et pose la question des molécules biosimilaires. La présente revue décrit quelques aspects de ces challenges technologiques passés et présents. **Pour citer cet article : D. Bourel, J.-L. Teillaud, C. R. Biologies 329 (2006).**

© 2006 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Monoclonal antibodies: Technology around the clock for new therapeutic hopes. Engineering monoclonal antibodies, now widely used in the clinic, has made it possible to develop a new generation of antibodies with optimized functional properties. These antibodies should allow a significant improvement of the treatment of diseases where only few drugs are available, if any. However, the cost of treatments with monoclonal antibodies requires further improvements in production and purification technologies, and raises the question of generic antibodies. The present review summarizes some of the technological past and present challenges in the field. **To cite this article: D. Bourel, J.-L. Teillaud, C. R. Biologies 329 (2006).**

© 2006 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots-clés : Anticorps monoclonal ; Anticorps chimérique ; Anticorps humanisé ; Banque de phages ; Optimisation d'anticorps ; Récepteurs Fc ; Production d'anticorps

Keywords: Monoclonal antibody; Chimeric antibody; Humanized antibody; Phage display; Antibody optimization; Fc receptor; Antibody production

Abridged English version

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : jean-luc.teillaud@u255.bhdc.jussieu.fr
(J.-L. Teillaud).

Since their discovery by Köhler and Milstein thirty years ago, monoclonal antibodies (mAbs) have been in-

tensively engineered to optimize their functional properties, to reduce their immunogenicity and to increase their clinical efficacy. Because the vast majority of mAbs in the early 1980s was of rodent origin, human anti-mouse antibodies (HAMAs) were induced when mAbs were infused to patients. Such HAMAs hamper the therapeutic efficacy of mAbs and provoke side effects related to the formation of immune complexes. In addition, the effector functions and the pharmacokinetic properties of mouse antibodies are markedly lowered in humans. Moreover, binding of murine IgG mAbs to the human neonatal FcRn, which rescues IgG from degradation and, hence, increases their serum half-life, is also weaker. Thus, many efforts have been devoted to generate human antibodies using both cellular and molecular engineering.

No technology was available in the late 1970s to generate fully human antibodies, except the infection of human B lymphocytes by the Epstein–Barr virus (EBV), which allowed the generation of immortalized B cells producing mAbs. However, this method has been limited by formidable problems such as the selection of antibodies with the desired antigen specificity, cell-line stability and the limited amount of antibodies produced for a therapeutic use. Other approaches based on cellular engineering (such as optimized fusion partners or long-term growth of human B lymphocytes) were shown to be poorly efficient or difficult to set up. Thus, molecular engineering of mAbs rapidly developed in the early 1980s and has been the leading force for antibody engineering since then, although cellular engineering has made recently a remarkable comeback: the transformation of memory B cells by EBV from virus-infected patients and their stimulation with CpG (which triggers TLR9-mediated B-cell proliferation) allow the generation of a large number of EBV-transformed cell lines that produce high-affinity specific IgG mAbs.

The development of molecular engineering techniques based on a better knowledge of immunoglobulin gene organization and of immunoglobulin 3-D structure allowed the engineering of chimeric antibodies and humanized antibodies. Chimeric antibodies comprise the variable domains derived from rodent mAbs fused to the constant domains of human heavy and light chains. Five chimeric mAbs are on the market. Humanized antibodies are obtained by grafting complementarity-determining regions (CDRs) derived from murine antibodies with desired specificity onto carefully chosen human VH and VL frameworks (FRs). The human FRs are selected on the basis of structural models of the variable domains of the mouse parental antibodies. However, the humanization technology does not work for each mouse

antibody, as a strong decrease in antibody affinity or a loss of antigen binding of the resulting humanized variable domains can be observed in some cases. Nevertheless, this approach has proved to be powerful, as seven humanized mAbs are currently on the market. An elegant technique for generating fully human antibodies has been the adaptation of the filamentous phage display technique to the expression of antibody fragments. It allowed the establishment of large combinatorial libraries of human VH and VL and made it possible to select for specific Fab' or single-chain Fv (scFv) fragments that are then used to build a whole recombinant human mAb. Last, techniques that allow gene inactivation and insertion of large human DNA fragments from yeast artificial chromosome in mouse germline have made it possible to generate transgenic mice capable of producing fully human antibodies following immunization. An alternative to this approach is the generation of double trans-chromosomal (Tc) mice that harbor two individual 'mini-chromosomes', containing the complete germline loci of immunoglobulin heavy and κ -light chains. Such mice can mount an antigen-specific human antibody response following immunization, and human antigen-specific mAbs can be generated. Two antibodies obtained from phage-display libraries and from humanized mice are on the market and several others are currently being tested in clinical trials. Although only two of the 18 mAbs currently approved and marketed are fully human antibodies, about 20% of the 150 mAbs currently in clinical development are human antibodies derived either from phage-display libraries or from transgenic mice.

Monoclonal antibodies elicit effector functions following interactions between their Fc region and different Fc receptors (FcRs), as well as with C1q. Most therapeutic mAbs are human IgG1 or have Fc region derived from this isotype, which can efficiently interact with Fc γ Rs. Among Fc γ Rs, the activating Fc γ Rs (Fc γ RI, Fc γ RIIA and Fc γ RIII) induce ADCC, endocytosis of immune complexes followed by antigen presentation, phagocytosis, and/or release of cytokines. The inhibitory Fc γ RIIB regulates immune responses by inhibiting the activation of B lymphocytes, monocytes, mast cells and basophils, induced through activating receptors. Thus, engineering the Fc region of IgG mAbs to improve effector functions is now a major goal. Alteration of residues in the Fc region improves the binding to activating Fc γ R. Some of the mAbs currently developed have been mutated so that the cellular toxicity triggered by Fc γ Rs engagement is strongly increased. Another approach to increase the biological activity of IgG is to engineer the glycosylation pattern of the Fc re-

gion. An IgG molecule contains an oligosaccharide covalently attached at the conserved Asn297 of each of the CH2 domains in the Fc region. The IgG glycosylation is essential for effector functions of the molecule. Variations of IgG glycosylation patterns include attachment of terminal sialic acid, a third *N*-acetylglucosamine arm (bisecting GlcNac), terminal galactosylation and core fucosylation. Engineering IgG glycoforms may lead to an optimized FcγRIII-dependent ADCC. Several studies have focused on the role of bisecting GlcNac in binding to FcγRIII and ADCC. Other studies have also shown that non-fucosylated oligosaccharides play a critical role in enhancing ADCC. Thus, current studies try to engineer cell lines to produce recombinant IgG with a well-defined pattern of glycosylation in their Fc region.

Over the last decade, therapeutic antibodies have moved to the forefront of protein drug development, and the coming years will see a new wave of recombinant molecules in a number of indications where efficient drugs are not available. However, therapeutic antibodies still face important challenges. Firstly, examination of the clinical responses shows that only a low percentage of patients exhibits long-lasting complete responses to treatments, particularly in cancer. One can expect that the simultaneous use of therapeutic mAbs that target different cell surface receptors or epitopes of the same receptor, or that target tumor-associated antigens and molecules involved in neo-angiogenesis, might allow to obtain more long-term clinical improvement. Secondly, severe side effects, such as the appearance of tuberculosis or lymphomas, the worsening of heart failure, and increased cardiocytotoxicity when combined with anthracyclin-based chemotherapy, have been described for some mAbs. Thus, there is still a need to enhance the efficacy of these recombinant products and to lower the side effects that are observed. It may be achieved by more molecular engineering to improve the affinity and/or the avidity for the target molecule. In parallel, molecular design of the Fc region will help to recruit either the activating or the inhibitory FcγRs depending of the disorder being targeted or abolishing the binding to these receptors while optimizing the binding to FcRn.

Finally, one has to point out that one of the most challenging problems of therapeutic mAbs is due to their success, the production at low costs of bulk quantities required for trials and treatments of large cohorts of patients. The generation of new production technologies (yeast, plantibodies, transgenic animals) is clearly an urgent need.

1. Introduction

C'est en 1975 que César Milstein et Georges Köhler ont publié dans la revue britannique *Nature* un article de trois pages démontrant qu'il était possible d'obtenir des cellules hybrides, ou hybridomes, produisant des anticorps de spécificité prédéfinie, cellules pouvant se cloner et se cultiver *in vitro* : les anticorps monoclonaux (AcM) étaient nés [1]. Directement issue de travaux des années 1960 portant sur la fusion cellulaire et la synthèse de l'ADN, menés notamment par Georges Barski, Boris Ephrussi et John Littlefield, la technique de production des AcM par fusion cellulaire avec des cellules de myélome de lymphocytes B provenant de souris immunisées fut initialement mise au point pour répondre à des questions d'immunologie fondamentale. En effet, les règles gouvernant l'expression, la synthèse et l'association des chaînes lourdes (H) et légères (L) des anticorps dans les lymphocytes B, ainsi que les relations existant entre spécificité et association H/L étaient alors mal définies, ce qui conduisit divers immunologistes à rechercher de nouveaux outils cellulaires permettant d'explorer ces différentes questions.

De telles cellules hybrides se multiplient indéfiniment en donnant naissance à des populations de cellules filles identiques entre elles et en fabriquant les anticorps que les lymphocytes B provenant des animaux immunisés produisaient. Chaque clone de cellules filles produit le même anticorps, qui est dit « monoclonal », un phénomène fondé sur le fait qu'un lymphocyte B ne produit qu'un seul type d'anticorps ayant une spécificité donnée. On dispose alors d'une source illimitée de cellules produisant, au moins en théorie, toujours le même anticorps ayant la même affinité et les mêmes propriétés physico-chimiques.

La découverte des AcM suscita immédiatement de nombreux espoirs thérapeutiques. Cependant, alors que des avancées considérables dans le domaine de la recherche fondamentale et dans celui du diagnostique furent faites rapidement, d'importants problèmes surgirent lorsque l'utilisation des AcM chez des patients fut envisagée. Outre la question de l'obtention d'anticorps de haute affinité dirigée contre des cibles spécifiques pertinentes, deux problèmes liés à l'utilisation itérative d'un anticorps de souris ou de rat chez l'homme apparurent rapidement : (i) présence d'anticorps humains anti-anticorps de souris (« HAMA », pour *Human Anti-Mouse Antibody*), conduisant à une diminution d'efficacité et à des effets secondaires indésirables dus à la formation de complexes immuns ; (ii) propriétés effec-trices des anticorps de souris injectés médiocres (malgré l'absence d'une barrière d'espèce au sens strict) :

les AcM se fixent notamment par leur partie constante (Fc) aux récepteurs pour la région Fc (RfC) présents à la surface de cellules du système immunitaire, induisant des mécanismes effecteurs comme la capture de complexes immuns et la cytotoxicité dépendante d'anticorps (« ADCC », pour *Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity*). Cette fixation est diminuée lorsque des anticorps de type IgG de souris sont utilisés, conduisant à une activation plus faible des cellules effectrices humaines [2].

2. Ingénierie cellulaire des anticorps monoclonaux

Ces problèmes ont conduit à la fin des années 1970 à l'élaboration de techniques cellulaires de manipulation des hybridomes *in vitro*, ainsi qu'au développement de techniques cellulaires d'obtention d'anticorps humains. Les manipulations *in vitro* d'hybridomes ont visé à obtenir des anticorps de meilleure affinité, ainsi que, suivant leur utilisation thérapeutique potentielle, des anticorps ayant des propriétés effectrices modifiées, comme l'absence de fixation aux RfC γ ou au C1q, première étape de l'activation de la voie classique du complément, qui aboutit à la lyse des cellules cibles. Ces manipulations ont reposé sur l'instabilité intrinsèque des hybridomes producteurs d'anticorps [3] : mutations somatiques dans les séquences V, D, et J des gènes des régions variables [4], délétions affectant les séquences d'ADN codant les régions constantes, commutation de classe au cours de laquelle la région VDJ associée à la séquence codant la région constante μ , se recombine avec la séquence d'ADN codant la région constante de l'une des chaînes γ [5]. Plus récemment, une approche pour isoler des anticorps recombinants mutants de haute affinité a consisté à utiliser des lignées cellulaires préalablement sélectionnées pour leur capacité à induire un taux élevé de mutations somatiques dans les domaines variables d'immunoglobuline, couplée à un criblage des anticorps mutés de haute affinité en utilisant des doses très faibles d'antigène [6].

Parallèlement, de nombreux laboratoires ont essayé de générer des AcM humains. Des hybridations de lymphocytes humains avec des cellules de myélome ont été tentées avec un succès relatif [7]. L'immortalisation de lymphocytes B humains avec le virus d'Epstein-Barr (EBV) pour générer des lignées EBV [8] suivie de la fusion de ces lignées avec des cellules de myélome ont permis l'obtention de cellules relativement stables productrices d'AcM humains [9], comme des AcM anti-D, anti-toxine tétanique (TT) et anti-VIH. Cependant, la palette restreinte d'antigènes contre lesquels il est possible d'espérer d'obtenir des anticorps avec ces

approches, l'affinité souvent médiocre de tels anticorps, la difficulté de clonage et l'instabilité des cellules productrices, ont rendu impossible une production à une échelle industrielle. Les années 1980 ont alors vu une nouvelle vague de recherche d'ingénierie cellulaire : utilisation de partenaires de fusion optimisés [10,11], immunisation *in vitro* [12], croissance à long terme de lymphocytes B humains normaux [13]. D'autres techniques, difficiles à mettre en œuvre et de faible efficacité, ont été également développées, comme l'injection de lymphocytes humains à des souris SCID (*Severe Combined ImmunoDeficiency*), permettant une expansion *in vivo* de lymphocytes B humains, qui peuvent être stimulés ultérieurement par injection d'un antigène à ces souris. Malgré ces efforts, aucune technique d'ingénierie cellulaire fiable, reproductible, facile d'emploi, n'a été mise en place dans les années 1980 et 1990 pour obtenir des anticorps humains. Cependant, l'ingénierie cellulaire a peut-être récemment retrouvé une place de choix dans les stratégies d'obtention d'AcM humains. La transformation par l'EBV de lymphocytes B mémoires CD22⁺ IgM⁻, IgD⁻, IgA⁻ isolés à partir de patients infectés et victimes du SRAS, suivie de leur stimulation *in vitro* par des motifs CpG (stimulant la prolifération des lymphocytes B par l'intermédiaire des récepteurs Toll-like 9, TLR9) a ainsi récemment permis d'isoler un grand nombre de lignées EBV productrices d'anticorps anti-coronavirus de forte affinité [14]. Par ailleurs, la possibilité de reconstituer des souris immunodéficientes (Rag2^{-/-} γ c^{-/-}) avec des cellules du système immunitaire d'origine humaine par injection intra-hépatique de cellules CD34⁺ du sang de cordon a ouvert la voie à la génération d'anticorps humains après immunisation de ces souris, comme le suggère l'apparition d'une réponse de type IgG, après immunisation avec l'anatoxine tétanique [15].

3. Ingénierie moléculaire des anticorps monoclonaux

La manipulation des AcM par génie génétique a commencé au début des années 1980. Cela a permis l'émergence sur le marché d'anticorps thérapeutiques chimériques, puis humanisés et, enfin, totalement humains (Tableau 1). Quatre stratégies principales d'ingénierie moléculaire ont été mises en œuvre :

- la construction d'anticorps chimériques [16], qui consiste à isoler l'ADN codant pour le domaine VH et le domaine VL d'un AcM murin et à le lier à l'ADN codant les domaines constants H et L d'une immunoglobuline humaine. Cela permet

Tableau 1
Anticorps monoclonaux à usage thérapeutique

| Anticorps | Nom | Cible moléculaire | Indication |
|-----------------------|---|-------------------|--------------------------|
| OKT3 | Souris | CD3 | Transplantation |
| Panorex ^a | Souris | EpCAM | Oncologie |
| Reopro | Chimérique (Fab) | gpIIb/IIIa | Maladie cardiovasculaire |
| Rituxan | Chimérique | CD20 | Oncologie |
| Simulect | Chimérique | CD25 | Transplantation |
| Remicade | Chimérique | TNF α | Inflammation |
| Zenapax | Humanisé | CD25 | Transplantation |
| Herceptine | Humanisé | HER2/Neu | Oncologie |
| Mylotarg | Humanisé (couplé à l'ozogamicine) | CD33 | Oncologie |
| Synagis | Humanisé | VRS ^b | Maladie infectieuse |
| CAMPATH | Humanisé | CD52 | Oncologie |
| Zévalin | Souris (couple à ⁹⁰ Y/ ¹¹¹ In) | CD20 | Oncologie |
| Humira | Humain | TNF α | Inflammation |
| Xolair | Humanisé | IgE | Asthme allergique |
| Bexxar | Souris (couplé à ¹³¹ I) | CD20 | Oncologie |
| Erbitux (IMC-C225) | Chimérique | EGF-R | Oncologie |
| Avastin | Humanisé | VEGF | Oncologie |
| HuMax-CD4 | Humain | CD4 | Oncologie ^c |

^a Approuvé en Allemagne, pas aux États-Unis.

^b Virus Respiratoire Syncytial.

^c Médicament orphelin en Europe et aux États-Unis.

de produire un anticorps hybride dont la partie constante est humaine : il s'agit en général de la région constante des IgG1 humaines (γ 1) et de la région constante κ ($C\kappa$) humaine. De tels anticorps sont humains à 75% et moins immunogènes que les anticorps de souris, car les épitopes immunodominants inter-espèces sont principalement localisés dans les domaines CH2 et CH3. Dans la plupart des cas, la spécificité et l'affinité des anticorps chimériques restent identiques à celles des anticorps murins parentaux. De légères modifications de la spécificité fine ont cependant été parfois observées, suggérant une influence des régions constantes sur la topologie des domaines variables [17]. Cinq anticorps chimériques sont actuellement sur le marché (Tableau 1);

- la construction d'anticorps humanisés par greffe de régions hypervariables d'AcM de souris sur des régions charpentes (*Frameworks*, FR) VH et VL humaines (*Complementarity Determining Regions – CDRs – grafting*) [18]. La substitution des régions hypervariables d'AcM murins aux régions hypervariables de domaines VH et VL humains permet d'obtenir des anticorps humanisés, a priori peu im-

munogènes chez l'homme, car seules les régions hypervariables ont une origine murine. La difficulté de cette approche réside dans le choix des domaines VH et VL humains sur lesquels ces régions hypervariables vont s'insérer. En effet, certains acides aminés situés en dehors des régions hypervariables jouent un rôle essentiel dans la conformation de l'anticorps. Certains changements de résidus de la région charpente peuvent ainsi modifier considérablement l'affinité de l'anticorps humanisé obtenu. Le choix des domaines VH et VL humains sur lesquels s'effectue la substitution des CDRs est déterminé par des expériences de modélisation et de comparaison du repliement de différents domaines VH et VL humains germinaux avec ceux des domaines VH et VL de l'anticorps parental murin. La définition de la structure tridimensionnelle de la région Fab de l'anticorps murin parental par cristallographie et diffraction aux rayons X donne des informations majeures pour orienter ce choix. Une méthode alternative a été fondée sur l'analyse systématique de la distribution des acides aminés exposés aux solvants dans les domaines variables murins et humains. L'usage de tel ou tel acide aminé à ces positions exposées signe en effet un profil particulier, spécifique de chaque anticorps (*surface residues pattern*). On peut alors, par mutagenèse dirigée, convertir un profil murin en un profil humain à l'aide d'un nombre restreint de substitutions d'acides aminés, sans modifier les capacités de liaison à l'antigène. Cette technique (*variable domain resurfacing*) a été utilisée pour humaniser différents anticorps monoclonaux [19]. Sept anticorps humanisés sont actuellement sur le marché (Tableau 1);

- la construction de banques combinatoires de régions VH et VL humaines exprimées à la surface de phages (*phage display*) [20]. Cette approche a été rendue possible par la maîtrise des techniques d'expression de peptides à la surface des phages filamentueux [21] et de génération et d'expression chez *E. coli* de fragments recombinants scFv (*single-chain Fv*) liant une région VH et une région VL ou de fragments recombinants F(ab), constitués de la chaîne légère associée au segment peptidique VH-CH1 [22,23]. Pour créer un répertoire d'anticorps avec le système du « phage display », on peut utiliser indifféremment des gènes V réarrangés in vivo provenant d'une population de lymphocytes B ou des gènes V « synthétiques » construits in vitro [24, 25]. Les ADNc codant les domaines variables sont synthétisés par RT-PCR, formatés de façon à coder des fragments d'anticorps de type scFv ou Fab et

clonés alors dans des phages ou des phagémides. Ce clonage permet d'insérer les ADNc en amont d'une séquence codant une protéine de l'enveloppe du phage (g3p ou, moins fréquemment, g8p quand il s'agit de phagémides). Des banques de très grandes tailles ont été obtenues par utilisation de système de recombinaison de type *Cre/Lox* ou *Int/Att* [26], mais leur construction reste complexe et leur stabilité difficile à contrôler. La technique du *phage display* permet également de générer des anticorps de haute affinité par mutation dirigée ou par mutation aléatoire, imitant ainsi le phénomène d'hypermutation observé lors de la maturation des réponses anticorps *in vivo*. De très nombreuses adaptations de la technique du *phage display*, portant sur la construction des banques et sur les méthodes de sélection des anticorps, ont été décrites au cours des quinze dernières années [27]. Une autre approche de sélection d'anticorps est le *ribosome display*, fondé sur la production d'ARNm à partir de banques de scFv, traduits *in vitro* dans un système acellulaire [28]. Un complexe ribosome-polypeptide (chaîne naissante du scFv) est sélectionné grâce à l'exclusion d'un codon non-sens et l'ARN codant le scFv est isolé. Enfin, une technique prometteuse, fondée sur l'expression de fragments scFv à la surface de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) en fusion avec la molécule Aga2p [29] a récemment permis le criblage de banques d'anticorps par immunofluorescence : les levures marquées sont aisément triées et isolées, et l'ADNc codant les fragments d'anticorps isolé [30]. Dans toutes ces approches, les fragments d'anticorps isolés à partir des banques sont ensuite reformatés en IgG humaine entière, comme dans le cas des anticorps chimériques et humanisés. Il a été ainsi possible d'isoler à partir de ces banques des fragments d'anticorps liant différents antigènes et auto-antigènes, notamment le TNF α (Tableau 1). La plupart des AcM recombinants, qu'ils soient chimériques, humanisés, ou dérivés de banques de fragments d'anticorps, contiennent une région Fc dérivée d'une IgG1 humaine. Cette sous-classe possède en effet des caractéristiques (liaison aux RFc γ , fixation au C1q, demi-vie sérique) et des propriétés fonctionnelles (ADCC, endocytose, phagocytose, activation de la voie classique du complément) intéressantes pour l'immunothérapie. Cependant, il peut être préférable, dans certaines situations thérapeutiques ou en fonction du type de traitement, d'utiliser des régions Fc dérivées d'IgG2 ou d'IgG4, si l'on veut éviter une ac-

tivation des mécanismes effecteurs et diminuer les fixations non spécifiques sur des tissus normaux ;

- l'obtention de souris transgéniques contenant une grande partie des gènes codant les chaînes lourdes et légères humaines [31–33]. Cette approche consiste à remplacer les loci des gènes d'immunoglobulines (Ig) de souris par les loci équivalents humains en utilisant des fragments d'ADN génomique humain, contenus dans des *Yeast Artificial Chromosomes* (YACs) [31,32]. Des souris dont une grande partie des loci IgH et Ig κ avait été inactivée (moIgK.O.) et des souris transgéniques contenant une partie des loci d'Ig humaines (huIgTg) ont été générées et croisées. Il a été alors montré que les souris issues de ce croisement [huIgTg \times moIgK.O.] produisent des anticorps humains de type IgM, ou IgG lors de réponses secondaires, démontrant que les fragments introduits permettent l'expression des chaînes lourdes et légères humaines, ainsi que la commutation de classe. De plus, l'analyse des AcM obtenus a montré que des mutations somatiques affectaient les régions variables lors de la réponse secondaire, indiquant l'existence d'une maturation de la réponse anticorps. Ces souris permettent ainsi de générer des AcM humains de haute affinité contre n'importe quel antigène [31,32]. Une approche fondée sur l'introduction de fragments chromosomiques humains entiers (technologie « trans-chromosomique », Tc) a été également développée [33]. Des souris invalidées en ce qui concerne leurs loci IgH et Ig κ ont été rendues double-trans-chromosomiques par introduction de fragments dérivés des chromosomes humains 14 et 22 contenant respectivement le locus *IGH* et le locus *IGK*. Cela a permis de générer des souris dont un certain nombre de cellules somatiques contiennent 100% des gènes codant les chaînes lourdes et les chaînes légères κ humaines. Ces souris produisent des quantités élevées d'IgG humaines en réponse à différents immunogènes. Des anticorps monoclonaux humains peuvent être obtenus alors par la technique classique d'obtention d'hybridomes B.

4. Optimisation des propriétés effectrices des anticorps monoclonaux

En moins d'une décade, le nombre d'AcM ayant reçu une autorisation de mise sur le marché ou d'utilisation pour le traitement de pathologies aussi diverses que les lympho-proliférations, les tumeurs solides, les maladies inflammatoires, l'asthme allergique, ou pour la

prévention du rejet de greffe, a connu une augmentation spectaculaire (Tableau 1). Le nombre impressionnant d'AcM actuellement évalués dans des essais de phases II et III (plus de 150) présage une accélération de cet accroissement dans les prochaines années. De nombreux essais d'immunothérapie sont actuellement effectués avec des AcM de souris, chimérisés, humanisés, ou humains. Il existe plusieurs approches dans ces essais. La plus simple consiste à injecter à des malades des AcM dirigés contre différents antigènes associés aux tumeurs, contre des récepteurs de facteurs de croissance, des cytokines, des facteurs solubles pro-angiogéniques, ou des molécules de surface induisant une apoptose cellulaire, une anergie ou une activation cellulaire selon les cas. Afin de rendre les anticorps anti-antigènes associés aux tumeurs plus efficaces, des techniques de couplage des anticorps à des toxines (notamment la ricine et la toxine de *Pseudomonas*), ou à des drogues utilisées pour la chimiothérapie, comme le méthotrexate, ont été développées. Une autre approche d'utilisation d'AcM par thérapie génique a été également explorée depuis quelques années : des fragments d'anticorps (anti-virus, anti-oncogènes, anti-enzymes) ont été exprimés dans des cellules tumorales, dans des cellules infectées par des virus (y compris des cellules de plantes) pour bloquer ou moduler les fonctions de protéines intracellulaires (*intrabodies*) [34,35].

Afin de renforcer les propriétés effectrices des AcM, différentes techniques ont consisté à les transformer, par voie chimique ou par génie génétique, en anticorps bispécifiques, ce qui permet un pontage entre des cellules tueuses de l'hôte et les cellules tumorales et provoque une potentialisation de la cytotoxicité anti-tumorale [36]. Les recherches ont également porté sur l'optimisation des propriétés effectrices des régions Fc par mutation ponctuelle et par modification du profil de glycosylation. L'une des stratégies développées pour obtenir des AcM cytotoxiques optimisés consiste à les modifier de façon à ce qu'ils recrutent plus efficacement le C1q, notamment en diminuant leur *Koff* [37]. Une autre approche consiste à cribler des anticorps dont la séquence a été mutée par rapport à l'anticorps d'origine, criblage reposant sur l'analyse des interactions de ces anticorps avec différents types de RFc γ et/ou sur leur capacité à induire efficacement des fonctions effectrices [38]. Selon la pathologie ciblée, la stratégie peut consister à augmenter ou à diminuer les interactions IgG/RFc γ . Les AcM cytotoxiques possédant une capacité d'engagement des RFc γ activateurs accrue (RFc γ IIA, RFc γ IIIA) et une interaction réduite avec les RFc γ inhibiteurs (RFc γ IIB1, RFc γ IIB2) sont susceptibles d'avoir une activité anti-virale ou anti-tumorale

optimisée. En revanche, des AcM qui engagent préférentiellement les RFc γ inhibiteurs sans recruter les RFc γ activateurs sont potentiellement utilisables dans le traitement de pathologies auto-immunes. Enfin, l'utilisation d'AcM incapables de recruter les RFc γ ou interagissant faiblement avec ceux-ci peut être d'un grand intérêt pour éviter les effets secondaires d'une immunothérapie, dus à la libération de cytokines à la suite du recrutement de cellules effectrices immunes (*cytokine syndrome release*). L'ingénierie du profil de glycosylation de la région Fc des IgG1 humaines (l'isotype utilisé dans la très grande majorité des AcM commercialisés) est une autre stratégie utilisée pour optimiser les fonctions effectrices des AcM. En effet, non seulement la glycosylation per se joue un rôle dans la structure globale de la région Fc des IgG et est nécessaire à la liaison aux RFc γ , mais la composition précise de l'oligosaccharide fixé à l'asparagine 297 a un impact sur les interactions IgG/RFc γ . D'une part, la présence de résidus *N*-acétyl-glucosamine (GlcNA) intermédiaires permet aux IgG1 humaines de se lier plus fortement aux RFc γ III (présents notamment sur les cellules NK) et à induire une ADCC accrue [39]. D'autre part, une absence de fucose [40] ou un faible taux de ce sucre [41] permet également une fixation accrue aux RFc γ III et une meilleure ADCC. Un faible taux de fucose a également un impact sur l'engagement du RFc γ IIB (récepteur inhibiteur), qui est amélioré [41]. Cette capacité des IgG peu fucosylées à lier plus fortement le RFc γ III et, dans une moindre mesure, le RFc γ IIB, a récemment permis de sélectionner un AcM humain anti-D, dans le cadre de la prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle [41], anticorps qui a montré une excellente capacité de clairance dans un essai de phase I chez l'homme (Beliard et al., en préparation).

5. Production des anticorps monoclonaux à l'échelle industrielle

L'optimisation des propriétés effectrices des AcM, outre son intérêt pour atteindre une meilleure efficacité clinique, a également un grand intérêt potentiel d'un point de vue industriel et économique : elle pourrait permettre de diminuer les doses requises pour les traitements et donc le coût de ces derniers (qui pour certains AcM atteignent actuellement des montants situés entre 15 000 et 20 000 € par an). Plusieurs technologies peuvent théoriquement s'utiliser pour la production des AcM en fonction des caractéristiques désirées du produit final et des quantités nécessaires à sa commercialisation à une échelle régionale ou mondiale [42] (Fig. 1).

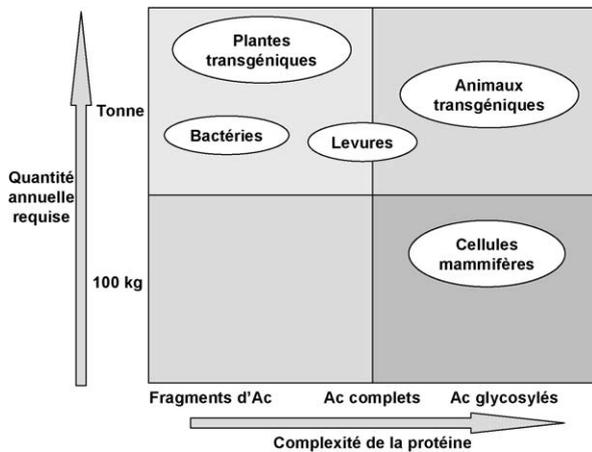


Fig. 1. Le procédé de fabrication est défini en fonction de paramètres dont les deux plus importants sont : (1) les caractéristiques structurales de la molécule (taille, complexité, importance des modifications post-traductionnelles) ; (2) les quantités à produire en vue des applications thérapeutiques.



Fig. 2. Bioréacteur de 250 l pour la mise au point des procédés de fabrication au Laboratoire français du fractionnement et des biotechnologies (LFB) (échelle pilote non BPF).

Il existe deux grands types possibles de procédés pour produire les quantités nécessaires d'AcM pour les études cliniques et leur commercialisation : des procédés fondés sur la culture cellulaire et des procédés faisant appel à la transgénèse. En fait, les AcM actuellement sur le marché ou évalués dans des essais cliniques sont produits *in vitro* dans des cellules eucaryotes de mammifères (principalement CHO et NS0) [42,43]. Les différentes lignées cellulaires utilisées (qui incluent également YB2/0 et PERC-6) sont cultivées en suspension dans des milieux de culture sans protéine, en particulier sans protéine d'origine animale. Les procédés de fabrication sont mis au point dans des unités

pilotes (Fig. 2), puis transférés dans des unités de fabrication aux normes des « bonnes pratiques de fabrication » (BPF). Pour satisfaire les besoins thérapeutiques, qui sont de plus en plus importants, les industriels sont amenés à produire des quantités de l'ordre de dizaines de kilogrammes d'anticorps. À cette fin, des unités industrielles de bioréacteurs de 10 000 litres, voire plus, ont été construites, notamment aux États-Unis et au Royaume-Uni. Tous les anticorps commercialisés à ce jour sont produits selon ces procédés de culture de cellules en suspension dans des bioréacteurs. En effet, en ce qui concerne la production d'AcM sous forme d'IgG entière, la production dans des bactéries n'est toujours pas maîtrisée : d'une part, la production de quantités élevées de molécules recombinantes hétérologues reste toxique pour les bactéries et, d'autre part, cette expression ne permet pas l'obtention de molécules ayant des propriétés fonctionnelles correctes du fait de l'absence de N-glycosylation. La production dans des bactéries, peu onéreuse, est cependant bien adaptée à la production de fragments d'anticorps comme les scFv et les Fab.

Un effort particulier est actuellement soutenu pour la maîtrise d'AcM dans la levure. Plusieurs équipes ont fabriqué des levures recombinantes transfectées avec différentes glycosyltransférases afin d'obtenir des anticorps présentant une glycosylation adéquate et contrôlée. Ce système de production, s'il arrivait à être maîtrisé, permettrait certainement d'abaisser de façon significative le coût de production des AcM.

Plusieurs espèces animales ont été utilisées pour la production d'AcM : lapins, brebis, chèvres, vaches. Les anticorps ont en général été produits dans le lait des animaux en utilisant des vecteurs d'expression contenant des promoteurs spécifiques des cellules de la glande mammaire. Cette production est cependant encore restée au stade de la démonstration de la faisabilité. Cette approche permet de produire de grandes quantités d'anticorps à des coûts très compétitifs par rapport aux procédés *in vitro*. Toutefois, l'utilisation d'animaux transgéniques, outre les angoisses « sociétales » de sécurité biologique inhérentes à cette approche, présente certaines limites comme le délai d'obtention et de sélection des animaux transgéniques et la purification de la protéine d'intérêt à partir du lait. De plus, ces approches nécessitent de maîtriser les différentes modifications post-traductionnelles des IgG produites, propres à chaque espèce.

Enfin, plusieurs plantes ont été utilisées pour la préparation d'AcM (*plantibodies*) : colza, tabac, riz, blé, maïs. Cette approche est sans doute une des approches permettant à terme un abaissement significatif des coûts de production des AcM. Cependant, une des limites ma-

jeures à la production de protéines dans les plantes est liée à la présence de motifs oligosaccharidiques particuliers comme le xylose, dont la présence pose d'importants problèmes de tolérance et d'immunogénicité. Certaines glycosyltransférases de plantes ont déjà été modifiées par invalidation génique et transgénèse pour obtenir des anticorps présentant des glycosylations proches de celles des Ig humaines. Comme dans le cas des animaux transgéniques, cette approche reste en devenir. Par ailleurs, des essais de production d'AcM dans des cellules végétales cultivées *in vitro* ont aussi été réalisés avec succès. Cette approche innovante, également moins onéreuse que l'utilisation de cellules de mammifères, permettrait d'éviter la culture des plantes transgéniques en champs et de réaliser des productions en milieu confiné (bioréacteurs).

La purification d'AcM à partir de surnageants de culture est relativement facile, d'autant plus que les milieux de culture utilisés sont dépourvus de protéines exogènes [42,43]. La première étape consiste à clarifier et à concentrer les surnageants de culture. Une chromatographie d'affinité utilisant de la protéine A est ensuite utilisée, les anticorps étant des IgG dans leur immense majorité. Au moins une étape de chromatographie échangeuse d'ions est alors ajoutée au procédé, ce qui permet d'éliminer l'ADN résiduel et les protéines de la lignée productrice contaminantes (HCPs, pour *Host Cell Proteins*). Les protocoles classiques permettent ainsi d'obtenir des anticorps ayant un taux de pureté supérieur à 99,9%. Un traitement solvant-détergent permettant une inactivation de virus enveloppés potentiellement présents ainsi qu'une étape de nanofiltration (15 nm au LFB), permettant d'éliminer les particules virales, sont ajoutés au procédé de purification pour assurer une sécurité biologique maximale. Les différentes étapes du procédé sont testées et validées pour leur capacité à éliminer toute trace de contaminants (ADN, virus contaminants potentiellement produits par les lignées cellulaires productrices). Une fois purifiés, les AcM sont généralement conditionnés sous forme liquide, prêts à l'emploi, à des concentrations de l'ordre du mg/ml, voire à des concentrations plus élevées.

6. Conclusion : vers des anticorps monoclonaux biosimilaires

Les années à venir vont très certainement voir le nombre d'AcM mis sur le marché s'accroître sensiblement, dans des indications de plus en plus variées et pour lesquelles l'arsenal thérapeutique actuel est restreint, voire inexistant. La première génération d'AcM apparue à la fin des années 1980 et au milieu des

années 1990 va céder la place à de nouvelles molécules, dont l'efficacité, l'immunogénicité et les propriétés pharmacocinétiques seront mieux contrôlées et optimisées. Ces nouveaux anticorps, utilisés éventuellement en synergie avec d'autres (une approche « oligoclonale » se dessine déjà pour certaines indications, comme les traitements anti-tumoraux et la neutralisation de toxines) ou d'autres biomolécules ou composés chimiques, chez des patients à des stades plus précoces de leur maladie, notamment en oncologie, sont susceptibles de constituer une classe de médicaments exceptionnellement efficaces. L'arrivée de ces nouveaux anticorps, dirigés contre les mêmes cibles que les AcM de première génération, et pour lesquels de nombreux brevets vont expirer dans les prochaines années, pose désormais la question de la définition de ce qu'est un anticorps « générique » biosimilaires. Pour des produits biotechnologiques comme les AcM, le processus de fabrication définit le produit final. En effet, les conditions de production des AcM peuvent avoir un impact direct sur leurs caractéristiques structurales (modifications post-traductionnelles et composition en oligosaccharides en particulier) et sur leurs propriétés fonctionnelles. C'est pourquoi les agences réglementaires ont proposé le terme de médicaments *biosimilaires*. La qualification de médicaments génériques est réservée aux produits issus d'une synthèse chimique. Une nouvelle procédure d'autorisation de mise sur le marché, différente de celle appliquée aux médicaments génériques, est en cours de préparation au niveau européen pour les médicaments biosimilaires.

Remerciements

Les auteurs remercient leurs collègues de l'unité Inserm 255 et du Laboratoire français du fractionnement et des biotechnologies (LFB), qui participent avec eux à la recherche et au développement de nouveaux AcM à usage thérapeutique.

Références

- [1] G. Köhler, C. Milstein, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* 256 (1975) 495–497.
- [2] M.D. Hulett, P.M. Hogarth, Molecular basis of Fc receptor function, *Adv. Immunol.* 57 (1994) 1–127.
- [3] H. Aguila, R.R. Pollock, G. Spira, M.D. Scharff, The production of more useful monoclonal antibodies. II. The use of somatic-cell genetic and recombinant DNA technology to tailor-make monoclonal antibodies, *Immunol. Today* 7 (1986) 380–383.

- [4] J.-L. Teillaud, C. Desaymard, A.M. Giusti, B. Haseltine, R.R. Pollock, D.E. Yelton, D.J. Zack, M.D. Scharff, Monoclonal antibodies reveal the structural basis of antibody diversity, *Science* 222 (1984) 721–726.
- [5] G. Spira, A. Bargellesi, J.-L. Teillaud, M.D. Scharff, The identification of monoclonal class switch variants by Sib Selection and an ELISA assay, *J. Immunol. Methods* 74 (1984) 307–315.
- [6] S.J. Cumbers, G.T. Williams, S.L. Davies, R.L. Grenfell, S. Takeda, F.D. Batista, J.E. Sale, M.S. Neuberger, Generation and iterative affinity maturation of antibodies in using hypermutating B-cell lines, *Nat. Biotechnol.* 20 (2002) 1129–1134.
- [7] L. Olsson, H.S. Kaplan, Human–human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 77 (1980) 5429–5431.
- [8] M. Steinitz, G. Klein, S. Koskimies, O. Makela, EB virus induced B lymphocyte cell lines producing specific antibodies, *Nature* 269 (1977) 420–422.
- [9] D. Kozbor, A. Lagarde, J.-C. Roder, Human hybridomas constructed with antigen-specific Epstein–Barr virus-transformed cell lines, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 79 (1982) 6651–6655.
- [10] W.L. Carroll, K. Thielemans, J. Dilley, R. Levy, Mouse × human hetero-hybridomas as fusion partners with human B cell tumors, *J. Immunol. Methods* 89 (1986) 61–72.
- [11] A. Karpas, A. Dremucheva, B.H. Czepulkowski, A human myeloma cell line suitable for the generation of human monoclonal antibodies, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98 (2001) 1799–1804.
- [12] C.A. Borrebaeck, S.A. Möller, In vitro immunization. Effect of growth and differentiation factors on antigen-specific cell activation and production of monoclonal antibodies to autologous antigens and immunogens, *J. Immunol.* 136 (1986) 3710–3715.
- [13] J. Banchereau, P. de Paoli, A. Valle, E. Garcia, F. Rousset, Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40, *Science* 251 (1989) 70–72.
- [14] E. Traggiai, S. Becker, K. Subbarao, L. Kolesnikova, Y. Uematsu, M.R. Gismondo, B.R. Murphy, R. Rappuoli, A. Lanzavecchia, An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus, *Nat. Med.* 8 (2004) 871–875.
- [15] E. Traggiai, L. Chicha, L. Mazzucchelli, L. Bronz, J.C. Piffaretti, A. Lanzavecchia, M.G. Manz, Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice, *Science* 304 (2004) 104–107.
- [16] S.L. Morrison, M.J. Johnson, L.A. Herzenberg, V.T. Oi, Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851–6855.
- [17] M. Torres, R. May, M.D. Scharff, A. Casadevall, Variable-region identical antibodies differing in isotype demonstrate differences in fine specificity and idiotype, *J. Immunol.* 174 (2005) 2132–2142.
- [18] C. Queen, W.P. Schneider, H.E. Selick, P.W. Payne, N.F. Landolfi, J.F. Duncan, N.M. Avdalovic, M. Levitt, R.P. Junghans, T.A. Waldmann, A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029–10035.
- [19] M.A. Roguska, J.T. Pedersen, C.A. Keddy, A.H. Henry, S.J. Searle, J.M. Lambert, V.S. Goldmacher, W.A. Blattler, A.R. Rees, B.C. Guild, Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91 (1994) 969–973.
- [20] W.D. Huse, L. Sastry, S.A. Iverson, A.S. Kang, M.M. Altling, D.R. Burton, S.J. Benkovic, R.A. Lerner, Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda, *Science* 246 (1989) 1275–1281.
- [21] G.P. Smith, Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface, *Science* 228 (1985) 1315–1317.
- [22] J.S. Huston, D. Levinson, M. Mudgett-Hunter, M.S. Tai, J. Novotny, M.N. Margolies, R.J. Ridge, R.E. Bruccoleri, E. Haber, R. Crea, et al., Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85 (1988) 5879–5883.
- [23] A. Skerra, A. Plückthun, Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*, *Science* 240 (1988) 1038–1041.
- [24] T.J. Vaughan, A.J. Williams, K. Pritchard, J.K. Osbourn, A.R. Pope, J.C. Earnshaw, J. McCafferty, R.A. Hodits, J. Wilton, K.S. Johnson, Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library, *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 309–314.
- [25] H.R. Hoogenboom, G. Winter, By-passing immunisation: human antibodies from synthetic repertoires of germline VH genes segments rearranged in vitro, *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381–388.
- [26] F. Geoffroy, R. Sodoyer, L. Aujame, A new phage display system to construct multicombinatorial libraries of very large antibody repertoires, *Gene* 151 (1994) 109–113.
- [27] H.R. Hoogenboom, Overview of antibody phage-display technology and its applications, *Methods Mol. Biol.* 178 (2002) 1–37.
- [28] J. Hanes, C. Schaffitzel, A. Knappik, A. Plückthun, Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display, *Nat. Biotechnol.* 18 (2000) 1287–1292.
- [29] E.T. Boder, K.D. Wittrup, Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries, *Nat. Biotechnol.* 15 (1997) 553–558.
- [30] M.J. Feldhaus, R.W. Siegel, L.K. Opreko, J.R. Coleman, J.M. Feldhaus, Y.A. Yeung, J.R. Cochran, P. Heinzelman, D. Colby, J. Swers, C. Graff, H.S. Wiley, K.D. Wittrup, Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display library, *Nat. Biotechnol.* 21 (2003) 163–170.
- [31] N. Lonberg, L.D. Taylor, F.A. Harding, M. Trounstine, K.M. Higgins, S.R. Schramm, C.C. Kuo, R. Mashayekh, K. Wyomere, J.G. McCabe, et al., Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications, *Nature* 368 (1994) 856–859.
- [32] L.L. Green, M.C. Hardy, C.E. Maynard-Currie, H. Tsuda, D.M. Louie, M.J. Mendez, H. Abderrahim, M. Noguchi, D.H. Smith, Y. Zeng, et al., Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs, *Nat. Genet.* 7 (1994) 13–21.
- [33] K. Tomizuka, T. Shinohara, H. Yoshida, H. Uejima, A. Ohguma, S. Tanaka, K. Sato, M. Oshimura, I. Ishida, Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97 (2000) 722–727.
- [34] O. Cochet, M. Kenigsberg, I. Delumeau, A. Virone-Oddos, M.-C. Multon, W.H. Fridman, F. Schweighoffer, J.-L. Teillaud, B. Tocqué, Intracellular expression of an antibody fragment neutralizing p21^{ras} promotes tumor regression, *Cancer Res.* 58 (1998) 1170–1176.

- [35] C. Caron de Fromentel, N. Gruel, C. Venot, L. Debussche, E. Conseiller, C. Dureuil, J.-L. Teillaud, B. Tocqué, L. Bracco, Restoration of transcriptional activity of p53 mutants in human tumor cells by intracellular expression of anti-p53 single chain Fv fragments, *Oncogene* 18 (1999) 551–557.
- [36] J. Michon, S. Moutel, J. Barbet, J.-L. Romet-Lemonne, Y.M. Deo, W.H. Fridman, J.-L. Teillaud, In vitro killing of neuroblastoma cells by neutrophils derived from granulocyte colony-stimulating factor-treated cancer patients using an anti-disialoganglioside/anti-Fc γ RI bispecific antibody, *Blood* 86 (1995) 1124–1130.
- [37] J.L. Teeling, R.R. French, M.S. Cragg, J. van den Brakel, M. Pluyter, H. Huang, C. Chan, P.W. Parren, C.E. Hack, M. Dechant, T. Valerius, J.G. van de Winkel, M.J. Glennie, Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas, *Blood* 104 (2005) 1793–1800.
- [38] R.L. Shields, A.K. Namenuk, K. Hong, Y.G. Meng, J. Rae, J. Briggs, D. Xie, J. Lai, A. Stadlen, B. Li, J.A. Fox, L.G. Presta, High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc γ R, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591–6604.
- [39] P. Umana, J. Jean-Mairet, R. Moudry, H. Amstutz, J.E. Bailey, Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity, *Nat. Biotechnol.* 17 (1999) 176–180.
- [40] T. Shinkawa, K. Nakamura, N. Yamane, E. Shoji-Hosaka, Y. Kanda, M. Sakurada, K. Uchida, H. Anazawa, M. Satoh, M. Yamasaki, N. Hanai, K. Shitara, The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 3466–3473.
- [41] S. Sibénil, C. de Romeuf, N. Bihoreau, N. Fernandez, J.-L. Meunier, A. Regenman, E. Nony, C. Gaucher, A. Glacet, S. Jorieux, P. Klein, M.P. Hogarth, W.H. Fridman, D. Bourel, R. Béliard, J.-L. Teillaud, Selection of a human anti-RhD monoclonal antibody for therapeutic use: Impact of IgG glycosylation on activating and inhibitory Fc γ R functions, *Clin. Immunol.* 118 (2006) 170–179.
- [42] D.P. Humphreys, D.J. Glover, Therapeutic antibody production technologies: molecules, applications, expression and purification, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 4 (2001) 172–185.
- [43] A.C. Roque, C.R. Lowe, M.A. Taipa, Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 639–654.