

Conception de conjugués peptidiques mimant l'activité des anticorps monoclonaux

La chimiothérapie a été pendant longtemps la principale alternative pour le traitement systémique des cancers avancés ou métastatiques. Néanmoins, certains des composés utilisés provoquent de graves effets secondaires en raison de leur toxicité pour les cellules normales. Les bénéfices des médicaments sont aussi souvent limités en raison de la résistance intrinsèque ou acquise des cellules tumorales. L'efficacité du traitement peut être augmentée en augmentant les doses, mais cette option aggrave le problème de toxicité et est donc rarement considérée. Dans ce contexte, des thérapies ciblées à base d'anticorps ont été proposées à la fin des années 90. Les anticorps monoclonaux tels que le rituximab (RTX) et l'Herceptin ont été utilisés avec succès pour le lymphome non-Hodgkin et les tumeurs mammaires respectivement. Cependant, leur utilisation reste controversée : l'administration répétée de mAbs peut déclencher une réponse immunitaire qui peut mener à la production d'anticorps neutralisants, une anaphylaxie aiguë ou une maladie sérique.¹ Les autres limitations sont des difficultés de production des mAbs liées à l'utilisation de systèmes vivants, ce qui implique un coût élevé production ainsi que des problèmes de variation entre lots et de contaminations.² Il est donc important de mettre en place des stratégies complémentaires pour les patients qui ne répondent pas ou qui échappent au traitement, en utilisant une approche entièrement synthétique qui exploitera finalement les anticorps de l'hôte et les réponses immunitaires subséquentes. A ce jour, seuls quelques substituts de mAbs ont été décrits, principalement des cyclopeptides. Malheureusement, ces molécules souffrent de faibles affinités ou d'activités biologiques limitées. La plupart du temps, les mauvais résultats sont dus à une incompréhension structurelle de la cible (antigène) au niveau cellulaire.³⁻⁵ Très récemment, notre groupe a conçu des surfaces fonctionnalisées par l'antigène CD20, qui ont montré par la technique de résonance plasmonique de surface (SPR), qu'un espacement inter-CD20 de près de 2 nm confère les meilleures conditions pour la liaison au RTX⁶ en accord avec des études concomitantes de microscopies électroniques.⁷⁻⁸ Cette distribution à l'échelle nanométrique représente un point clé pour la conception de mimes du RTX. Dans ce contexte, nous proposons de concevoir des composés macromoléculaires englobant un domaine ciblant le CD20 constitué de petits cyclopeptides issus de la séquence du RTX et un domaine effecteur capable d'initier la réponse immunitaire innée à des fins thérapeutiques (Figure 1).

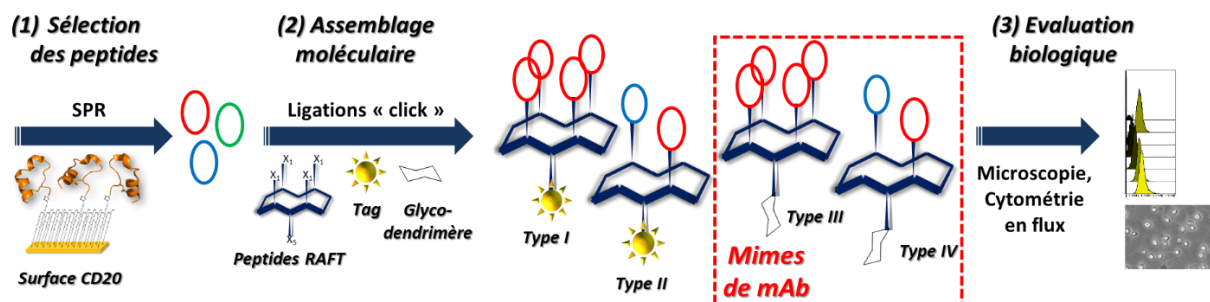


Figure 1. Conception de mimes de mAb

Récemment, pour étudier l'interaction entre le RTX et l'antigène CD20 par SPR, nous avons développé des surfaces antigéniques en greffant un fragment de l'antigène CD20 sur des surfaces SAM (Self-assembled monolayer).⁶ Nous avons montré la spécificité de ces surfaces pour le RTX avec des affinités nanomolaires comparables à celles déterminées sur des lignées de lymphocyte B, cellules exprimant l'antigène CD20. En utilisant la technique complémentaires SPOT, exploitée pour cartographier les épitopes antigéniques,⁹ nous avons identifié les fragments peptidiques du RTX impliqués dans la reconnaissance du CD20, notamment *via* le criblage de cyclohexapeptides cyclisés par un pont disulfure.¹⁰ Ces fragments appartiennent aux domaines CDR (complementarity-determining region) du RTX : les boucles H1, H3, L1 et L3, qui forment une large poche au sein du mAb (Figure 2). Ces résultats

fournissent de nouvelles informations qui permettent d'ouvrir la voie à la découverte de mimes du RTX au moyen des résidus d'acides aminés impliqués dans la liaison.

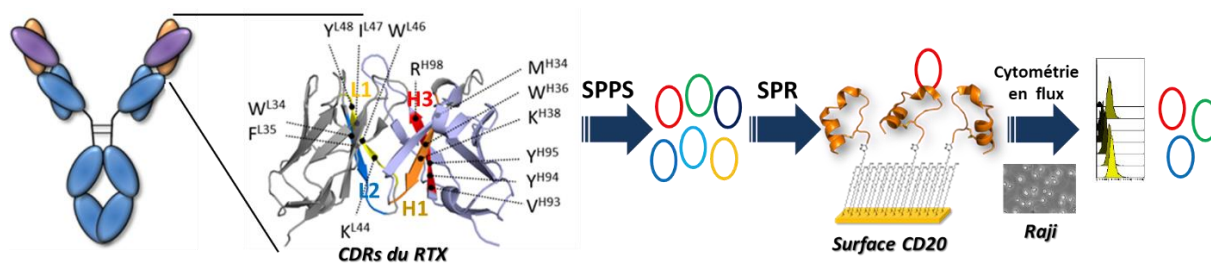


Figure 2. Sélection des peptides

Dans ce contexte, nous proposons de préparer par synthèse peptidique sur support solide (SPPS) et en solution, de petits cyclopeptides issus des CDRs du RTX (Figure 2). L'avantage des cyclopeptides est une réduction de l'espace conformationnel du composé, générant souvent une meilleure activité biologique ainsi qu'une meilleure stabilité.¹¹ Les peptides seront sélectionnés par SPR sur des surfaces fonctionnalisées par le CD20 développées dans notre laboratoire.⁶ Les peptides ayant la meilleure affinité, marqués par un fluorophore, seront alors testés par cytométrie en flux sur des cellules disponibles dans le commerce exprimant le CD20 (cellules Raji) et contrôlés sur des cellules n'exprimant pas le CD20 (cellules Jurkat) (Figure 2). Cette étape nous permettra d'éliminer des composés dépourvus de sélectivité notable.

Dans un deuxième temps, les cyclopeptides sélectionnés seront assemblés par ligations chimiosélectives (ligations oxime, CuAAC...) ¹² sur des châssis moléculaires « RAFT » développés au DCM pour obtenir des composés multivalents (Figure 1). Les composés RAFTs ont largement été utilisés au sein de notre laboratoire pour leurs propriétés intrinsèques leur permettant de greffer des agents de ciblage, et des agents de détection et/ou cytotoxique dans des domaines bien distincts, conférant aux composés les activités biologiques désirées.¹³⁻¹⁴ Des expériences seront menées pour évaluer l'influence de l'architecture moléculaire des conjugués peptidiques, en particulier l'effet de la multivalence mais également si besoin, l'effet de la longueur et de la nature des bras d'espacement entre les cyclopeptides d'intérêt et l'échafaudage moléculaire RAFT. Pour ce faire, les paramètres cinétiques (K_{on} , K_{off} , K_D) seront alors évalués par SPR et comparées au RTX, le mAb de référence, sur les surfaces fonctionnalisées par le CD20. Toutes ces études viseront à optimiser les composés pour les expériences biologiques.

L'addition d'un fluorophore aux composés permettra l'évaluation des composés *in vitro*, sur plusieurs lignées cellulaires exprimant ou non CD20, et également via l'utilisation de lymphocytes B primaires isolés du sang humain et fournis par l'EFS (Etablissement Français du Sang, La Tronche). L'interaction des cellules avec les composés fluorescents sera étudiée par cytométrie en flux. Des études complémentaires de microscopie confocale nous permettront de visualiser la localisation des composés au niveau cellulaire. Le RTX en interaction avec l'antigène CD20 n'est pas internalisé au sein des cellules, ce qui est essentiel pour obtenir une réponse immunitaire. Dans ce contexte, nous vérifierons la non-internalisation de nos composés.

Pour le(s) composé(s) le(s) plus sélectif(s), nous conjuguerons un glycodendrimère de rhamnose qui est capable d'initier une réponse immunitaire innée telle que nous l'avons montré très récemment.¹⁵⁻¹⁶ Nous utiliserons une méthode de synthèse convergente pour conjuguer les deux domaines de reconnaissance (cyclopeptides d'intérêt) et effecteur (dendrimère de rhamnose) basée sur la chimie CuAAC.

Enfin, la dernière étape du projet consistera à évaluer la capacité des composés mimes du RTX à déclencher à la fois les réponses ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) et CDC (complement-dependent cytotoxicity) via le recrutement d'anticorps endogène anti-rhamnose. La réponse CDC sera évaluée à l'aide de cellules B purifiées incubées avec les composés mimes et du sérum humain contenant de l'anticorps anti-rhamnose, décomplémenté ou non. Pour l'étude ADCC,

des cellules NK (Natural killer) purifiées et des monocytes seront ajoutés. Sur les bases des résultats obtenus, les perspectives de pré maturation du projet seront d'aller sur des modèles animaux à l'aide d'un modèle de souris transgénique CD20 humain pour vérifier la capacité des composés à dépléter les lymphocytes B *in vivo*.

Contact : didier.boturn@univ-grenoble-alpes.fr

Références Bibliographiques

- (1) T. T. Hansel, H. Kropshofer, T. Singer, J. A. Mitchell, A. J. T. George. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 325-338.
- (2) I. Hernandez, S. W. Bott, A. S. Patel, C. G. Wolf, A. R. Hospodar, S. Sampathkumar and W. H. Shrank. Pricing of Monoclonal Antibody Therapies: Higher If Used for Cancer? *Am. J. Manag. Care* **2018**, *24*, 109-112.
- (3) H. Hu, C. Kofoed, M. Li, J. Pereira Lopes Gonçalves, J. Hansen, M. Wolfram, A. Kornerup Hansen, C. Hartmann Friis Hansen, F. Diness, S. Schoffelen and M. Meldal. Computational evolution of threonine-rich β -hairpin peptides mimicking specificity and affinity of antibodies. *ACS Cent. Sci.* **2019**, *5*, 259-269.
- (4) O. Longin, M. Hezwani, H. van de Langemheen and R. M. J. Liskamp. Synthetic antibody protein mimics of infliximab by molecular scaffolding on novel CycloTriVeratrilene (CTV) derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 5254-5274.
- (5) P. Timmerman, R. Barderas, J. Desmet, D. Altschuh, S. Shochat, M. J. Hollestelle, J. W. M. Höppener, A. Monasterio, J. I. Casal and R. H. Meloen. A combinatorial approach for the design of complementarity-determining region-derived peptidomimetics with *in vitro* anti-tumoral activity. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 34126-34134.
- (6) L. Bar, J. Dejeu, R. Lartia, F. Bano, R. P. Richter, L. Coche-Guérente, D. Boturn. Impact of antigen density on recognition by monoclonal antibodies. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 5396-5403.
- (7) L. Rougé, N. Chiang, M. Steffek, C. Kugel, T. I. Croll, C. Tam, A. Estevez, C. P. Arthur, C. M. Koth, C. Ciferri, E. Kraft, J. Payandeh, G. Nakamura, J. T. Koerber, A. Rohou. Structure of CD20 in complex with the therapeutic monoclonal antibody rituximab. *Science* **2020**, *367*, 1224-1230.
- (8) A. Kumar, C. Planchais, R. Fronzes, H. Mouquet, N. Reyes. Binding mechanisms of therapeutic antibodies to human CD20. *Science* **2020**, *369*, 793-799.
- (9) R. Frank. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports - principles and applications. *J. Immunol. Methods* **2002**, *267*, 13-26.
- (10) L. Bar, C. Nguyen, M. Galibert, F. Santos-Schneider, G. Aldrian, J. Dejeu, R. Lartia, L. Coche-Guérente, F. Molina, D. Boturn. Determination of the rituximab binding site to the CD20 epitope by using SPOT-synthesis and surface plasmon resonance analyses. *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 6865-6872.
- (11) H. Kessler. Conformation and Biological Activity of Cyclic Peptides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512-523.
- (12) M. Galibert, O. Renaudet, P. Dumy, D. Boturn. Access to biomolecular assemblies via one-pot triple orthogonal chemoselective ligations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1901-1904.
- (13) A. Borbély, F. Thoreau, E. Figueras, M. Kadri, J.-L. Coll, D. Boturn, N. Sewald. Synthesis and Biological Characterization of Monomeric and Tetrameric RGD-Cryptophycin Conjugates. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 2602-2605.
- (14) C. H. F. Wenk, F. Ponce, S. Guillermet, C. Tenaud, D. Boturn, P. Dumy, D. Watrelot-Virieux, C. Carozzo, V. Jossierand, J.-L. Coll. Near-infrared optical guided surgery of highly infiltrative fibrosarcomas in cats using an anti- α v β 3 integrin molecular probe. *Cancer Lett.* **2013**, *334*, 188-195.
- (15) B. Liet, E. Laigre, D. Goyard, B. Todaro, C. Tiertant, D. Boturn, N. Berthet, O. Renaudet. Multifunctional glycoconjugates for recruiting natural antibodies against cancer cells. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 15508-15515.
- (16) B. Todaro, S. Achilli, B. Liet, E. Laigre, C. Tiertant, D. Goyard, N. Berthet, O. Renaudet. *Biomater. Sci.* **2021**, *9*, 4076-4085.