

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

École doctorale n°554
Environnements Santé - ES
Spécialité de doctorat : Biologie Moléculaire et Cellulaire

par

MME AGATHE DUBUISSON

Génération et caractérisation de nouveaux anticorps anti-DR4 et anti-DR5

Thèse présentée et soutenue, à l'Université de Bourgogne, le 7 décembre 2018.

Composition du Jury :

Dr. ERIC SOLARY	Professeur Inst. Gustave Roussy	(Président)
Dr. MARIE-THÉRÈSE BOITREL	DR2 Inserm Université de Rennes	(Rapporteur)
Dr. PIERRE MARTINEAU	CR1 Inserm IRCM	(Rapporteur)
Dr. SANDRINE WITTMANN	HDR UCBL	(Examineur)
Dr. CATHERINE PAUL	MCF EPHE	(Examineur)
Dr. OLIVIER MICHEAU	DR2 Inserm UBFC	(Directeur de thèse)
Dr. SAÏD EL ALAOUI	Directeur CovalAb Villeurbane	(Encadrant)

Remerciements

En premier lieu, je souhaite remercier chacun des membres de mon jury de thèse :

Dr Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel

Dr Pierre Martineau

Dr Eric Solary

Dr Catherine Paul

Dr Sandrine Wittmann

Dr Olivier Micheau

Dr Saïd El Alaoui

Je remercie très vivement le Docteur Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel et le Docteur Pierre Martineau qui me font l'honneur de prendre sur leur temps afin de juger mon travail.

Je tiens à remercier ensuite le Docteur Eric Solary, le Docteur Catherine Paul et le Docteur Sandrine Wittmann pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie également la région Bourgogne-Franche Comté avec les Fonds Européen de Développement Régional (FEDER) qui a permis le financement de cette thèse ainsi que Carmen Garrido pour en avoir permis la prolongation jusqu'à ma soutenance.

Enfin, je remercie plus particulièrement Olivier et Saïd de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet de thèse dans lequel je me suis réellement épanouie. Olivier, merci de m'avoir laissée être rapidement indépendante. Merci de ta disponibilité, de tes conseils et de nos discussions scientifiques intéressantes et stimulantes. Saïd, je te remercie de m'avoir ouvert les portes de CovalAb. Merci également de ton aide précieuse et efficace.

Je remercie ensuite tous les membres du 3^{ème} étage, pour l'entraide et les échanges. Merci à Andreea et Alexandrine qui nous facilitent la vie tous les jours. Et merci spécialement à Anne et PM qui m'ont fait entrer tout en douceur dans cette nouvelle vie.

Merci à Valérie Saint-Giorgio, responsable de la plateforme de zootechnie, pour ta réactivité et ta gentillesse.

Merci Sabrina Lareure et Éric Fourmaux (CovalAb) pour votre participation aux travaux de cette thèse. Sabrina, je n'oublierai pas ton accueil toujours chaleureux et agréable. Et Éric, je te remercie de ta gentillesse, ton humour et surtout pour tes discussions anti-corps, toujours à la pointe de la nouveauté!

Je remercie également tous les membres de mon équipe, Thibault, Andrei, Luciana, Damien, Nathalie, Nora, pour leur aide précieuse à différents moments de ma thèse. Et parce que la recherche ne se limite pas qu'aux expérimentations, j'adresse un remerciement particulier à la « team internationale », Rafael, Nilton, Mohamed et Cécile, pour tous ces fous-rires et ces bons moments partagés.

Enfin je tiens à remercier tout ceux qui n'étaient pas forcément présents mais qui m'ont accompagnée dans cette aventure.

Merci à ma famille, toujours là, à 2000 %. Je remercie ma mère qui m'a accompagnée dans le sprint final, ainsi que mon père, Silvia et Jean pour leur soutien.

Merci Dominique pour ton suivi et tes corrections (et ton fils!).

Merci à Flore, Fbelouns et Samuel, qui écoutent mes histoires trop longues depuis bien trop longtemps!

Merci à tous mes colocataires, Constance, Hilary, Juliette, Mumu, Greg et Manu, qui ont donné une jolie couleur à ma vie dijonnaise. Mention spéciale pour ma jumelle de thèse, jusqu'au jour de la soutenance! Merci de m'avoir accompagnée dans mes joies, mes peines mais surtout mes folies!

Pour finir, merci à toi François, mon compagnon de vie. Merci pour ta patience, ton aide, ta motivation et ton soutien à toute épreuve!

Table des matières

Table des matières	i
Table des figures	v
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations	xi
I INTRODUCTION	1
1 Le système TRAIL	1
1.1 Généralités sur le processus apoptotique	1
1.2 Généralités sur le développement tumoral	2
1.3 TRAIL, membre de la superfamille du TNF	5
1.3.1 Découverte de la superfamille du TNF	5
1.3.2 Découverte de TRAIL	7
1.3.3 Rôle physiologique de TRAIL, cytokine du système immunitaire	7
1.4 L'apoptose induite par le système TRAIL-TRAIL récepteurs	9
1.4.1 Les différents récepteurs de TRAIL	9
1.4.2 Mécanismes de l'apoptose induite par TRAIL	12
1.5 Régulation de l'apoptose et migration induite par le système TRAIL-TRAIL récepteurs	20
1.5.1 Mécanismes de régulation de l'apoptose	20
1.5.2 Induction des voies non-apoptotiques	23
1.6 TRAIL-Rs dans les différents cancers	26
1.6.1 Expression de TRAIL-Rs dans les différents cancers	26
1.6.2 DR4 et DR5, cibles de la thérapie anticancéreuse	28
2 Immunothérapies anticancéreuses	29
2.1 Les traitements contre le cancer	29
2.1.1 Traitements de routine	29
2.1.2 Les thérapies ciblées	30
2.1.3 La place des immunothérapies	30
2.2 Définition, structure et synthèse des anticorps	31
2.2.1 Structure des anticorps	32
2.2.2 Synthèse et spécificité des anticorps	37
2.2.3 Développements d'anticorps monoclonaux	39
2.3 Anticorps monoclonaux en oncologie	43
2.3.1 Mécanismes d'actions des anticorps monoclonaux	43

2.3.2	Ingénierie des anticorps	50
2.3.3	Le marché des anticorps anticancéreux	59
3	Anticorps monoclonaux et dérivés ciblant le système TRAIL	67
3.1	Essais cliniques de TRAIL	67
3.1.1	Première génération	67
3.1.2	Nouvelles versions de TRAIL	69
3.2	Anticorps monoclonaux ciblant DR4 et DR5 et essais cliniques	70
3.2.1	Anti-DR4	70
3.2.2	Anti-DR5	74
3.2.3	Limites	82
3.3	Nouveaux variants dérivants de TRAIL ou d'anticorps anti-DR4 et anti-DR5	84
3.3.1	Dérivés multivalents	84
3.3.2	Dérivés bi- et tri-spécifiques	84
3.3.3	Récepteurs d'antigènes chimériques, CARs	88
3.3.4	Dérivés d'immunoconjugés de TRAIL	89
4	Méthodes d'immunisations ADN pour l'obtention d'anticorps monoclonaux conformationnels	91
4.1	Principes et avantages de la méthode	91
4.2	Les différents types d'immunisations ADN	92
4.3	Les différents schémas d'immunisations	94
4.3.1	Le promoteur plasmidique	94
4.3.2	Les rappels	95
II	OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THÈSE	97
III	RÉSULTATS	101
5	Production des anticorps monoclonaux ciblant DR4 et DR5	103
5.1	Constructions plasmidiques	103
5.1.1	Production des plasmides pour les immunisations ADN	103
5.1.2	Production des récepteurs DR4-Fc et DR5-Fc recombinants	107
5.2	Protocoles expérimentaux	114
5.2.1	Schémas d'immunisations ADN	115
5.2.2	Suivi de la réponse immunitaire et fusions	116
5.3	Criblage des hybridomes obtenus par ELISA, Dot Blot et FACS	119
5.3.1	Criblage des clones anti-DR4 et anti-DR5 par tests ELISA	119
5.3.2	Reconnaissance des DR4 et DR5 conformationnels	121
5.3.3	Production des 21 anticorps d'intérêt	123
6	Caractérisation des anticorps monoclonaux ciblant DR4 et DR5	125
6.1	Caractérisation des anticorps purifiés	125
6.1.1	Reconnaissance des récepteurs non dénaturés	125
6.1.2	Spécificité des anticorps	127
6.2	Activité agoniste des anticorps anti-DR4 et anti-DR5 produits	129
6.2.1	Tests fonctionnels, sélection de 2 anticorps d'intérêt	129
6.3	Synergie des anticorps avec le ligand TRAIL	135

6.3.1	Tests fonctionnels, sélection de 4 anticorps potentialisateurs	135
6.3.2	Tests fonctionnels, sélection de 3 anticorps potentiellement inhibiteurs	140
6.4	Relation affinité-fonction	141
6.5	L'anticorps C#16, agoniste de DR4, induit efficacement l'apoptose des cellules cancéreuses	144
6.5.1	C#16 induit l'apoptose sur différentes lignées cancéreuses	144
6.5.2	L'AcM-C#16 (anti-DR4) ralentit la pousse tumorale	147
6.6	Conclusion intermédiaire	150
IV	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	151
V	CONCLUSION GÉNÉRALE	169
VI	ANNEXES	173
A	Matériels et méthodes	175
B	Stratégie de production des vecteurs	187
C	Exemples de criblage par ELISA des hybridomes en plaque 96-puits	193
D	Exemples de tests au bleu de méthylène des anticorps anti-DR4	197
E	Criblage de l'AcM-C#16 et de l'AcM-C#11 sur l'ensemble des 10 lignées cancéreuses	199
F	Exemple représentatif de la taille des tumeurs de chaque groupe des expériences <i>in-vivo</i>	201
G	Article I	203
H	Article II en révision dans <i>Cell Death and Disease</i>	235
I	Curriculum Vitae	271
VII	BIBLIOGRAPHIE	273

Table des figures

1.1	Différences entre la mort cellulaire par apoptose et la nécrose.	2
1.2	Oncogenèse et développement tumoral	3
1.3	Les différentes caractéristiques des cellules cancéreuses	4
1.4	Les membres de la superfamille du TNF et leurs récepteurs	6
1.5	Représentation schématique de la composition des récepteurs TRAIL . . .	10
1.6	Représentation schématique de la liaison de TRAIL à ses récepteurs	11
1.7	Structure cristallographique des complexes TRAIL/récepteurs	13
1.8	Modélisation du pré-assemblage de DR4 et DR5 via PLAD	14
1.9	Différentes exigences de réticulation de DR4 et DR5	15
1.10	Signalisation pro-apoptotique induite par TRAIL, voie extrinsèque (cellules de type I)	17
1.11	Signalisation pro-apoptotique induite par TRAIL, voie intrinsèque (cellules de type II)	19
1.12	Régulateurs des voies extrinsèque et intrinsèque	21
1.13	Complexe secondaire induit par TRAIL	24
2.1	Représentation schématique d'une immunoglobuline	32
2.2	Représentation schématique des différentes classes d'immunoglobulines . .	33
2.3	Glycosylation d'une IgG	36
2.4	Réarrangement génomique et diversité des immunoglobulines	37
2.5	Représentation tri-dimensionnelle des régions complémentaires-déterminantes (CDRs) responsables de la liaison anticorps-antigène	38
2.6	Développement des cellules B et biosynthèse des immunoglobulines	39
2.7	Production d'anticorps monoclonaux par la technique d'hybridomes murins	42
2.8	Représentation schématique des différents mécanismes d'actions des anticorps monoclonaux en oncologie induits par le Fab.	44
2.9	Représentation schématique des différents mécanismes d'actions des anticorps monoclonaux en oncologie induits par le Fc	47
2.10	Représentation schématique des différents récepteurs à la région Fc des immunoglobulines	48
2.11	Représentation schématique des différents types d'humanisation d'anticorps	52
2.12	Techniques de production d'anticorps monoclonaux humains	53
2.13	Représentation schématique des différents formats d'anticorps	54
3.1	Représentation schématique des principales nouvelles version de TRAIL recombinant	69
3.2	Représentation schématique des anticorps anti-DR4	72
3.3	Représentation schématique des anticorps anti-DR5	80
3.4	Représentation schématique des scFv-TRAIL et dérivés bispécifiques	85

3.5	Représentation schématique des dérivés anti-DR4/DR5 et anticorps bispécifiques	87
3.6	Représentation schématique des récepteurs chimérique CAR et des dérivés de TRAIL-ADC	89
4.1	Schéma d'injection hydrodynamique d'ADN dans la veine caudale	93
5.1	Cartes des plasmides pour les immunisations ADN DR4-pCR3	103
5.2	Cartes des plasmides pour les immunisations ADN DR5-pCAGGS	104
5.3	Construction du plasmide OM1461 mFLT3-pCAGGS	105
5.4	Construction du plasmide OM1463 GMCSF-pCAGGS	106
5.5	Séquençage du clone C2 du plasmide OM680 (pCAGGS-DR5)	107
5.6	Construction du plasmide OM1450 DR4-Fc	108
5.7	Construction du plasmide OM1449 DR5-Fc	108
5.8	Cartes des plasmides pour la production des récepteurs recombinants . . .	109
5.9	Production et purification des récepteurs recombinants DR4-Fc et DR5-Fc	110
5.10	Site de clivage du fragment Fc des récepteurs de fusions DRs-Fc	111
5.11	Clivage du fragment Fc des récepteurs de fusions DRs-Fc	112
5.12	Validation des récepteurs recombinants	113
5.13	Schémas des immunisations ADN	114
5.14	Suivi de la réponse humorale au cours des immunisations	117
5.15	Sélection des souris en vue d'une fusion de rate post-immunisation DR5-pCAGGS	118
5.16	Résultats ELISA des surnageant d'hybridomes anti-DR4 et anti-DR5 . . .	120
5.17	Criblage des surnageants d'hybridomes anti-DR4 et anti-DR5	122
5.18	Criblage des surnageants d'hybridomes anti-DR5	123
6.1	Résultats ELISA et Dot Blot des anticorps anti-DR4 et anti-DR5 produits	126
6.2	Reconnaissance des récepteurs à la surface cellulaire par les anticorps anti-DR4 et anti-DR5 produits	128
6.3	Évaluation de la cytotoxicité des anticorps par bleu de méthylène	130
6.4	Évaluation de l'activité agoniste des anticorps adsorbés sur plaque ELISA par bleu de méthylène	131
6.5	Effet agoniste de l'anticorps AcM-C#16 sur un panel de 10 lignées cancéreuses humaines	133
6.6	Apoptose induite par les anticorps anti-DR4 et anti-DR5 agonistes	134
6.7	Évaluation de la cytotoxicité de la combinaison des AcMs avec TRAIL . .	136
6.8	Effet potentialisateur de l'anticorps AcM-C#11 sur un panel de 10 lignées cancéreuses humaines	138
6.9	Les traitements par les AcMs peuvent potentialiser l'action de TRAIL . . .	139
6.10	Détermination de l'affinité des anticorps anti-DR4 et anti-DR5 produits . .	142
6.11	Carte des taux K_a/K_{off}	143
6.12	Apoptose induite par l'AcM-C#16, présentation des résultats en cytométrie en flux	145
6.13	Apoptose induite par l'AcM-C#16, présentation des résultats en western blot	146
6.14	L'AcM-C#16 réduit la croissance tumorale dans les modèles de xénogreffes pré-établies	148
6.15	L'AcM-C#16 réduit la croissance tumorale dans les modèles de xénogreffes <i>de novo</i>	149

6.16	Vectorisation des anticorps anti-DR4 et anti-DR5	156
6.17	Première hypothèse du mode d'action de l'anti-DR4 agonsite AcM-C#16 .	160
6.18	Deuxième hypothèse du mode d'action de l'anti-DR4 agoniste AcM-C#16	161
6.19	Deuxième hypothèse du mode d'action de l'anti-DR5 agoniste AcM-C#22	162
6.20	Première hypothèse du mode d'action des anticorps potentialisateurs . . .	163
6.21	Deuxième hypothèse du mode d'action des anticorps potentialisateurs . . .	164
6.22	Troisième hypothèse du mode d'action des anticorps potentialisateurs . . .	165
6.23	Représentation cristallographique de la troisième hypothèse du mode d'action des anticorps potentialisateurs	166
A.1	Principe de l'assemblage Gibson	177
A.2	Représentation schématique du principe de l'Octet	182
B.1	Stratégie de construction du plasmide OM1461 mFLT3-pCAGGS	188
B.2	Stratégie de construction du plasmide OM1463 mGMCSF-pCAGGS	189
B.3	Stratégie de construction du plasmide OM680 DR5-pCAGGS	190
B.4	Stratégie de construction du plasmide OM1450 DR4-Fc puro	191
B.5	Stratégie de construction du plasmide OM1449 DR5-Fc puro	192
C.1	Résultats du test ELISA après fusion de la souris DR4-pCR3 R	194
C.2	Résultats du test ELISA après fusion de la souris DR5-pCAGGS 2V	195
C.3	Résultats du test ELISA après fusions des souris DR5-pCAGGS 1Blc et 2Blc	195
D.1	Évaluation de la cytotoxicité de quelques AcMs anti-DR4 seuls ou combinés à TRAIL	198
E.1	Effet agoniste et potentialisateur des anticorps anti-DR4 AcM-C#16 et AcM-C#11 sur un panel de 10 lignées cancéreuses humaines	199
F.1	Test des sérums de souris à partir de l'expérience de tumeurs pré-établies .	201
F.2	Évaluation <i>in situ</i> de la taille des tumeurs de chacune des expériences <i>in vivo</i>	202

Liste des tableaux

2.1	Propriétés des isotypes et sous-classes d'immunoglobulines	34
2.2	Anticorps anticancéreux sur le marché période 1997 - 2007	63
2.3	Anticorps anticancéreux sur le marché période 2008 - 2015	64
2.4	Anticorps anticancéreux sur le marché période 2015 - août 2018	65
3.1	Essais cliniques incluant Mapatumumab seul ou en combinaison	71
3.2	Essais cliniques des anticorps anti-DR5	75
3.3	Essais cliniques des anticorps anti-DR5 suite	76
5.1	Tableau récapitulatif des injections par souris lors des immunisations DR4- pCR3	115
5.2	Tableau récapitulatif des injections par souris lors des immunisations DR5- pCAGGS	116
6.1	Paramètres cinétiques des anticorps DR4 et DR5 dirigés contre DR4-Fc et DR5-Fc en utilisant la méthode BLI (BioLayer Interferometry)	142
6.2	Affinité des différents anticorps anti-DR4 et anti-DR5 développés	156

Liste des abréviations

5-FU : 5-Fluorouracile	Bid : <i>BH3-interacting domain death agonist</i>
7-AAD : 7-Aminoactinomycine	BsAb : <i>Bispecific Antibody</i>
A	C
a.a : Acide Aminé	CDC : <i>Complement-Dependent Cytotoxicity</i>
Acs : Anticorps	CDR : <i>Complementary Determining Regions</i>
AcM : Anticorps Monoclonaux	cFLIP _{L/S} : <i>Cellular Flice Inhibitory Protein long/short</i>
ADC : <i>Antibody-Drug Conjugate</i>	C _H : <i>Constant Heavy region</i>
ADCC : <i>Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity</i>	CHO : <i>Chinese Hamster Ovary</i>
ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion de l'Anticorps	C _L : <i>Constant Light region</i>
ADN : Acide Désoxyribonucléique	cIAP : <i>Cellular Inhibitor of Apoptosis</i>
ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire	CRD : <i>Cystein-Rich Domain</i>
ADPH : <i>Antibody-Dependent Phagocytosis</i>	CTLA-4 : <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
Akt : <i>Activated protein kinase</i>	D
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché	DC : <i>Dendritic Cell</i>
Apaf-1 : <i>Apoptotic Protease activating factor</i>	DcR : <i>Decoy Receptor</i>
ARN : Acide Ribonucléique	DD : <i>Death Domain</i>
ARNm : ARN messenger	DED : <i>Death Effector Domain</i>
B	DIABLO : <i>Direct IAP binding protein with low pI</i>
Bak : <i>Bcl-2 antagonist killer 1</i>	DISC : <i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
Bax : <i>Bcl-2 associated x protein</i>	DR : <i>Death Receptor</i>
Bcl-2 : <i>B-cell lymphoma 2</i>	E
Bcl-xL : <i>Bcl-2-related gene X, long isoform</i>	EGFR : <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
BCR : <i>B-Cell Receptor</i>	

ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

EMA : *European Medicines Agency*

ERK : *Extracellular signal-Regulated Kinase*

F

Fab : *Fragment antigen binding*

FACS : *Fluorescent-Activated Cell Sorter*

FADD : *Fas-Associated Death Domain*

FasL/CD95L : *Fas Ligand / CD95 ligand*

Fc : *Fragment cristallisable d'une immunoglobuline*

FcR : *Fc Receptor*

FcγR : *Fc γ Receptor*

FcRn : *Fc Receptor neonatal*

FITC : *Fluoresceine isothiocyanate*

FR : *Framework Region*

G

GM-CSF : *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*

GPI : *Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol*

H

HAMA : *Human Anti-Mouse Antibodies*

HCMV : *Human cytomegalovirus*

HER-2 *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*

I

IAP : *Inhibitors of Apoptosis Protein*

IFN : *Interféron (cytokine)*

Ig : *Immunoglobulin*

IL : *InterLeukine (cytokine)*

INca : *Institut National du Cancer*

ITAM : *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*

ITIM : *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs*

J

JNK : *c-Jun N-terminal Kinase*

K

KO : *Knock Out*

L

LPS : *Lipo-Polysaccharide*

L_T : *Lymphocyte T*

M

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*

Mcl-1 : *Myeloid cell leukemia 1*

N

NF-κB : *Nuclear factor Kappa-B*

NK : *Natural Killer*

O

OMS : *Organisation Mondiale de la Santé*

OPG : *Ostéoprotégérine*

P

PARP : *Poly(ADP-Ribose) Polymérase*

PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cell*

PD-L1 : *Programmed Death Ligand-1*

PD-1 : *Programmed Death-1*

PI3K : *Phosphoinositide triphosphate Kinase*

PLAD : *Pre-Ligand assembly domain*

R

RIP1 : *Receptor Interacting Protein 1*

S

ScFv : *Single-chain variable Fragments*

Smac : *Second Mitochondrial Activator of Caspases*

SVF : *Sérum de Veau Foetal*

T

TAA : *Tumor-Associated Antigen*

TCR : *T-Cell Receptor*

TNF : *Tumor necrosis factor*

TNF-R : <i>TNF Receptor</i>	V
TRAIL : <i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>	VEGF : <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
TRAIL-R : <i>TRAIL-Receptor</i>	VEGFR : <i>VEGF Receptor</i>
TRAIL-R1 /DR4 : <i>TRAIL-Receptor 1/Death Receptor 4</i>	V _H : <i>Variable Heavy region</i>
TRAIL-R2 /DR5 : <i>TRAIL-Receptor 2/Death Receptor 5</i>	V _L : <i>Variable Light region</i>
TRAIL-R3 /DcR1 : <i>TRAIL-Receptor 3/Decoy Receptor 1</i>	W
TRAIL-R4 /DcR2 : <i>TRAIL-Receptor 4/Decoy Receptor 2</i>	WT <i>Wild Type</i>
	X
	XIAP <i>X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein</i>

Première partie

INTRODUCTION

Chapitre 1

Le système TRAIL

1.1 Généralités sur le processus apoptotique

L'apoptose est un processus naturel qui se met en place afin d'éliminer les cellules indésirables du corps humain. Il survient à la fois au cours du développement embryonnaire et tout au long de la vie d'un individu [Kerr et al., 1972] [Strasser et al., 2000] [Taylor et al., 2008]. C'est un élément indispensable de l'homéostasie cellulaire, qui contrôle la croissance des cellules normales et donc la densité cellulaire dans les tissus, qui élimine les cellules non viables, et qui participe au bon fonctionnement du système immunitaire [Strasser, 2005] [Bergmann and Steller, 2010] [Nemazee, 2017]. Ce phénomène est décrit comme une mort cellulaire programmée et s'apparente à un suicide cellulaire. Il est caractérisé biochimiquement par des mécanismes ATP-dépendants au niveau des mitochondries, morphologiquement par une condensation de la chromatine et la présence de vésicules apoptotiques, et physiologiquement par l'absence d'inflammation (figure 1.1). Les cellules ayant reçu un signal apoptotique vont initier tout un processus aboutissant à leur mort et leur élimination de l'organisme. Une mort cellulaire par apoptose est caractérisée par une condensation de la chromatine, une fragmentation de l'ADN et une dégradation des différents composants cellulaires qui sont évacués par des vésicules ou corps apoptotiques. Ces vésicules sont ensuite rapidement phagocytées par les cellules immunitaires. Les cellules apoptotiques ne relarguent pas leur constituants cellulaires dans le tissu interstitiel environnant, prévenant ainsi une réaction pro-inflammatoire [Kono and Rock, 2008].

D'autres formes de mort cellulaire, ayant des caractéristiques différentes et distinctes sont décrites comme la nécrose, la mort par autophagie, la nécroptose ou encore plus récemment la ferroptose. Toutefois, l'apoptose est physiologiquement le mécanisme majeur de la mort cellulaire [Galluzzi, 2018].

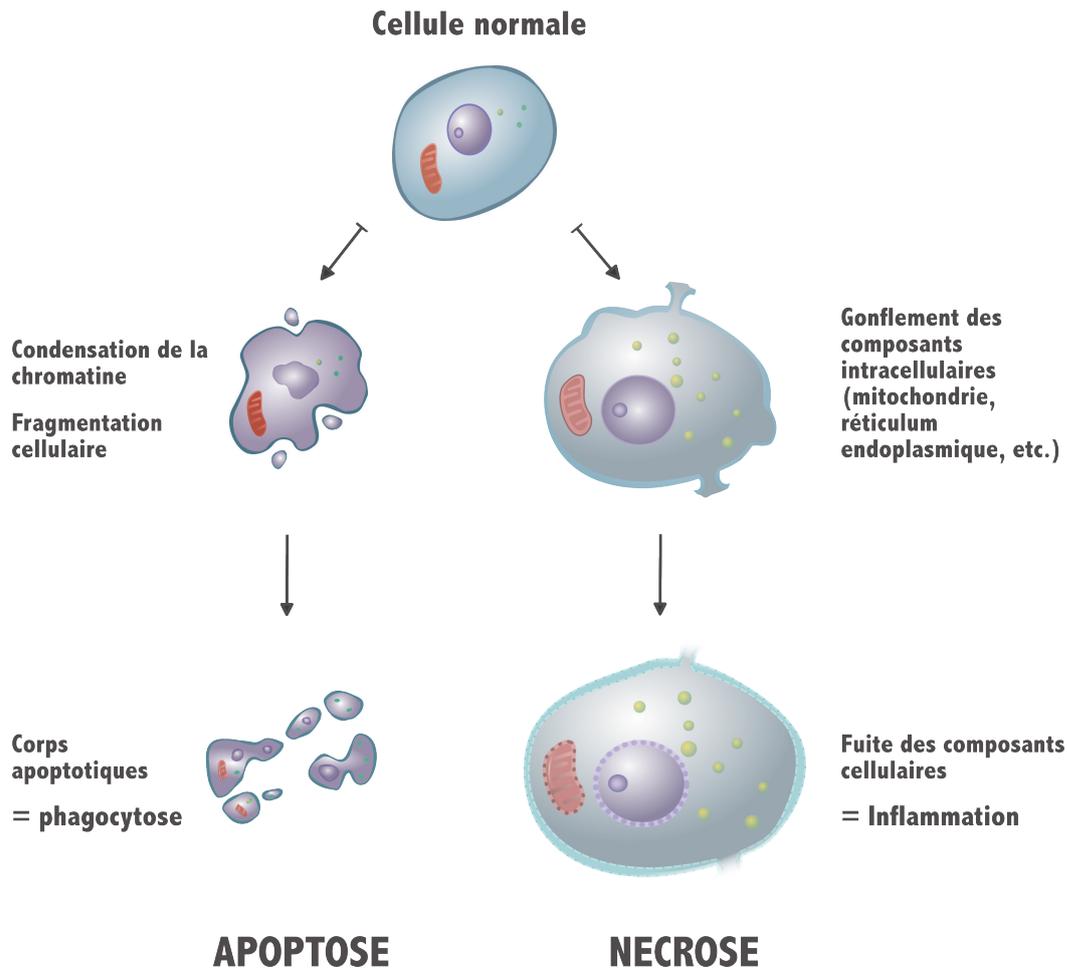


FIGURE 1.1 – Différences entre la mort cellulaire par apoptose et la nécrose.

L'apoptose est un phénomène extrêmement précis avec une exactitude d'action remarquable. Cependant, lorsque ce phénomène est dérégulé, une apoptose inappropriée peut engendrer de nombreux dysfonctionnements cellulaires et peut conduire à des pathologies sévères comme la neurodégénération (dans le cas d'une apoptose trop importante) ou encore le développement d'un cancer (dans le cas d'une apoptose déficiente) [Danial and Korsmeyer, 2004].

1.2 Généralités sur le développement tumoral

Les cancers demeurent la deuxième cause de mortalité mondiale d'après l'Organisation Mondiale de la Santé, avec une incidence de 400 000 nouveaux cas en France en 2017 (Institut National du Cancer). Cependant, la mortalité tend à baisser grâce aux progrès technologiques, des diagnostics plus précoces aux traitements de plus en plus efficaces. Ces pathologies se développent à partir de cellules saines qui se transforment en tumeur maligne. Ce processus multigénique, complexe et évolutif, est causé par de nombreux phénomènes externes, internes et/ou génétiques. Le développement tumoral se met en

place lorsqu'une cellule, initialement saine, dérive sous l'action de plusieurs facteurs, et voit son programme génétique complètement altéré. Ces altérations très caractéristiques donnent à la cellule cancéreuse la capacité de se multiplier infiniment au sein d'un tissu normal, au détriment de ses caractéristiques et fonctions d'origine. Son développement est alors incontrôlable, et la masse tumorale va venir envahir tout le tissu, qui va alors perdre sa fonction (figure 1.2). Au cours du développement tumoral, certaines cellules cancéreuses peuvent migrer vers d'autres tissus et entamer le même processus de colonisation, formant ainsi des métastases. C'est le stade le plus critique pour la survie de l'individu. Ces atteintes, trop importantes et généralisées, provoquent 90% des décès par cancer.

Le développement du cancer se fait en trois étapes : l'initiation, la promotion et l'échappement ou progression. Dans un premier temps, une lésion de l'ADN va endommager une cellule saine, initiant sa transformation en une cellule cancéreuse. Dans un second temps, la cellule transformée se développe et prolifère en formant un groupe de cellules transformées, c'est la promotion. Dans un troisième et dernier temps, la cellule transformée acquiert les caractéristiques d'une cellule cancéreuse et colonise le tissu d'origine puis les tissus environnants. En 2002, Dunn et coll. ont mis en évidence le concept d'immunosurveillance et d'immuno-editing, démontrant que la masse tumorale doit également échapper au système immunitaire [Dunn et al., 2002]. En effet, de nombreuses cellules se transforment chaque jour. Mais ces cellules anormales sont rapidement reconnues par le système immunitaire puis éliminées. La tumeur est alors bénigne. Lorsque l'élimination par le système immunitaire n'est pas assez efficace et/ou que la tumeur est trop agressive, celle-ci devient maligne. La masse tumorale prend alors le dessus sur les cellules immunitaires infiltrées et les cellules du tissu, et le cancer se développe.

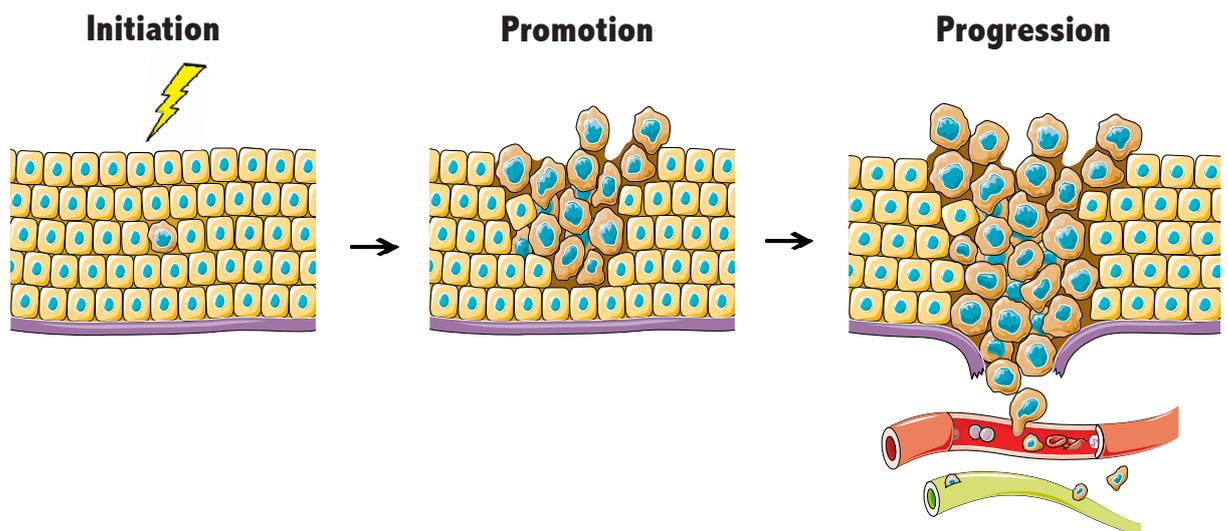


FIGURE 1.2 – Oncogenèse et développement tumoral

Un cancer peut se développer au sein de nombreux types cellulaires, tous les cancers sont donc différents. On peut cependant regrouper ces pathologies en tant que « cancer » lorsqu'elles présentent les caractéristiques distinctes et complémentaires suivantes (figure 1.3) [Hanahan and Weinberg, 2000] [Hanahan and Weinberg, 2011] :

- acquisition d'une instabilité du génome et mutations
- reprogrammation du métabolisme énergétique
- maintien de la signalisation proliférative
- échappement aux suppresseurs de croissance
- acquisition de l'immortalité réplivative
- résistance à la mort cellulaire
- induction d'une angiogénèse accrue
- promotion de l'inflammation stimulant la tumeur
- échappement à la destruction par le système immunitaire
- développement d'un pouvoir invasif et métastatique

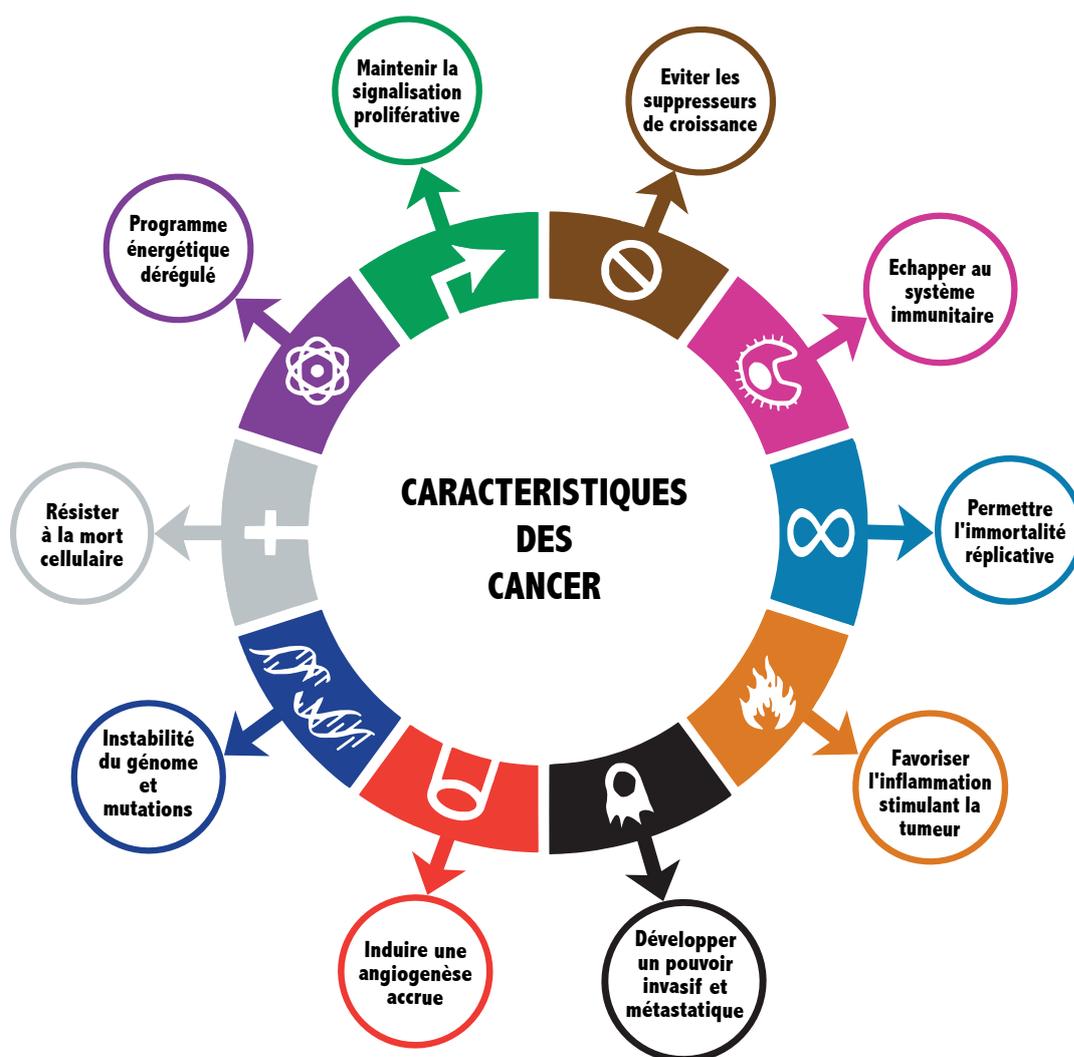


FIGURE 1.3 – Les différentes caractéristiques des cellules cancéreuses, d'après Hanahan et Weinberg, 2011

L'une des caractéristiques les plus importantes des cellules cancéreuses est leur capacité à échapper à l'apoptose. Les tentatives pour induire la mort des cellules tumorales ont conduit à une recherche mondiale intense, commençant par la chimiothérapie conventionnelle du milieu du 20ème siècle (les antifolates par exemple) et allant jusqu'aux nouvelles approches plus sélectives comme les inhibiteurs (par exemple l'imatinib, inhibiteur de protéine kinase associé au BCR) ou encore les anticorps monoclonaux [DeVita and Chu, 2008] [RN4, 2017] [Hendriks et al., 2017] [Marjaneh et al., 2018].

1.3 TRAIL, membre de la superfamille du TNF

1.3.1 Découverte de la superfamille du TNF

Dès 1975, le ciblage des membres de la superfamille des récepteurs au TNF (tumor necrosis factor), et en particulier, la découverte que le TNF possède de puissantes propriétés de destruction a permis d'identifier des cytokines endogènes ayant des propriétés antitumorales [Carswell et al., 1975].

C'est en 1989 que l'existence d'une superfamille du TNF (TNFSF) et leurs récepteurs (TNFRSF) a été établie. Elle se compose de deux familles de gènes incluant 22 ligands et 29 récepteurs (figure 1.4) dont les interactions sont complexes. Un ligand peut cibler plusieurs récepteurs de la superfamille et inversement, un récepteur peut être ciblé par plusieurs ligands. Structurellement, les membres de la superfamille du TNF (TNFSF) sont des protéines transmembranaires de type II, comprenant en position C-terminale un domaine d'homologie avec le TNF (THD) d'environ 150 résidus [Bodmer et al., 2002]. La plupart des ligands sont accrochés à la membrane cytoplasmique sous forme d'homotrimères non covalents, mais la moitié environ peut être retrouvée sous forme soluble car ils abritent un site de clivage protéolytique [Black et al., 1997] [Locksley et al., 2001]. De manière intéressante, pour la majorité des membres de la TNFSF, seule la forme liée à la membrane permet d'induire un signal compétent. La forme soluble fixe les récepteurs mais doit souvent être homomultimérisée pour amorcer une signalisation. Ces membres de la TNFSF jouent un rôle dans l'inflammation, la co-stimulation des cellules immunitaires, l'organogenèse et l'apoptose [Bodmer et al., 2002]. Le TNF par exemple, promeut les réponses inflammatoires et est impliqué dans les pathologies auto-immunes [Carswell et al., 1975] [Ruddle et al., 1990]. D'autres ligands, incluant Fas et TRAIL, les plus ciblés dans les thérapies anti-cancéreuses, régulent l'apoptose induite par l'activation des cellules de l'immunité innée et acquise [Ashkenazi, 2002].

Les récepteurs apparentés, TNFRSF, sont majoritairement des protéines transmembranaires de type I [Naismith et al., 1996]. Ils peuvent également être convertis en molécules solubles, soit par détachement de la membrane (souvent médié par des métalloprotéases), ou via l'épissage alternatif des ARNm. Les TNFRSF sont caractérisés par leur domaine extracellulaire comprenant un nombre variable de domaines riches en cystéines

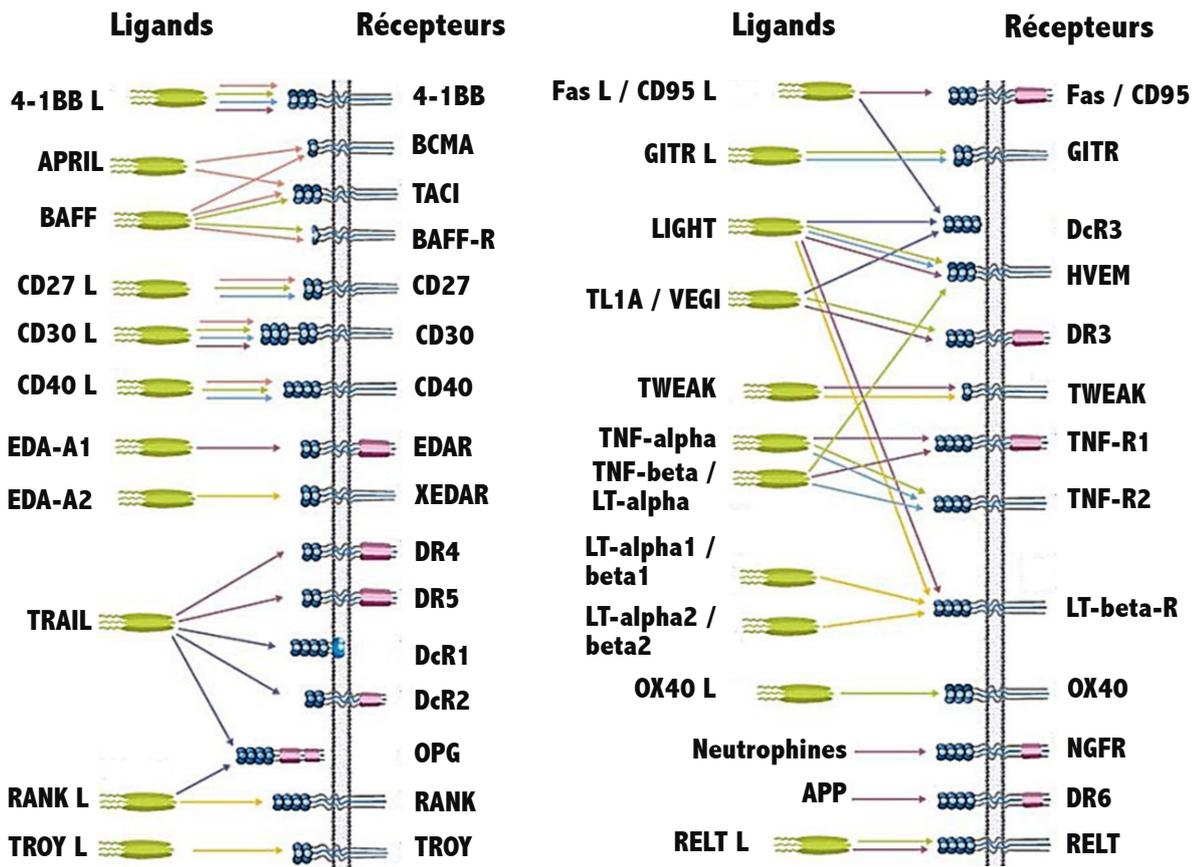


FIGURE 1.4 – Les membres de la superfamille du TNF et leurs récepteurs. Les flèches correspondent aux liaisons de chaque ligand (L) à leurs différents récepteurs. Étant l'unique ligand interagissant avec 5 récepteurs différents, TRAIL est le ligand le plus complexe de la famille.

(CRDs), éléments critiques pour la liaison avec le THD de leur ligand. Au niveau intracellulaire, la présence d'un domaine de mort (DD) caractéristique permettant des interactions protéine-protéine, définit le sous-groupe des récepteurs de mort (DR) de la TNFRSF [Bodmer et al., 2002]. Actuellement, ce sous-groupe de DR se compose du TNFR1, Fas, DR3, TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), DR6 et du EDAR.

Initialement très prometteur, le TNF a malheureusement présenté une toxicité inflammatoire significative dans les essais cliniques, empêchant son utilisation chez l'homme dans les traitements contre les cancers [Lejeune et al., 1998]. Toutefois, à la fin des années 80, la découverte de deux anticorps ciblant Fas / CD95 [Trauth et al., 1989] [Yonehara et al., 1989] a suscité un intérêt majeur dans l'identification des membres de la famille liés au TNF [Smith et al., 1994] [Wiley et al., 1995]. Plusieurs autres protéines homologues présentant des propriétés pro-apoptotiques ont été rapidement découvertes, comme FasL, le ligand apparenté à Fas / CD95 [Suda et al., 1993], ou encore TRAIL (*TNF related apoptosis inducing ligand*) [Ashkenazi et al., 1996] [Wiley et al., 1995] et ses récepteurs agonistes [Schneider et al., 1997a] [MacFarlane et al., 1997] [Walczak et al., 1997] [Marsters et al., 1997]. Mais une fois encore, alors que FasL ou les anticorps ciblant

Fas / CD95 présentent de puissantes capacités pro-apoptotiques, leur utilisation en clinique a été compromise par la découverte que l'anticorps monoclonal α -Fas induit une hépatotoxicité fulminante et létale *in-vivo* [Ogasawara et al., 1993]. Au contraire, TRAIL a montré très tôt une activité tumoricide consécutive et s'est avéré sans risque dans les modèles animaux [Walczak et al., 1999].

1.3.2 Découverte de TRAIL

TRAIL, également connu sous le nom de ligand Apo-2, est une cytokine homotrimerique membre de la famille du TNF découverte en 1995 [Wiley et al., 1995]. Sa capacité à se lier à 5 récepteurs différents fait de lui le ligand le plus complexe de la famille du TNF (TNFSF) (figure 1.4). Cette protéine transmembranaire de type II est composée de 281 aa et contient le THD partagé par tous les membres de la TNFSF. En revanche, il possède un résidu de cystéine non apparié en position 230, où d'autres ligands de la famille ont un pont disulfure, permettant la liaison entre les trois monomères par un ion zinc, essentiel à la stabilité du trimère et à son activité pro-apoptotique [Bodmer et al., 2000b]. TRAIL est localisé sur le chromosome 3q26, il s'étend sur environ 20 kb et contient cinq exons. Cette cytokine a suscité l'intérêt des scientifiques en raison de sa capacité à engager spécifiquement l'apoptose des cellules cancéreuses [Micheau et al., 2013]. APO2L/TRAIL montre une efficacité non seulement dans les cellules tumorales, mais également dans des lignées de tumeurs primaires, provenant directement de patients. TRAIL peut ainsi induire de manière robuste la mort cellulaire programmée dans un large éventail de cellules cancéreuses, sans nuire aux tissus normaux [Ashkenazi et al., 1999]. TRAIL, l'unique ligand de la TNFSF présentant une telle spécificité et de faible toxicité, est un agent anticancéreux très prometteur. L'autre avantage principal de TRAIL est son indépendance vis-à-vis de P53, un gène suppresseur de tumeur dont l'intégrité est, la plupart du temps, essentielle au bon fonctionnement des médicaments chimiothérapeutiques classiques des patients atteints de cancer [DeVita and Chu, 2008]. Les mutations ou altérations de P53 surviennent souvent au cours de l'oncogenèse et sont associées à une résistance à la chimiothérapie. Il a donc été suggéré que TRAIL est capable d'exercer son activité tumoricide dans un cadre plus large que les chimiothérapies conventionnelles.

1.3.3 Rôle physiologique de TRAIL, cytokine du système immunitaire

Rôle dans l'immunosurveillance anti-tumorale

TRAIL est naturellement présent en tant que trimère à la surface des cellules actives de l'immunité innée et acquise, telles que les cellules NK (Natural Killer), les cellules dendritiques (CD), les macrophages, les monocytes ou encore les lymphocytes T effecteurs [Ashkenazi et al., 1999]. TRAIL joue un rôle important dans la formation et

la régulation du système immunitaire ainsi que dans l'immunosurveillance tumorale et virale [Lee et al., 2002] [Wang and El-Deiry, 2003] [Smyth et al., 2003]. TRAIL endogène est naturellement associé aux membranes des cellules immunitaires activées et, en tant que tel, il contribue à l'induction de l'apoptose des cellules indésirables [Zamai et al., 1998] [Griffith et al., 1999b] [Halaas et al., 2000] [Mirandola et al., 2004] [Brincks et al., 2008]. Des études chez la souris ont montré une cancérogenèse plus importante sur des souches déficientes pour TRAIL, l'apparition ou la croissance tumorale étaient favorisées [Cretney et al., 2002] [Sedger et al., 2002].

D'autres études ont démontré que le niveau de TRAIL est extrêmement faible dans les cellules immunitaires inactivées [Takeda et al., 2001] [Ehrlich et al., 2003]. L'expression de TRAIL est quasi-nulle dans les lymphocytes fraîchement isolés, et seul un nombre très restreint de cellules NK naïves exprime TRAIL. La stimulation des cellules du système immunitaire, inné ou acquis, comme les cellules dendritiques, les cellules NK ou les lymphocytes effecteurs, entraîne l'expression de TRAIL à leur surface, améliorant ainsi leur cytotoxicité envers les cellules tumorales primaires et métastatiques [Liu et al., 2001]. Il a été montré que l'expression de TRAIL sur les cellules NK semble être régulée de manière autocrine, par la sécrétion d'interféron (IFN) - γ [Takeda et al., 2001]. On peut également émettre l'hypothèse que TRAIL pourrait stimuler les réponses anti-tumorales en modifiant le micro-environnement tumoral, en augmentant la qualité de la présentation de l'antigène ainsi que l'infiltration des cellules immunitaires dans le tissu.

Autres rôles physiologiques de TRAIL

En plus du rôle de TRAIL dans la surveillance anti-tumorale, cette cytokine pourrait aussi être impliquée dans la régulation des infections, des lymphocytes et de l'auto-immunité. Entre autres, TRAIL présent à la surface des cellules NK est impliqué dans la défense contre les infections virales du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) et les macrophages infectés par le cytomégalovirus humain (HCMV) sont plus sensibles à l'induction d'apoptose via TRAIL [Sedger et al., 1999] [Sato et al., 2001].

Il a également été démontré que TRAIL régule les lymphocytes T CD8 cytotoxiques (LTC) s'activant seuls, en retardant leur seconde expansion clonale [Janssen et al., 2005] [Badovinac et al., 2006]. Récemment, une étude sur les cellules T modifiées par des récepteurs-antigènes chimériques (CAR-T) a présenté TRAIL comme un des régulateurs de leur survie [Tschumi et al., 2018].

D'autres études ont rapporté que la présence de TRAIL semble corrélée à des maladies auto-immunes. De manière non exhaustive, le taux sérique de TRAIL soluble est augmenté chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé [Lub-de Hooge et al., 2005]. En revanche, il a été constaté que l'induction de TRAIL peut servir de marqueur positif potentiel dans la détermination de la sensibilité au traitement par interférons β chez les patients atteints de sclérose en plaques [Wandinger et al., 2003].

1.4 L'apoptose induite par le système TRAIL-TRAIL récepteurs

1.4.1 Les différents récepteurs de TRAIL

TRAIL peut se fixer sur deux types de récepteurs : les récepteurs de mort ou agonistes (DR) et les récepteurs leurres ou antagonistes (DcR). À ce jour, cinq récepteurs TRAIL ont été identifiés chez l'homme : DR4, DR5, DcR1, DcR2 et ostéoprotégérine (OPG) (figure 1.5). Ces récepteurs, comme tous les membres de la superfamille du TNF, sont caractérisés par un domaine extracellulaire riche en cystéines, essentiel à la liaison de leur ligand apparenté [Bodmer et al., 2002]. Seulement deux d'entre eux, les récepteurs de morts agonistes DR4 et DR5, hébergent le domaine de mort (DD) requis et suffisant pour activer la machinerie apoptotique. Ils représentent par conséquent des cibles prometteuses pour le traitement des cancers. Les trois autres récepteurs, DcR1, DcR2 et OPG sont incapables de transmettre une signalisation intracellulaire, ce sont les récepteurs leurres.

Les récepteurs agonistes

DR4 et DR5, tous les deux localisés sur le chromosome 8p21.3, furent identifiés en 1997 [Walczak et al., 1997] [Pan et al., 1997] [MacFarlane et al., 1997] [Schneider et al., 1997a]. Chacun de ces deux récepteurs comporte un domaine extracellulaire composé de deux CRD complets, indispensables à la liaison au TRAIL, et un CRD considéré comme partiel (figure 1.5 et 1.6). Ce CRD, situé à l'extrémité N-terminal, c'est-à-dire le plus éloigné de la membrane, est également appelé PLAD (*pre-ligand assembly domain*) et serait responsable du regroupement des récepteurs, indépendamment de la liaison du ligand [Chan et al., 2000] [Siegel et al., 2000]. La partie intracellulaire de DR4 et DR5 contient un domaine de mort complet, crucial pour la transmission du signal. Le domaine de mort (DD), d'environ 80 aa, structurée en six hélices α , intervient dans les interactions protéiques homotypiques [Tartaglia et al., 1993] [Nagata, 1997]. Il y a trois autres motifs topologiquement similaires : le domaine effecteur de mort (DED), le domaine de recrutement des caspases (CARD) et le domaine pyrine (PYD) [Fesik, 2000]. Malgré les similitudes structurelles, la différence de charge à leur surface permet la spécificité d'association. DR4 et DR5 partagent 58% de similarité dans leur domaine extracellulaire et 65% de similitude dans leur domaine intracellulaire [Schneider et al., 1997a].

DR4, est une protéine de 468 aa, également connue sous les noms de TRAIL-R1, TNFRSF10A, CD261 et Apo2. Elle contient un site de *N*-glycosylation au niveau de l'asparagine N156 [Yoshida et al., 2007][Dufour et al., 2017b].

DR5 est *O*-glycosylé sur plusieurs sérines-thréonines à l'intérieur et autour des CRD 2 et 3 [Wagner et al., 2007]. Il est également connu sous les noms de TRAIL-R2, TNFRSF10B, CD262, KILLER / Ly98 et TRICK2. Deux isoformes de DR5 ont été re-

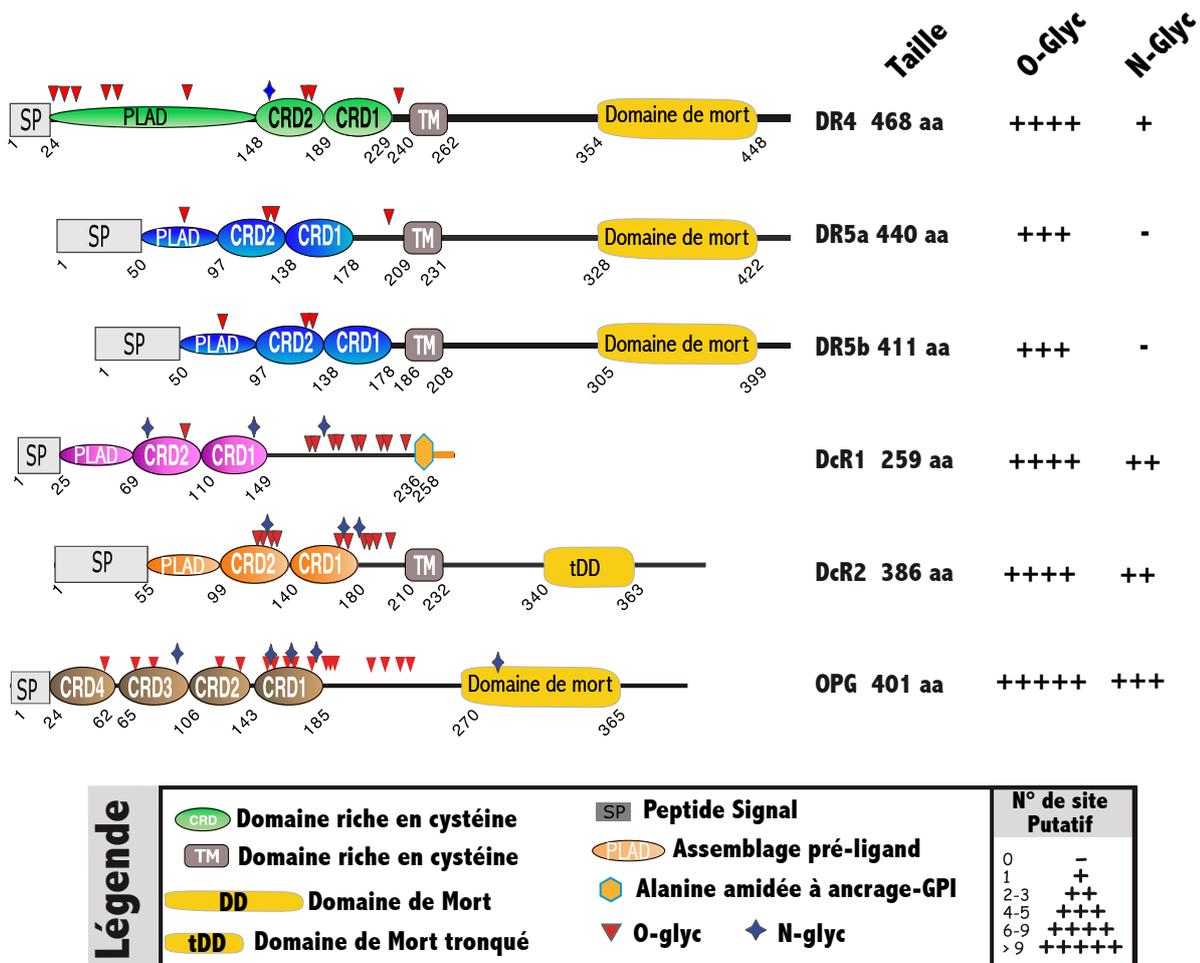


FIGURE 1.5 – Représentation schématique de la composition des récepteurs TRAIL. TRAIL-R1/death receptor 4 (DR4), TRAIL-R2/death receptor 5 (DR5) sont les seuls récepteurs possédant un domaine de mort (DD) entier. TRAIL-R3/decoy receptor 1 (DcR1) et TRAIL-R4/decoy receptor 2 (DcR2) ne possèdent pas de DD fonctionnel. Ostéoprotégrin (OPG), contient un DD c'est le seul récepteur soluble, ne contenant pas de domaine transmembranaire (TM). DR4 est N-glycosylé et DR5 est O-glycosylé [Yoshida et al., 2007][Dufour et al., 2017b][Wagner et al., 2007]. Les sites de N-glycosylation putatifs DcR1, DcR2 et OPG sont représentés par des étoiles bleues et ceux de O-glycosylation sont représentés par des triangles rouges.

trouvées : une isoforme courte DR5a (411 aa) et une isoforme longue DR5b (440 aa). Lors de l'épissage alternatif, un intron peut être retenu, aboutissant à une différence de 29 aa entre le domaine transmembranaire et le premier CRD [Wang and Jeng, 2000]. Bien que DR5 puisse être trouvé sous deux isoformes, leurs fonctions spécifiques ou différentielles restent, à ce jour, inconnues.

Les récepteurs antagonistes

Les autres récepteurs auxquels TRAIL est capable de se lier sont DcR1 (*Decoy Receptor 1* / TRAIL-R3/ TNFRSF10C/ TRID), DcR2 (*Decoy Receptor 2* / TRAIL-R4/

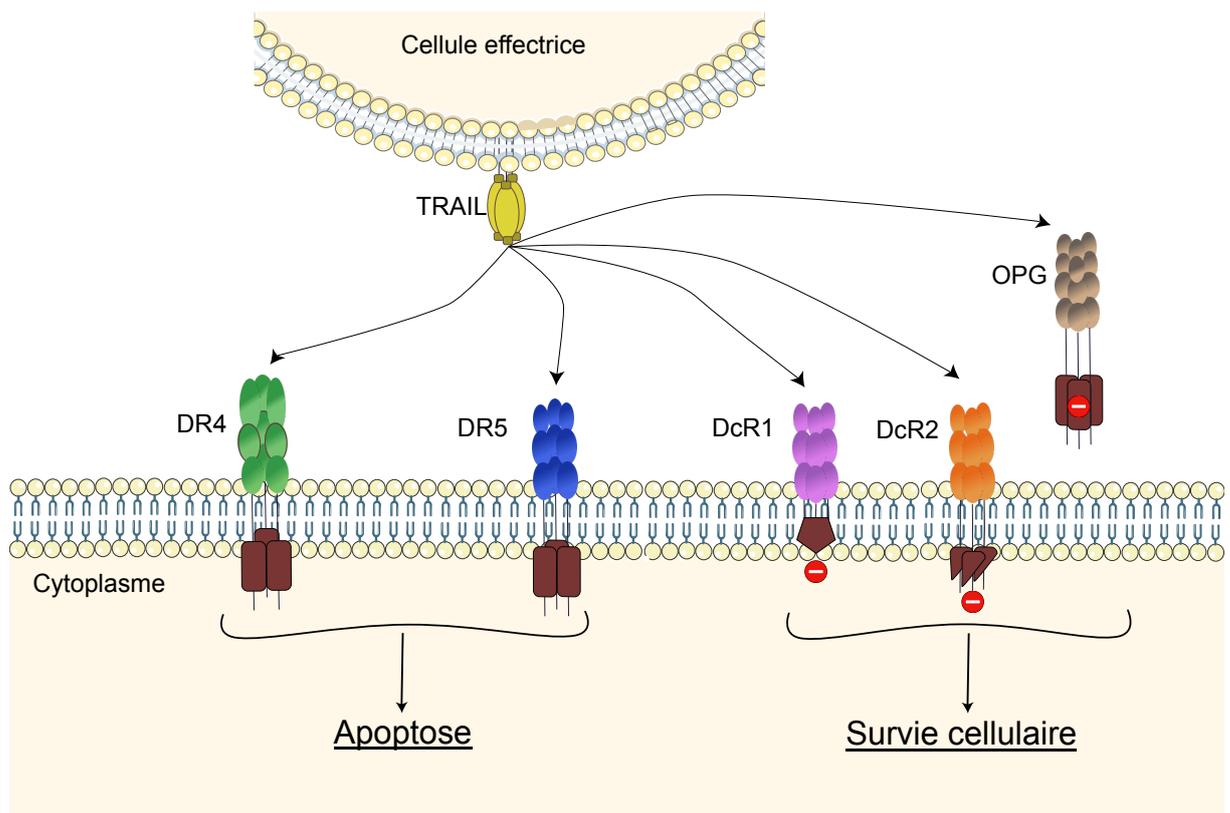


FIGURE 1.6 – Représentation schématique de la liaison de TRAIL à ses récepteurs. TRAIL-R1/death receptor 4 (DR4), TRAIL-R2/death receptor 5 (DR5) sont des récepteurs agonistes de par leur domaine de mort (DD) intracellulaire, grâce auquel ils transmettent le signal apoptotique. TRAIL-R3/decoy receptor 1 (DcR1) et TRAIL-R4/decoy receptor 2 (DcR2) ne possèdent pas de DD fonctionnel. Ces deux récepteurs membranaires agissent en tant que récepteurs antagonistes ou régulateurs de l'apoptose. Ostéoprotégrin (OPG) est un récepteur soluble incapable d'induire l'apoptose.

TNFRSF10D/ TRUNDD) et OPG (ostéoprotégérine/ OIF/ TNFRSF11B) (figure 1.6). Ces récepteurs ne peuvent induire de signaux de mort intracellulaire et sont suspectés d'agir principalement dans les tissus normaux en tant que récepteurs leurres pour le contrôle de l'apoptose médiée par TRAIL [Mirandola et al., 2004].

DcR1 et **DcR2** sont localisés sur le chromosome 8p21-22 et leur domaine extracellulaire est proche de celui de DR4 et DR5. Alors que DcR1 possède un domaine à ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI), et est donc complètement dépourvu de domaine de mort, DcR2 contient un domaine intracellulaire mais héberge un domaine de mort tronqué non fonctionnel [Marsters et al., 1997].

OPG, localisé sur le chromosome 8q24, est composé de quatre CRD [Emery et al., 1998]. Il est le seul récepteur antagoniste abritant un domaine de mort complet. Néanmoins, en raison de l'absence de domaine transmembranaire, il est exprimé en tant que récepteur soluble. Il est donc incapable de transduire l'apoptose. Comme DcR1 et DcR2, bien que dans une moindre mesure, OPG est capable de rivaliser pour la liaison TRAIL, et nuire à la mort cellulaire induite par TRAIL. Son affinité

de liaison avec TRAIL, cependant, est beaucoup plus faible que DR4, DR5, DcR1 ou DcR2 [Emery et al., 1998] [Truneh et al., 2000]. Son véritable ligand, avec qui il se lie à haute affinité, est RANKL, connu pour jouer un rôle important dans l'ostéoclastogenèse [LeBlanc and Ashkenazi, 2003] [Kobayashi et al., 2009].

Les récepteurs murins

Chez la souris, TRAIL ne possède qu'un récepteur agoniste (mDR5/ mTRAIL-R/ murin KILLER) et trois récepteurs antagonistes (mDcTRAIL-R1, mDcTRAIL-R2 et mOPG) [Wu et al., 1999a] [Schneider et al., 2003].

mDR5 est un homologue aux récepteurs DR4 et DR5, cependant il présente trois CRD intactes. Il possède trois sites de *N*-glycosylation au niveau de ses CRDs (N99, N122, N150) mais est dépourvu de *O*-glycosylation [Dufour et al., 2017b]. Il possède un DD et est capable d'induire la mort cellulaire par apoptose en réponse au TRAIL humain ou au TRAIL murin [Wu et al., 1999a] [Estornes et al., 2018].

Les deux récepteurs antagonistes **mDcTRAIL-R1** et **mDcTRAIL-R2** présentent de fortes homologies avec DcR1 et DcR2 mais leur domaine extracellulaire est composé de trois CRD intacts. Ils sont incapables d'induire l'apoptose car ils sont tous les deux dépourvus de domaine de mort. mDcTRAIL-R1 contient un domaine à ancrage GPI alors que mDcTRAIL-R2 ne contient qu'un domaine transmembranaire et peut être solubilisé [Schneider et al., 2003].

1.4.2 Mécanismes de l'apoptose induite par TRAIL

Multimérisation des récepteurs

La trimérisation des récepteurs agonistes de TRAIL à la surface cellulaire est le premier événement critique déterminant pour le déclenchement de l'apoptose [Ashkenazi, 2002] [Gieffers et al., 2013]. L'apoptose induite par DR4 et DR5 nécessite le recrutement des protéines au niveau intracellulaire et ne peut se faire que si les récepteurs sont au minimum trimérisés [Vanamee and Faustman, 2018]. Il a été démontré depuis longtemps que le ligand induit l'oligomérisation des récepteurs (figure 1.7). La conformation ainsi formée d'une tri-symétrie entre le ligand et le récepteur permet de disposer de davantage de sites de contacts extracellulaire et intracellulaire, augmentant considérablement l'avidité des complexes [Wiley et al., 1995] [Ashkenazi et al., 1996] [Locksley et al., 2001]. Cependant ce processus complexe fait intervenir plusieurs paramètres.

La plupart des ligands de la TFNSF sont liés à la membrane des cellules [Bodmer et al., 2002]. TRAIL ne déroge pas à cette règle et, dans cette configuration membranaire trimérique, il permet d'induire une mort cellulaire robuste lorsqu'il se lie à ses récepteurs agonistes. Comme la plupart des membres de la superfamille du TNF, TRAIL peut être clivé des membranes par la cathepsine E [Weinlich et al., 2010].

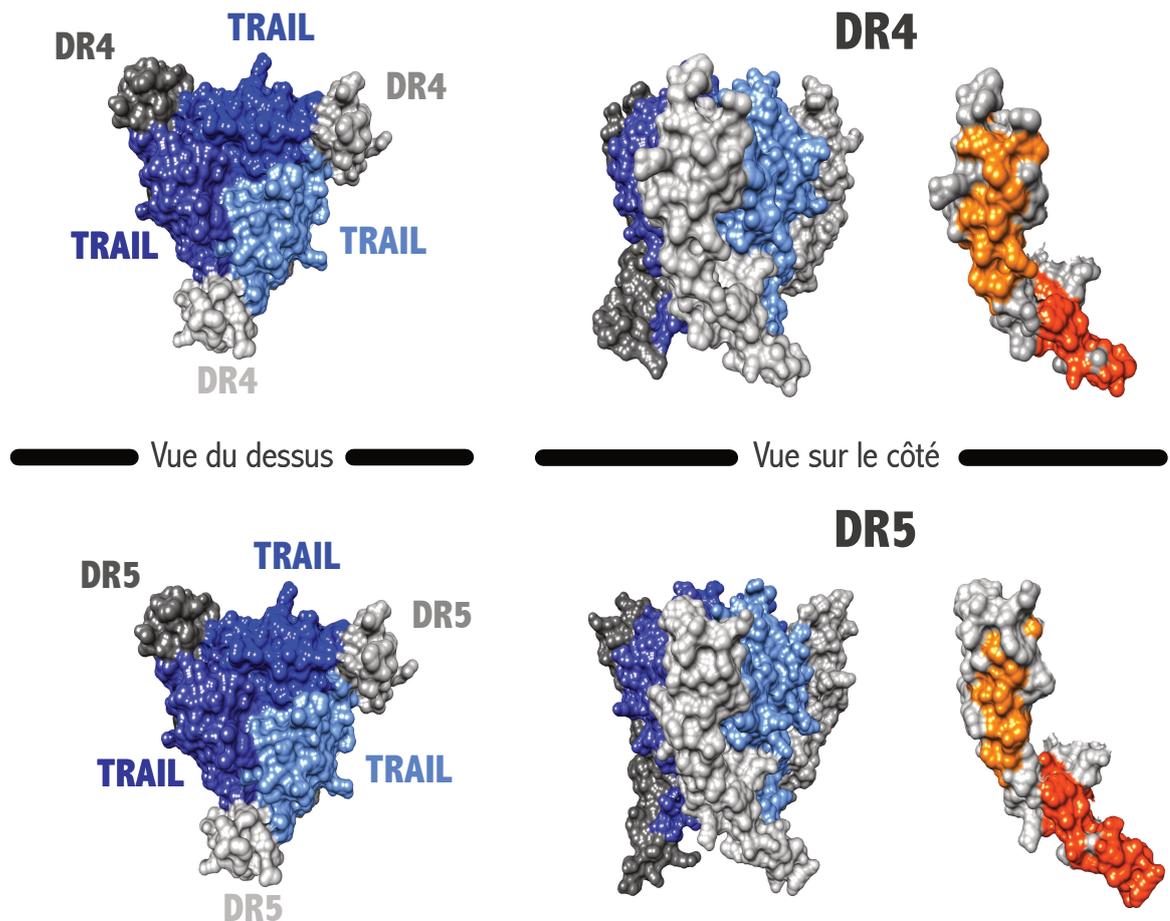


FIGURE 1.7 – Structure cristallographique des complexes TRAIL/récepteurs. Représentation en surface du TRAIL trimérique avec DR4 (haut) ou DR5 (bas) à partir de la structure cristallographique 5cir et 1d4v respectivement [Ramamurthy et al., 2015] [Mongkolsapaya et al., 1999]. Les vues du dessus et sur le côté sont présentées. Les résidus de surface partagés entre DR4 et DR5 sont indiqués par les deux patchs (orange et rouge). Les résidus enterrés ou non partagés sont affichés en gris. Dans les représentations trimériques, les monomères TRAIL sont représentés en bleu ciel, bleu et bleu foncé, et les monomères DR4 et DR5, en nuances de gris.

Cependant, ce trimère soluble (sTRAIL) peut se lier à ses récepteurs mais est incapable d'engager une voie de signalisation, à part s'il est homo-multimérisé par ingénierie, par des résidus 6xHistidine par exemple (voir chapitre 3)[Berg et al., 2007].

Par la suite, il a été démontré qu'avant même la fixation du ligand TRAIL, les récepteurs peuvent s'auto-associer via PLAD (figure 1.8) [Chan et al., 2000]. Il semblerait même que les récepteurs de TRAIL existent principalement sous forme de complexes pré-assemblés [Chan, 2007]. Les travaux de Wassenaar ont démontré que DR5 s'auto-associe et forme des dimères rapidement, permettant de recruter plus facilement un troisième monomère [Wassenaar et al., 2008]. L'association de ce troisième récepteur est asymétrique et très instable, ce qui rend ce trimère pré-assemblé très éphémère. Il est intéressant de noter que PLAD est présent sur les quatre récepteurs membranaires de TRAIL, à savoir DR4, DR5, DcR1 et DcR2.

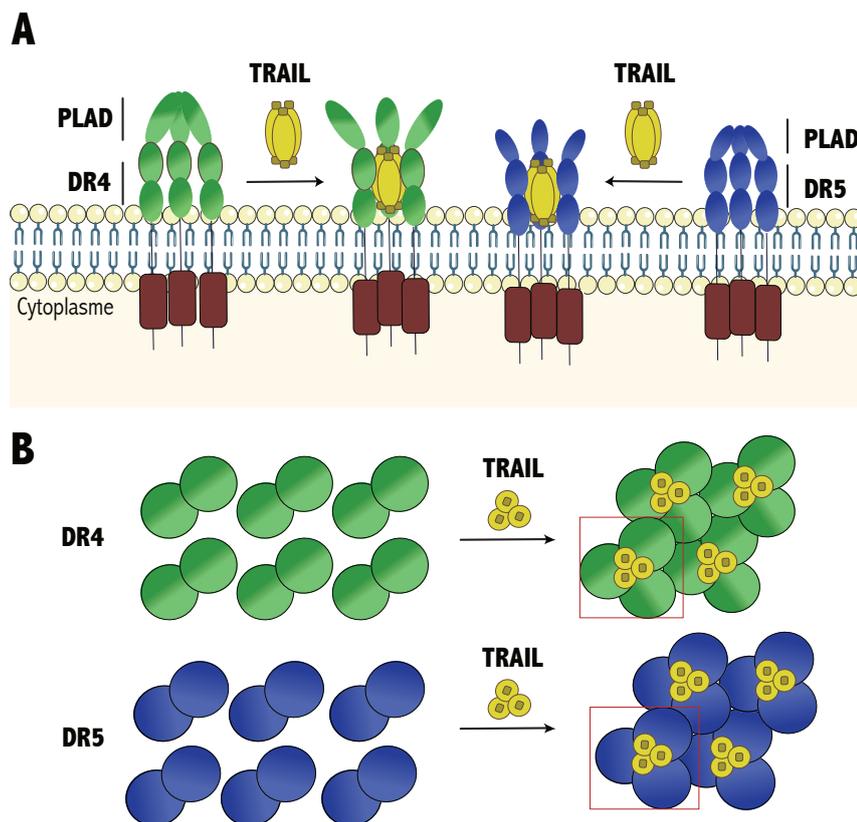


FIGURE 1.8 – Modélisation du pré-assemblage de DR4 et DR5 via PLAD. **A.** Lors de la liaison du ligand, l'interaction PLAD est remplacée par l'interaction plus stable entre le ligand et le récepteur. Un trimère pré-assemblé est montré à des fins d'illustration. Vue sur le côté, DR4 et DR5 sont représentés en vert et bleu respectivement. **B.** L'agrégation de dimères pré-assemblés maintient la structure symétrique du complexe récepteur-ligand. Les dimères de DR4 et DR5 sont représentés par les ronds verts et bleus, respectivement, d'une vue de haut en bas. Lors de la liaison du ligand, des agrégats ligand-récepteur se forment sur la membrane maintenant une symétrie trimère, comme le montrent les carrés rouges. D'après [Chan, 2007].

Cette interaction sans ligand peut donc se faire de manière homotypique ou hétérotypique entre les trois récepteurs DR4, DR5 et DcR2 [Clancy et al., 2005] [Merino et al., 2006]. Il est cependant difficile de prédire si la forme dominante est le trimère instable ou le dimère. La fixation de TRAIL pourrait ainsi soit former un hexagone avec trois dimères, soit engendrer un changement conformationnel, modifiant la conformation asymétrique en une forme symétrique stable. Les interactions entre tous les récepteurs de TRAIL sont possibles mais seules les associations de TRAIL avec les homotrimères DR4/DR4 et DR5/DR5 ou les hétérotrimères DR4/DR5 sont capables d'enclencher efficacement la signalisation pro-apoptotique [Neumann et al., 2014].

Plus récemment, l'étude d'un anticorps anti-DR5 ayant un fort potentiel pro-apoptotique (KMTR2) a permis de démontrer qu'une superoligomérisation du récepteur était à l'origine de l'efficacité anti-tumorale du traitement [Tamada et al., 2015]. La région spécifique de la liaison pour l'antigène (Fab) de l'anticorps KMTR2 est très caractéris-

tique : un Fab lié à un monomère de DR5 est capable d'interagir avec le Fab d'une autre molécule de KMTR2, lui même associé à un monomère de DR5. Les monomères DR5 pouvant interagir entre eux, probablement via le PLAD, un énorme complexe contenant plusieurs DR5 et plusieurs molécules de KMTR2 (plus d'une vingtaine) est ainsi généré. L'espace entre chaque DR5 étant celui communément retrouvé avec DR5 dimériques et trimériques pré-assemblés, ces résultats suggèrent que l'anticorps agit comme un pont entre les dimères pré-assemblés de DR5 [Mukai et al., 2010]. Ceci démontre une fois encore que la multimérisation des DR est essentielle pour l'activation d'une signalisation apoptotique puissante, et que les anticorps peuvent être un moyen d'y parvenir.

DR4 et DR5 étant des glycoprotéines, la glycosylation pourrait également jouer un rôle de réticulation secondaire des récepteurs, avec ou sans ligand, en trimères mais également en hexamères ou plus. La *N*- et la *O*-glycosylation de DR4 et DR5, respectivement, contribuent à l'agrégation et la multimérisation correcte de ces récepteurs et l'exécution de l'apoptose par la formation du DISC [Yoshida et al., 2007] [Dufour et al., 2017b] [Wagner et al., 2007]. En étant capables de se lier aux chaînes glucidiques, les galectines pourraient contribuer à l'agrégation des récepteurs, en formant des pontages entre les différentes structures oligosaccharidiques, mais ce concept reste encore à élucider [Micheau, 2018].

En outre, et de manière importante, DR4 et DR5 présentent des exigences de réticulation distinctes [Wajant et al., 2001]. Alors que DR4 s'est révélé être capable de déclencher l'apoptose avec une même efficacité par un ligand TRAIL réticulé ou non, l'apoptose induite par DR5 nécessite une réticulation secondaires des trimères TRAIL solubles (figure 1.9). Ceci peut être démontré en utilisant des anticorps secondaires capables de réticuler le ligand TRAIL marqué [Muhlenbeck et al., 2000] [Natoni et al., 2007].

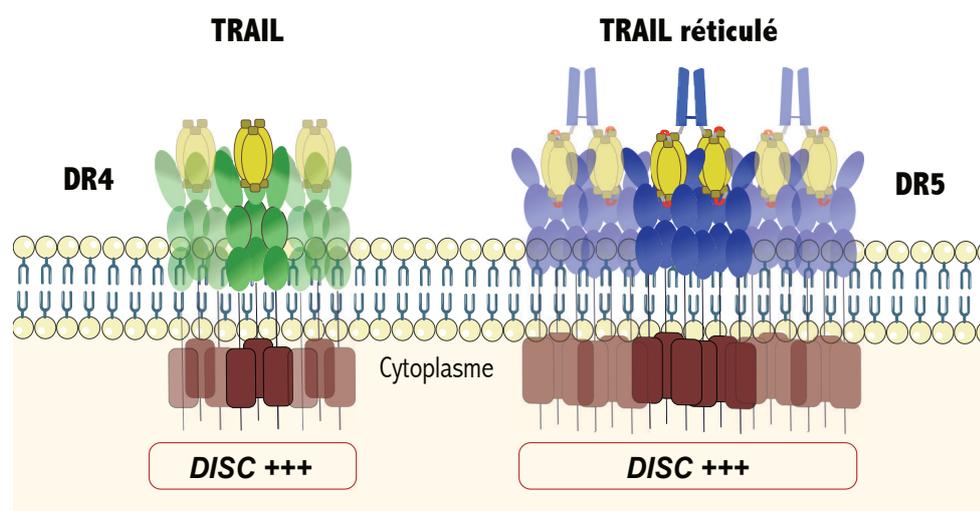


FIGURE 1.9 – Différentes exigences de réticulation de DR4 et DR5. Alors que DR4 peut induire une apoptotose efficace après fixation du ligand seul, DR5 nécessite en général une réticulation secondaire de TRAIL.

Signalisation pro-apoptotique des cellules de type I, ou voie extrinsèque

La fixation du ligand TRAIL à ses récepteurs agonistes DR4 et DR5 conduit à leur regroupement en une forme symétrique stable, capable de déclencher la signalisation intracellulaire pro-apoptotique. Les composants intracellulaires impliqués dans la cascade apoptotique sont caractérisés par des domaines homologues pouvant être liés par interactions homotypiques. Ainsi, après multimérisation, DR4 et DR5 peuvent recruter le domaine de mort (DD) de la protéine adaptatrice FADD (*Fas-associated death domain*) par une interaction homotypique de leurs DD [Schneider et al., 1997b] [Berglund et al., 2000]. L'intégrité du DD des DR est donc essentielle pour cette interaction. En plus d'un DD, la protéine FADD contient un domaine effecteur de mort (DED). Le recrutement direct du DD de FADD aux DD des DR4 et DR5 expose le DED, qui se lie à son tour aux DED des procaspases-8 et -10 [Bodmer et al., 2000a] [Berglund et al., 2000]. Les DD permettent donc de regrouper les DR et FADD, et les DED permettent de recruter les procaspases-8 et -10 au niveau du FADD lié aux DR.

L'ensemble de ces interactions protéines-protéines forme un complexe dénommé DISC (*death-inducing signalling complex*) (figure 1.10) [Sprick et al., 2000] [Peter and Krammer, 2003] [Shirley et al., 2011]. L'oligomérisation de FADD et la formation du complexe TRAIL-DISC permettent l'activation de la caspase-8. La proximité engendrée par le DISC conduit à un changement de conformation de la procaspase-8, qui permet son clivage par auto-catalyse, libérant des auto-dimères dans le cytosol [Kischkel et al., 2000]. Ces homodimères sont les sous-unités de la caspase-8 qui vont initier la cascade des caspases pro-apoptotiques. Les travaux de Dickens et al (2012) ont démontré que, pour la construction du DISC, trois récepteurs ne recrutent qu'une seule molécule de FADD, qui à son tour recrute de multiples molécules de procaspase-8. Ceci explique pourquoi la multimérisation des récepteurs est nécessaire pour induire le signal. La procaspase-8 contenant deux DED, il a été proposé que plusieurs procaspase-8 s'associent, via leurs DED respectifs, pour former une chaîne de caspase-8 [Dickens et al., 2012].

L'induction de la cascade peut alors être divisée en phase initiatrice, où les procaspases-8 et -10 vont être activées par le DISC, et en phase effectrice caractérisée par le clivage protéolytique des caspases effectrices procaspase-3, procaspase-6 et procaspase-7 [Boatright et al., 2003]. Les caspase-3 et caspase-7 ainsi activées vont cliver à leur tour un ensemble des substrats essentiels, comme la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) qui répare l'ADN, menant à l'exécution du programme apoptotique [Chai et al., 2001] [Fischer et al., 2003] [Kaufmann et al., 1993] [Fulda and Debatin, 2006]. Cette cascade protéolytique conduit finalement aux caractéristiques typiques de la mort par apoptose (fragmentation de l'ADN, dégradation des composants cellulaires, formation de corps apoptotiques, etc.) et à la destruction spécifique des cellules tumorales exprimant les récepteurs de mort DR4 et DR5.

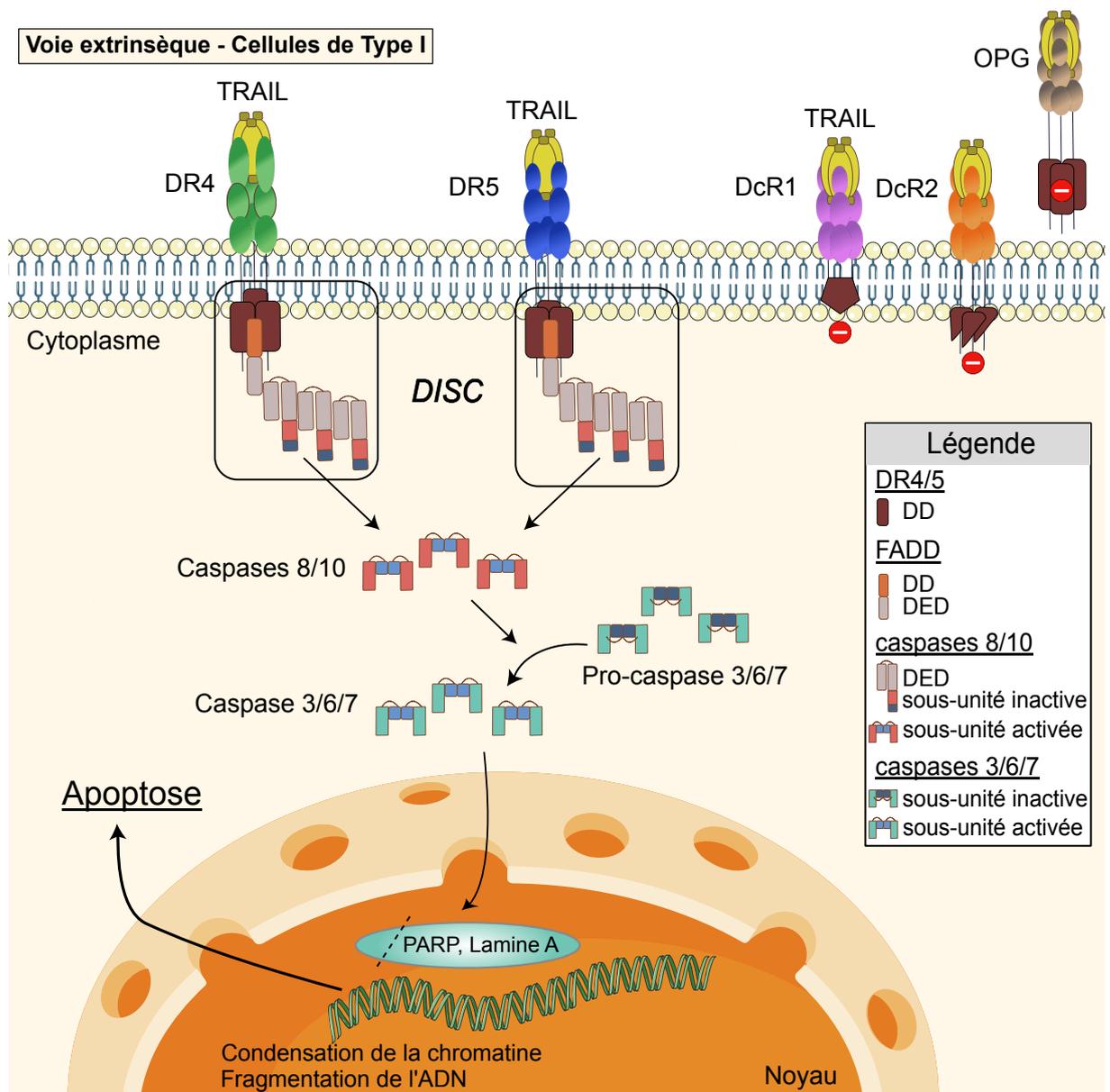


FIGURE 1.10 – Signalisation pro-apoptotique induite par TRAIL, voie extrinsèque (cellules de type I). Dans un souci de représentation, TRAIL est représenté ici lié à l'extrémité de ses récepteurs. La fixation du ligand TRAIL à ses récepteurs agonistes DR4 et DR5 sous forme trimérique engendre le recrutement d'une molécule adaptatrice FADD et d'une procaspase-8/-10, formant ainsi le DISC. Au sein de ce complexe, la procaspase-8 recrute d'autres molécules identiques, et s'auto-catalyse. Tous ces recrutements se font par interactions homotypiques entre les domaines de mort (DD) et les domaines effecteurs de mort (DED) de chacune des molécules. Les dimères actifs de la caspase-8 initiateur vont activer les caspases effectrices -3/-6/-7. Cette cascade de caspases aboutit au clivage de composants indispensables à la survie de la cellule, comme par exemple PARP ou la lamine A. Ce processus apoptotique aboutit à la mort de la cellule cible.

D'un point de vue mécanistique, le mode d'activation des caspases effectrices a permis de distinguer deux types de cellules. Les cellules appelées de type-I sont capables d'activer suffisamment de caspases initiateuses, clivant et activant un nombre suffisant de caspases effectrices pour déclencher la machinerie de mort cellulaire de façon robuste et efficace. À l'inverse, dans les cellules dites de type-II, l'activation des caspases initiateuses est insuffisante [Kantari and Walczak, 2011].

Signalisation pro-apoptotique des cellules de type II, ou voie intrinsèque

Dans le cas où le DISC n'est pas assez stable et que l'activation de la caspase-8 n'est pas suffisante, les cellules de type II sont néanmoins capables d'amplifier le signal pro-apoptotique à travers les mitochondries [Scaffidi et al., 1999]. Cette voie est habituellement activée par des agents endommageant l'ADN tels que les médicaments chimiothérapeutiques (le cisplatine par exemple) [Morizot et al., 2011]. La boucle mitochondriale, aussi connue comme la voie intrinsèque, implique la formation d'un complexe macromoléculaire soluble connu sous le nom d'apoptosome (figure 1.11). Ce complexe est le pendant du DISC. C'est un échafaudage moléculaire au sein duquel une caspase initiateuse va être activée, et va pouvoir à son tour activer les caspases effectrices [Chinnaiyan, 1999].

Après stimulation par TRAIL, les caspases-8 activées sont capables de cliver Bid (*BH3-interacting domain death agonist*), une protéine de la famille Bcl-2 [Schug et al., 2011]. Bid tronqué (tBid) ainsi générée intègre la membrane mitochondriale externe (MME) et active de manière allostérique Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*). Bak s'associe alors avec Bax pour former des pores dans la MME, conduisant à la libération du cytochrome c et de Smac/DIABLO dans le cytosol [Gross et al., 1999] [LeBlanc et al., 2002] [Luo et al., 1998]. Le cytochrome c relargué s'associe alors avec les facteurs pro-apoptotiques Apaf-1 et la procaspase-9 pour former l'apoptosome. Une fois formé, ce complexe active la caspase-9 initiateuse, qui à son tour entraîne le clivage et l'activation de la caspase-3 [Li et al., 1997] [Zou et al., 1999]. C'est ici que les machineries des cellules de type I et de type II convergent, conduisant à la fin du processus d'apoptose décrit ci-dessus.

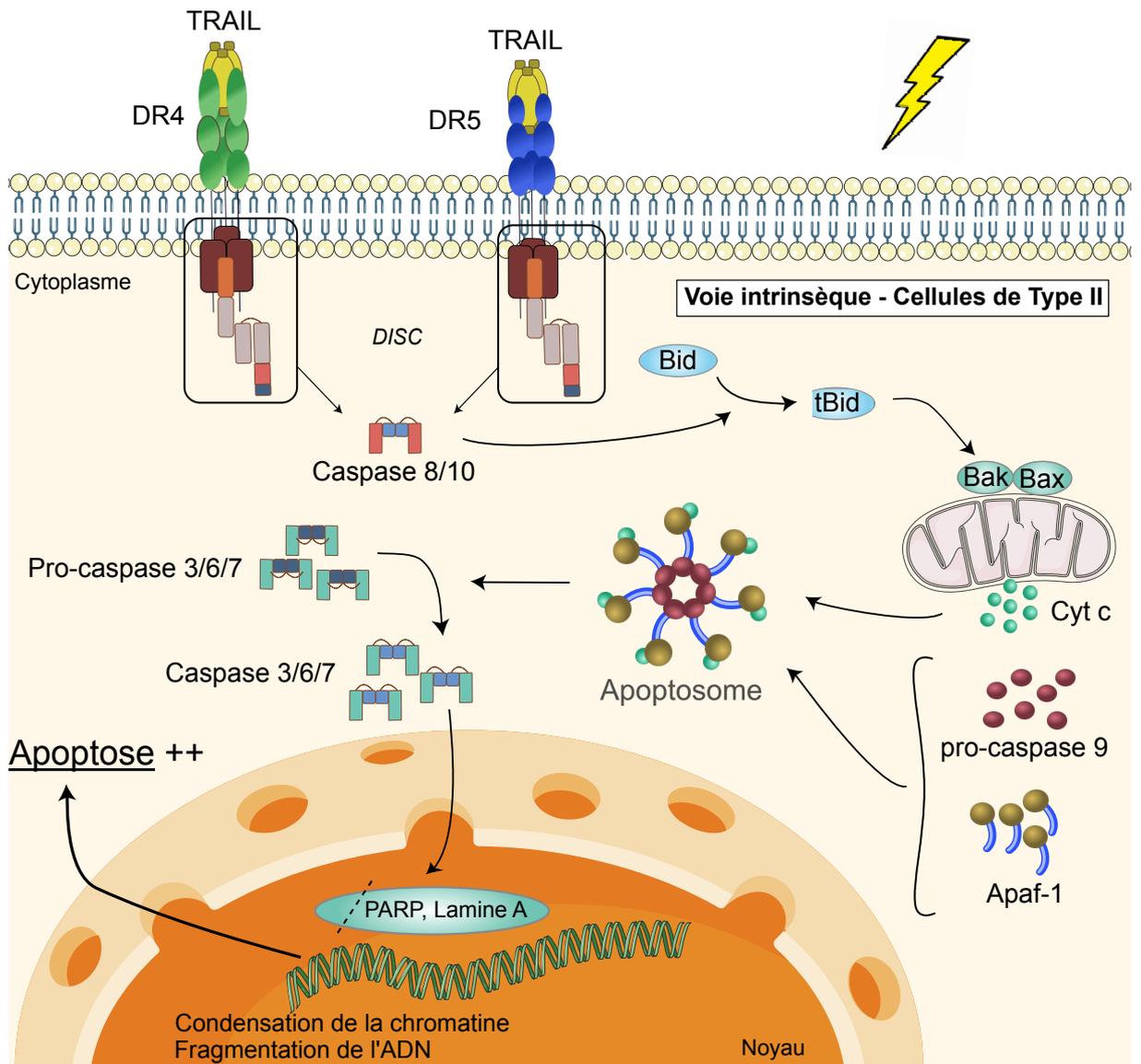


FIGURE 1.11 – Signalisation pro-apoptotique induite par TRAIL, voie intrinsèque (cellules de type II). Lorsqu'un DISC formé n'est pas assez performant, les cellules de type II sont capables d'engager une boucle d'amplification de l'apoptose par la voie mitochondriale. Pour cela, la caspase-8 activée clive la protéine Bid, qui peut ainsi intégrer la membrane extérieure des mitochondries et activer Bak et Bax. Ces deux éléments forment ensuite des pores dans la membrane externe de la mitochondrie, et libère le cytochrome c (Cyt c) dans le cytosol. Le Cyt c va ensuite s'associer à Apaf-1 et à la procaspase-9 pour former le complexe macromoléculaire appelé apoptosome. La caspase-9 initiatrice, activée par l'apoptosome, clive et active la caspase-3 effectrice, entraînant la mort de la cellule par apoptose.

1.5 Régulation de l'apoptose et migration induite par le système TRAIL-TRAIL récepteurs

1.5.1 Mécanismes de régulation de l'apoptose

L'induction du processus apoptotique est un mécanisme efficace mais étroitement régulé par un certain nombre d'activateurs et de suppresseurs afin d'éviter des dommages cellulaires indésirables. Plusieurs mécanismes de régulation sont connus, ils permettent d'empêcher la mise en place d'un processus apoptotique excessif. Certaines cellules tumorales utilisent ces mécanismes pour être résistantes à l'apoptose induite par TRAIL. Cette résistance est considérée comme un des obstacles cliniques majeurs de la cytokine TRAIL lors des essais chez l'homme [Wang et al., 2014b].

Selon le contexte cellulaire, en particulier les niveaux d'expression des activateurs et des inhibiteurs de cette voie, le processus apoptotique va pouvoir avoir lieu ou non [Selvarajoo, 2017]. La sensibilité de l'apoptose induite par TRAIL peut être régulée à tous niveaux de la voie de signalisation de l'apoptose : au niveau membranaire par les récepteurs leurres, au niveau du DISC principalement avec c-FLIP, et au niveau de la cascade de caspases intracellulaire, où un nombre assez conséquent d'inhibiteurs intervient dans les voies extrinsèque et intrinsèque (figure 1.12). L'ensemble de ces facteurs peut conduire à la résistance cellulaire vis-à-vis de TRAIL. Ici sont présentés les principaux acteurs de la régulation de la voie.

Régulation extracellulaire

Au niveau extracellulaire, la voie de signalisation apoptotique peut être modulée par les récepteurs leurres DcR1, DcR2 et OPG. Mis à part OPG, ces récepteurs présentent la même affinité envers TRAIL que les récepteurs agonistes DR4 et DR5 [Truneh et al., 2000]. Ils sont donc en compétition directe avec DR4 et DR5 pour la liaison à TRAIL, diminuant ainsi le nombre de cytokines disponibles pouvant se fixer aux récepteurs agonistes. L'effet anti-tumoral global de TRAIL sur les cellules cancéreuses est alors réduit [Sheridan et al., 1997] [Meng et al., 2000] [LeBlanc and Ashkenazi, 2003] [Merino et al., 2006] [O'Leary et al., 2016].

En outre, alors que DcR1 titre TRAIL, inhibant sa liaison aux récepteurs agonistes, DcR2 est capable de former des hétéromères avec DR4 et DR5 [Merino et al., 2006] [Neumann et al., 2014]. Le phénomène de formation d'hétérodimères est notamment observé à travers les PLAD [Clancy et al., 2005] [Neumann et al., 2014]. Il a été démontré qu'en séquestrant DR4 et DR5, ces hétérodimères DcR2/DR4 ou DcR2/DR5 diminuent le nombre de récepteurs agonistes disponibles pour former un DISC performant. Ces hétérodimères composés alors de domaines de mort entiers mais également de domaines de mort tronqués, sont incapables de recruter efficacement les protéines adaptatrices FADD

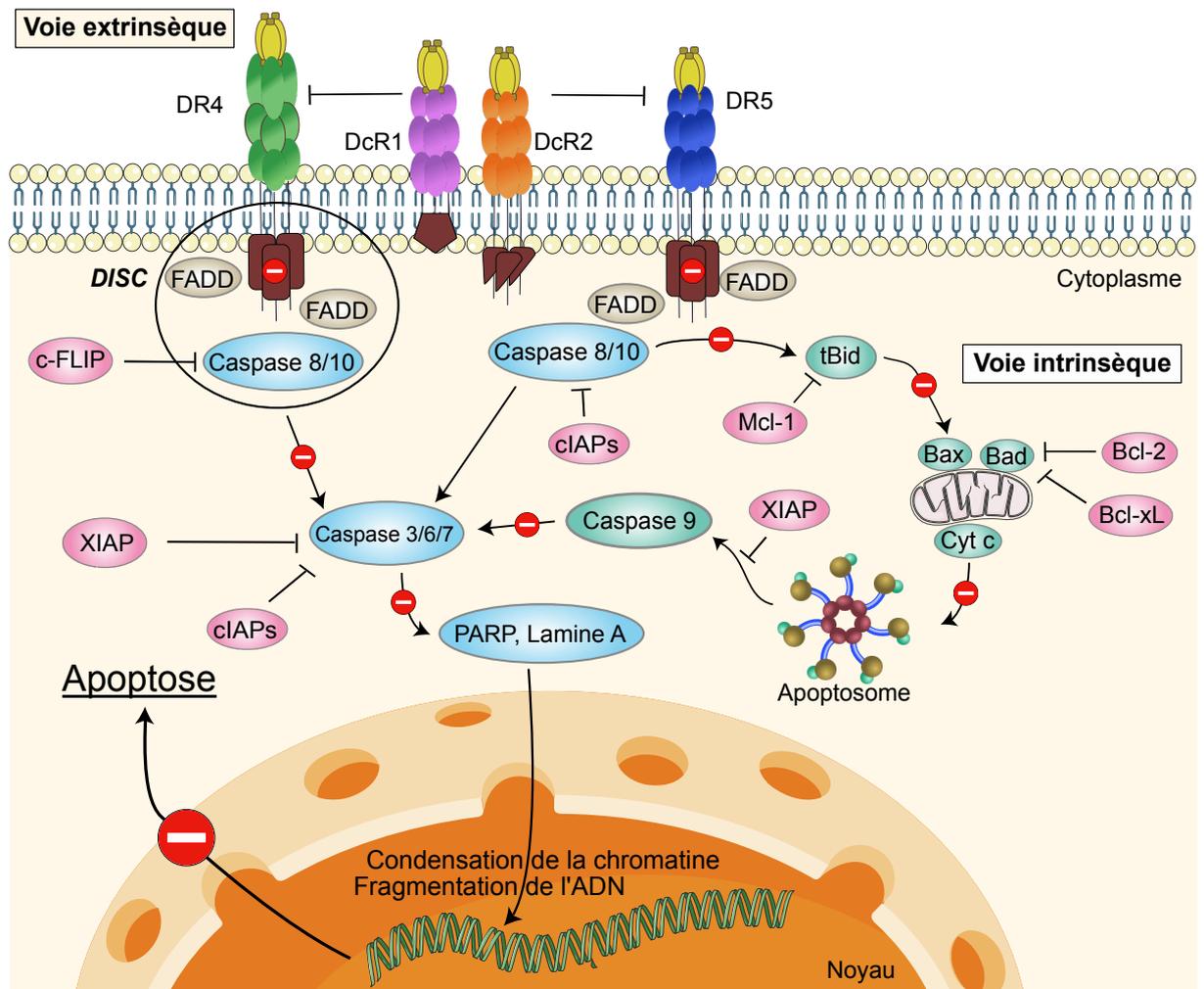


FIGURE 1.12 – Régulateurs de la voie extrinsèque et intrinsèque. La résistance à TRAIL intervient à tous les niveaux de la cascade pro-apoptotique. Les récepteurs antagonistes DcR1 et DcR2 inhibent la fixation de TRAIL sur les récepteurs agonistes et la formation du DISC. c-FLIP inhibe l'activation de la caspase-8 dans le DISC. Mcl-1 interagit avec tBid. Bcl-2 et Bcl-xL inhibent l'activation de la voie mitochondriale. XIAP inhibe l'activation des caspases-3, -7 et -9 et les cIAP1/2 interviennent dans la dégradation des caspases-8, -3 et -7.

et les procaspase-8 [Morizot et al., 2011] [Wajant, 2015]. Le DISC ne peut alors pas se former correctement, empêchant l'induction de la signalisation apoptotique.

Lorsque le recrutement des récepteurs agonistes DR4 et DR5 se fait efficacement, la signalisation pro-apoptotique peut encore être régulée plus en aval, par de multiples inhibiteurs (figure 1.12).

Régulation au niveau du DISC

La protéine c-FLIP (*cellular FLICE-inhibitory protein*), considérée comme un régulateur anti-apoptotique majeur, intervient directement au niveau de la structuration du DISC. c-FLIP est un homologue structural de la procaspase-8. Il contient également

deux DED avec un domaine C-terminal ressemblant à celui des caspases mais il est dépourvu de résidu catalytique, et donc d'activité protéolytique. De par ses DED, les interactions homotypiques permettent son recrutement au niveau du DISC, au même titre que la procaspase-8, empêchant l'accès aux procaspases initiatrices. c-FLIP est également capable d'interagir directement avec la procaspase-8. En la recrutant, il inhibe son oligomérisation et le recrutement en chaîne des procaspases-8 ainsi que la production des sous-unités actives dans le cytosol [Irmeler et al., 1997]. Plusieurs études ont mis en avant l'importance de c-FLIP dans l'induction de l'apoptose, le présentant comme l'élément majeur de la régulation au niveau du DISC, après un traitement avec des agonistes de DR4 et DR5 [Burns and El-Deiry, 2001] [Hughes et al., 2016] [Feoktistova et al., 2011] [Majkut et al., 2014] [Micheau and Tschopp, 2003]. Il a été démontré que les cellules cancéreuses exploitent la surexpression de c-FLIP pour échapper à l'apoptose induite par TRAIL. De nombreuses lignées cancéreuses résistantes surexpriment c-FLIP, inhibant l'activation de la caspase-8 au sein du DISC [Guseva et al., 2008] [Riley et al., 2013]. Par conséquent, la suppression de c-FLIP résulte en une sensibilisation de la majorité des cellules résistantes à TRAIL [Palacios et al., 2006] [Geserick et al., 2008] [Lemke et al., 2014a]. Deux variants de c-FLIP sont exprimés au niveau protéique : une isoforme courte c-FLIP_S et une isoforme longue c-FLIP_L. Alors que le niveau de c-FLIP semble être corrélé positivement avec la survie cellulaire, son effet est aujourd'hui controversé [Seal et al., 2008].

Régulation au niveau des caspases

Un autre point de contrôle important dans la cascade apoptotique est exercé par les cIAP et plus en aval par les XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis proteins*), membres de la famille des IAP (*inhibitor of apoptosis proteins*). Cibler cIAP sensibilise les cellules tumorales à l'apoptose induite par TRAIL en réactivant les caspase-8 [Finlay et al., 2014]. Il semblerait que ces protéines interviennent dans l'ubiquitination et la dégradation des caspases [Choi et al., 2009]. Il a été également rapporté que XIAP est capable de lier les caspases-3, -7 et -9, inhibant ainsi leur activité pro-apoptotique [Deveraux et al., 1998] [Bratton et al., 2002]. Cette résistance peut toutefois être levée par Smac/DIABLO qui, lorsqu'il est libéré de la MME, lie directement XIAP et bloque sa fonction inhibitrice. En inhibant XIAP, Smac/DIABLO augmente le potentiel apoptotique du système [Verhagen et al., 2000] [Du et al., 2000].

Régulation mitochondriale

La voie intrinsèque est essentielle pour l'apoptose induite par TRAIL, en particulier dans les cellules de type II. L'activation des membres pro-actifs de la famille Bcl-2 est nécessaire pour l'apoptose induite par TRAIL, car une déficience en Bax conduit à la résistance au TRAIL [Deng et al., 2002] [LeBlanc et al., 2002]. Au niveau de la régula-

tion de la boucle d'amplification, l'expression des protéines anti-apoptotiques de cette même famille de Bcl-2, à savoir Bcl-xL, Bcl-2 ou encore Mcl-1, joue un rôle important dans la prévention de l'apoptose induite par TRAIL. Mcl-1 interagit avec tBid, la version pro-apoptotique de Bid, alors que Bcl-2 et Bcl-xL interviennent au niveau de Bax et Bad [Clohessy et al., 2006] [Cheng et al., 2001] [Chawla-Sarkar et al., 2004]. En effet, une augmentation de Bcl-2 induit une résistance des cellules, et l'inhibition de Bcl-xL sensibilise les cellules résistantes au TRAIL [Hinz et al., 2000] [Sun et al., 2001] [Fulda et al., 2002].

1.5.2 Induction des voies non-apoptotiques

Alors que les récepteurs de mort étaient initialement reconnus comme étant de puissants inducteurs d'apoptose, la complexité de leur signalisation n'a fait que croître avec les découvertes de ces dernières années [Varfolomeev et al., 2005] [Azijli et al., 2013]. Ces DR ont aujourd'hui démontré leur capacité à induire des voies de signalisation pléiotropes en fonction du contexte cellulaire et de la réponse à la stimulation par TRAIL.

Implication de la voie de survie cellulaire

Plusieurs études démontrent que la stimulation par TRAIL permet également l'activation de voies de survie. La liaison de TRAIL sur DR4, DR5 ou DcR2 est capable d'induire l'activation de NF- κ B, un facteur de transcription impliqué dans les voies de survie cellulaire, transactivant les molécules anti-apoptotiques telles que c-FLIP, Mcl-1, c-IAPs et Bcl-xL [Ravi and Bedi, 2002] [Ricci et al., 2007]. Par ailleurs, TRAIL est également capable d'activer des membres de la famille des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*). En particulier, l'activation par TRAIL de la protéine ERK1/2, principalement impliquée dans la survie et la prolifération des cellules, protège un certain nombre de types cellulaires de l'apoptose induite par TRAIL [Milani et al., 2003]. La signalisation de la protéine kinase B (AKT) induite par TRAIL est confirmée dans de nombreuses entités cancéreuses. AKT survient dans l'apoptose mais également et surtout dans les processus de croissance et de survie cellulaire. D'autres publications ont montré que l'inhibition de la voie PI3K/AKT sensibilise les cellules tumorales à la stimulation par TRAIL dans des modèles de tumeurs pulmonaires, ovariens et mammaires ou inverse la résistance au TRAIL [Pespeni et al., 2007] [Shrader et al., 2007] [Xu et al., 2010] [Azijli et al., 2012].

Une des explications possibles de ce phénomène est la formation d'un complexe secondaire intracellulaire après la stimulation par TRAIL. Ce phénomène a été démontré en premier lieu avec le récepteur TNFR1 [Micheau and Tschopp, 2003]. Deux complexes sont capables de se former après stimulation par le ligand TNF. Un premier complexe, au niveau de la membrane cellulaire, permet d'engendrer les signaux pro-inflammatoires dépendant du TNF. Si ce signal n'est pas assez performant, un second complexe formé au niveau intracellulaire est activé. Dans le cas du système TNF/TNFR1, ce complexe

secondaire induit la signalisation de mort cellulaire dépendante des caspases, et est responsable de l'activité pro-apoptotique du TNF. À la différence de TNF, Fas et TRAIL induisent un fort signal pro-apoptotique au niveau de la membrane cellulaire. Il a été démontré par la suite que la stimulation par TRAIL permet également la formation d'un complexe secondaire intracellulaire. Ce second complexe comprend FADD et la caspase-8, mais également RIP1, TRAF2 (*TNF Receptor Associated Factor -2*) et NEMO (*NFκB essential modulator*) et active les signalisations des kinases impliquées dans la survie cellulaire [Jin and El-Deiry, 2006] [Varfolomeev et al., 2005]. Le mécanisme proposé est le suivant (figure 1.13) : la stimulation par TRAIL induit la formation d'un second complexe, où RIP1, TRAF2 et NEMO sont recrutés au niveau de FADD et de la caspase-8, résultant en l'activation des voies NF-κB, JNK et p38 MAPK .

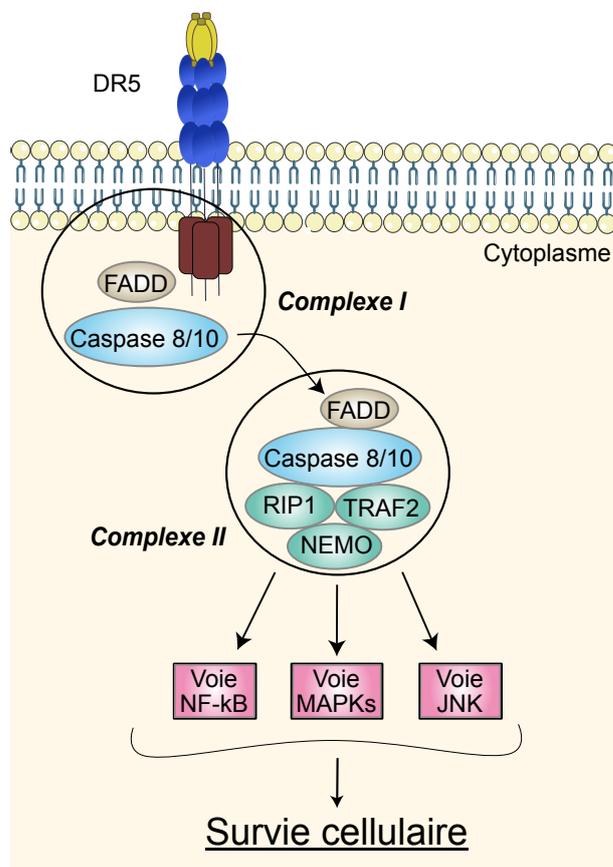


FIGURE 1.13 – Complexe secondaire induit par TRAIL. La stimulation par TRAIL engendre un second complexe formé par FADD, la caspase-8, RIP1, TRAF2 et NEMO. Ce complexe II active les voies de survie, de croissance et de prolifération cellulaire NF-κB, JNK et p38 MAPK.

L'activation par TRAIL de ces voies de survie, de croissance et de prolifération cellulaire a non seulement pour effet de réguler la sensibilité à TRAIL, mais peut également induire une migration cellulaire.

TRAIL dans la migration cellulaire

Les cellules résistantes à TRAIL présentent la plupart du temps une forte expression des facteurs suppresseurs (comme c-FLIP, XIAP ou les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2) ou une diminution des facteurs pro-apoptotiques (comme Bax ou les récepteurs de mort). Dans ces cellules, la stimulation par TRAIL peut engendrer un autre mécanisme : l'induction des voies de survie NF-kB et des voies pro-migratoires. Cette voie non canonique est encore peu élucidée mais il semblerait qu'elle se mette en place lorsque l'induction de l'apoptose est empêchée. La stimulation par TRAIL de cellules résistantes peut ainsi démasquer d'autres signalisations activées par cette cytokine.

L'administration de TRAIL exogène peut déclencher des signaux de pro-survie induisant la prolifération, la migration et des signes d'invasion des cellules tumorales [Trauzold et al., 2006] [Hoogwater et al., 2010]. Sur des cellules d'adénocarcinomes canaux pancréatiques, résistantes à TRAIL, le traitement par TRAIL augmente l'expression des cytokines pro-inflammatoires et promeut le caractère pro-migratoire et métastatique des cellules *in-vitro* et *in-vivo* [Trauzold et al., 2006]. Dans ce sens, notre équipe a montré que la stimulation par TRAIL de cellules HCT116 dont l'apoptose mitochondriale est défectueuse, peut induire un bourgeonnement membranaire et une perte des propriétés d'adhérence, tout en stimulant la prolifération des cellules cancéreuses [Somasekharan et al., 2013].

Plusieurs travaux ont permis de démontrer que le caractère pro-migratoire se fait par **DcR2** [Lalaoui et al., 2011] ou **DR5** [Somasekharan et al., 2013] [Dufour et al., 2017a]. Chez la souris, la stimulation de mDR5 par TRAIL active la voie NF-kB et induit des métastases pulmonaires du mélanome [Takahashi et al., 2013]. Chez l'homme, une expression élevée de DR5 est liée à l'invasion des ganglions lymphatiques dans le cancer pancréatique humain [von Karstedt et al., 2015].

Comme FasL, le signal pro-motile de TRAIL semble requérir des flux calciques [Tauzin et al., 2011] [Dufour et al., 2017a] mais le rôle de la signalisation de la c-yes/PI3K/AKT n'a, à ce jour, pas été démontré. Dans nos modèles de cellules syngéniques dépourvues de DR4 ou DR5, alors que seules les cellules exprimant DR5 induisent un flux calcique et une motilité cellulaire, aucune différence au niveau de la voie AKT n'a été observée [Rattier, 2017]. Toutefois, le mécanisme pro-migratoire pourrait faire intervenir la voie de signalisation **Rac1/PI3K** [von Karstedt et al., 2015] ainsi que le clivage de **ROCK1** [Somasekharan et al., 2013].

Ces voies non canoniques stimulent la transcription de gènes codant pour des facteurs anti-apoptotiques, angiogéniques, mitogènes et stimulent la migration cellulaire. La signalisation induite par TRAIL ou par DR5 peut entraîner une augmentation des métastases. Il faut donc être vigilant concernant leurs potentiels effets indésirables lors de leur utilisation dans le traitement du cancer.

1.6 TRAIL-Rs dans les différents cancers

1.6.1 Expression de TRAIL-Rs dans les différents cancers

Les récepteurs leurres DcR1, DcR2 ou OPG sont exprimés dans les tissus normaux, mais sont rarement retrouvés dans les cellules tumorales, expliquant en partie la sélectivité de TRAIL envers les tumeurs [Sheridan et al., 1997] [van Noesel et al., 2002] [Gottwald et al., 2013] [Anees et al., 2015].

DR4 et DR5 jouent un rôle important dans la surveillance immunitaire innée et acquise ainsi que dans les cancers. Les ARNm des récepteurs DR4 et DR5 sont distribués dans presque tous les tissus, y compris la rate, le thymus, la prostate, les testicules, les ovaires, l'intestin grêle, le cœur, les poumons, le foie et les leucocytes du sang périphérique [Pan et al., 1997] [Screaton et al., 1997]. L'expression de DR4 et DR5 est particulièrement élevée dans la rate, les leucocytes du sang périphériques et les lymphocytes [Golstein, 1997]. L'expression des ARNm ne corrèle pas forcément avec l'expression des récepteurs à la surface des cellules. La présence de la protéine, évaluée par immunohistochimie sur des coupes de parafine, a permis de confirmer cette distribution [Daniels et al., 2005] [Spierings et al., 2004]. L'expression membranaire des récepteurs a été évaluée plus tard. Le système TRAIL-TRAILRs intervenant dans l'immunité anti-tumorale, DR4 et DR5 sont exprimés majoritairement à la surface de divers types de cellules saines de l'immunité innée et acquise, ainsi qu'à la surface des cellules cancéreuses. DR4 et DR5 sont exprimés à la surface des cellules NK et CD8 activées et empêche l'activation aberrante des cellules T [Mirandola et al., 2004] [Lehnert et al., 2014]. DR5 est présent sur les érythroblastes immatures et module leur différenciation et leur régulation [Secchiero et al., 2004]. Une grande variété de cellules tumorales et de tissus humains expriment DR4 et DR5 [Sanlioglu et al., 2007] [Macher-Goeppinger et al., 2009] [Ganten et al., 2009] [Omran and Ata, 2014] [Twomey et al., 2015]. Il a été démontré que les récepteurs DR4 et DR5 sont présents dans des coupes de cancer du sein, de mélanome, de cancer pulmonaire, de lymphome et de cancer gastrique [Daniels et al., 2005]. Bien que DR5 soit globalement plus exprimé sur les cellules tumorales que DR4, leur expression diffère d'une lignée à l'autre [Gasparian et al., 2015]. Par exemple, une étude chez l'homme a déterminé la quantité de DR4 et DR5 exprimé à la surface des cellules de tissus d'adenocarcinome de l'œsophage (EA) ainsi que sur les lignées cellulaires EA Bic-1 et Seg-1 [Younes et al., 2006]. Dans cette étude, 89% des tissus de EA expriment DR4 et 94% expriment DR5. Les deux lignées EA ont également démontré une expression fonctionnelle de DR4 et DR5, ce dernier étant présent en quantité légèrement supérieure. La majorité des tumeurs gastriques et des mélanomes expriment DR5. Cependant, la quantité de DR4 varie, avec une tendance pour les cellules résistantes à TRAIL à exprimer une quantité plus faible de DR4 [Kurbanov et al., 2005] [Li et al., 2016].

Les deux récepteurs agonistes DR4 et DR5 ne contribuent pas à l'induction de l'apoptose de la même manière suivant le type de cellule tumorale ou de cancer. Des travaux ont décrit que DR4 était le principal contributeur de la mort cellulaire de leucémie lymphocytaire chronique ou myéloïde aigüe, et de tumeurs pancréatiques, indépendamment de la quantité de DR5 présent à la surface cellulaire [MacFarlane et al., 2005] [Lemke et al., 2010] [Szegezdi et al., 2011]. DR5 semble, quant à lui, être le principal acteur de l'induction de l'apoptose dans de nombreux autres cancers dérivés de l'épithélium [Van der Sloot et al., 2006]. Ce dernier point est à nuancer car les données de notre équipe montrent que les lignées épithéliales cancéreuses HCT116, SW480 ou H1703 induisent l'apoptose préférentiellement par DR4 [Dufour et al., 2017a]. Les autres tumeurs solides semblent, quant à elles, présenter une hétérogénéité dans la préférence des DR, voire un avantage à activer les deux récepteurs à la fois [Neumann et al., 2012]. Le rôle relatif de chacun de ces récepteurs sur chacune des cellules tumorales reste encore à élucider.

Les différences de susceptibilité et/ou sélectivité de DR4/DR5 pourraient s'expliquer par les différences structurelles des récepteurs. Il a été suspecté que la présence d'un site de S-palmitoylation présent dans le domaine transmembranaire de DR4, mais absent de DR5, peut favoriser la localisation de DR4 dans les radeaux lipidiques, microdomaines enrichis en cholestérol. D'un autre côté, un motif GXXXG présent sur DR5, mais absent du DR4, peut stabiliser l'homodimérisation de DR5 ainsi que la signalisation en découlant. Ces notions n'ont pas été étudiées mais elles ont été proposées comme fonction de régulation dans la signalisation via les DR [Neumann et al., 2012] [Marconi et al., 2013]. Malgré toutes ces études, aucune corrélation claire n'a pu être établie entre le niveau d'expression des récepteurs à la surface cellulaire et leur capacité à induire une apoptose efficace. La lignée colorectale HCT116 et la lignée d'adénocarcinome mammaire MDA-MB-231 sont les deux lignées principalement utilisées au laboratoire. Elles présentent un profil relativement identique quant à la proportion de DR4 et DR5 exprimé à leur surface, à savoir une quantité élevée de récepteurs, avec légèrement plus de DR4 exprimé que de DR5 [Sung et al., 2010] [Dufour et al., 2017b]. Malgré cela, leur réponse à TRAIL est complètement différente : la lignée colorectale HCT116 est sensible au traitement par TRAIL alors que la lignée de cancer du sein MDA-MB-231 est résistante. Il est donc nécessaire d'évaluer la présence des récepteurs DR4 et DR5 sur les cellules cancéreuses avant l'utilisation d'agonistes mais cela ne permet pas de déduire leur sensibilité face au traitement. La différence peut également s'expliquer par les différents taux d'inhibiteurs intracellulaires.

1.6.2 DR4 et DR5, cibles de la thérapie anticancéreuse

La dynamique spatiale du complexe TRAIL-TRAILRs joue un rôle important pour l'induction du signal. Lorsque le ligand TRAIL se fixe aux récepteurs de mort agonistes, tout le complexe est internalisé. Alors que les récepteurs TNF-RI [Schneider-Brachert et al., 2004] [Edelmann et al., 2011] et Fas [Parlato et al., 2000] nécessitent une internalisation pour induire leur signal pro-apoptotique, l'induction du signal via TRAIL-TRAILRs pourrait être indépendante de l'internalisation. Les données préliminaires de notre équipe suggèrent que maintenir les complexes plus longtemps à la surface cellulaire pourrait, au contraire, former un DISC robuste et transduire un signal intracellulaire plus performant. Cela rejoindrait les travaux de Austin démontrant que lorsque l'on bloque l'internalisation des complexes TRAIL-TRAILRs dans les cellules de type I, l'apoptose est amplifiée [Austin et al., 2006]. Il serait donc très intéressant de développer des solutions thérapeutiques permettant de **retenir les complexes au niveau de la membrane**. Pour les cellules de type-II utilisant la voie mitochondriale, l'induction du signal pourrait être dépendante de l'internalisation des récepteurs après la liaison du ligand [Akazawa et al., 2009]. Toutefois, ce phénomène devra être confirmé par des études complémentaires.

DR5 est le récepteur qui a suscité le plus d'intérêt, en partie car il est globalement plus exprimé sur la majorité des cellules tumorales. Or, DR4 n'a pas besoin de réticulation secondaire du ligand et des travaux de notre équipe soutiennent l'hypothèse que **DR4 a un plus fort potentiel que DR5** pour la transduction de l'apoptose après liaison du 6xHis-TRAIL. De plus, et contrairement à DR5, DR4 est incapable d'induire la motilité cellulaire et l'invasion [Dufour et al., 2017a]. Le fait que l'apoptose soit régulée préférentiellement par DR4 et que seul DR5 présente un caractère pro-migratoire remet en question la pertinence du développement des anticorps agonistes se focalisant principalement sur DR5. Il serait donc intéressant de cibler préférentiellement DR4 plutôt que DR5.

Bien que l'explication moléculaire de ces comportements différentiels reste inconnue, ces particularités sont susceptibles d'intéresser le développement de dérivés de TRAIL visant à traiter les patients en clinique. Avec l'essor de la biopharmaceutique et de la biotechnologie, la découverte qu'une cytokine naturelle telle que TRAIL peut induire une mort cellulaire tumorale sélective a suscité un grand optimisme pour le développement futur de solutions thérapeutiques ciblant le cancer. Les récepteurs agonistes de TRAIL, DR4 et DR5, sont considérés depuis plus de deux décennies comme des cibles potentielles pour la thérapie anticancéreuse en raison de leur capacité remarquable à déclencher une apoptose sélective dans les cellules tumorales, tout en épargnant les cellules normales. Les **anticorps thérapeutiques** peuvent cibler spécifiquement les récepteurs. DR4 et DR5 sont ainsi des cibles de choix pour le développement d'anticorps anti-cancéreux. Par conséquent, le système TRAIL-TRAILRs est très attractif pour les immunothérapies anticancéreuses, présentées dans les chapitres suivants.

Chapitre 2

Immunothérapies anticancéreuses

2.1 Les traitements contre le cancer

(Sources : Institut Curie, Ligue contre le cancer, Fondation ARC, Institut National du Cancer)

2.1.1 Traitements de routine

Aujourd'hui, lorsqu'un cancer est dépisté chez un patient, plusieurs voies thérapeutiques sont possibles en fonction de la nature et de la gravité du développement tumoral. En première ligne, et si cela est possible, l'intégralité de la tumeur peut être éliminée physiquement par une opération. On dit alors que la tumeur est résécable. Lorsque cela n'est pas possible, d'autres traitements conventionnels sont proposés seuls ou en combinaison : à savoir la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie. La radiothérapie et la chimiothérapie sont indiquées pour les tumeurs non résécables, et l'hormonothérapie est indiquée en cas de cancers dits hormonosensibles ou hormonodépendants. Cependant ces traitements conventionnels sont toxiques pour les cellules cancéreuses mais également pour les cellules saines. La radiothérapie élimine toutes les cellules présentes dans une région cancéreuse, incluant souvent des cellules saines, et n'est plus applicable en cas de métastases ou cancer généralisé. Les chimiothérapies, quant à elles, ciblent des caractéristiques générales des cellules cancéreuses, parfois communes aux cellules normales, comme la capacité de se diviser rapidement. Elles sont donc toxiques pour des tissus sains et présentent de nombreux effets secondaires. Enfin, l'hormonothérapie, notamment prescrite pour les cancers du sein et de la prostate, empêche la sécrétion d'hormones et/ou bloque le récepteur hormonal. Cette thérapie peut ainsi entraîner des effets secondaires sur le système sexuel, d'autant plus qu'elle est fréquemment associée à la chirurgie et la radiothérapie, et donc à leur toxicité respective. Même si les nouvelles générations de chimiothérapies tendent à utiliser des molécules médicamenteuses de plus en plus spécifiques, les effets indésirables sont encore trop présents. Il est donc nécessaire de développer des

traitements plus spécifiques des cellules cancéreuses, non toxiques pour les cellules saines et dont l'action ne dépend pas de p53.

2.1.2 Les thérapies ciblées

Depuis une vingtaine d'années, les recherches sur le développement tumoral ont permis d'isoler des composantes propres aux cellules cancéreuses. De nombreuses voies spécifiques des cellules tumorales ont ainsi pu être ciblées, permettant d'obtenir une meilleure efficacité, tout en réduisant le risque d'effets secondaires. Lors de l'oncogenèse, le programme génétique de la cellule dégénère et de nouvelles protéines sont synthétisées ou surexprimées. Ces protéines, respectivement appelées antigènes spécifiques des cancers ou protéines associées aux tumeurs, représentent des marqueurs de la transformation tumorale et sont la cible de choix des nouveaux traitements. Or, toutes les tumeurs n'expriment pas les mêmes protéines ; les traitements ciblés ont donc aussi la capacité d'être spécifiques d'un type de cancer en particulier, en fonction de leur profil protéique. Ces nouvelles thérapies ciblées ont trois principales actions :

1. bloquer ou activer une signalisation au niveau de la membrane, en ciblant des cytokines impliquées dans le processus néoplasique ou leur récepteur ;
2. bloquer ou activer les signaux transmis en aval des récepteurs incriminés ;
3. empêcher la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, afin de bloquer leur croissance et leur propagation.

Elles sont regroupées en deux grandes classes : **les inhibiteurs**, de petits poids moléculaire (ciblage moléculaire), ayant accès à des cibles cytoplasmiques ; et **les biothérapies**, majoritairement composées d'anticorps, qui modulent la signalisation des antigènes spécifiques des tumeurs.

2.1.3 La place des immunothérapies

Les produits biopharmaceutiques (ou biothérapies) sont des agents thérapeutiques élaborés à partir de molécules biologiques. Elles englobent les acides nucléiques (ARN et ADN), les acides aminés (peptides, protéines), les glucides (glycoprotéine), les virus et les cellules [Walsh, 2007a]. Ces molécules sont naturellement présentes dans le corps humain et peuvent être produites par technologies recombinantes. À l'inverse des molécules de faible poids moléculaire ou « petites molécules » majoritairement issues de procédés chimiques, les biopharmaceutiques présentent des propriétés favorables en termes de toxicité et d'efficacité. Cette caractéristique leur a permis de jouer un rôle de plus en plus important dans le processus de découverte de médicaments [Mundae and Ostor, 2010]. Depuis les années 70, le taux de croissance du marché des produits biologiques ne cesse d'augmenter, et ce de manière impressionnante. Parmi eux, l'immunothérapie est un domaine en expansion rapide (voir 2.3.3).

L'immunothérapie est l'utilisation, active ou passive, de molécules produites par, ou dérivées, du système immunitaire. L'immunothérapie active cible directement les éléments du système immunitaire, soit pour induire une réaction immunitaire plus performante et plus ciblée, soit pour l'inhiber. L'immunothérapie passive, quant à elle, utilise les produits de la réponse immunitaire comme outils spécifiques, comme les cytokines, les récepteurs solubles ou encore les anticorps. Alors que l'immunothérapie active n'est utilisée que depuis peu, l'immunothérapie passive a été largement développée depuis les années 80. Plus particulièrement, les médicaments à base d'anticorps ont offert tout un éventail de possibilités thérapeutiques pour les patients atteints de cancer ou d'autres pathologies. Le développement d'anticorps monoclonaux, ainsi que l'ingénierie des anticorps ont permis de développer un grand nombre d'anticorps pour de nombreuses applications thérapeutiques.

Aujourd'hui, de par leur spécificité vis-à-vis des tumeurs et leur efficacité, les anticorps monoclonaux sont utilisés dans la majorité des lignes de traitements anti-tumoraux, et ce, dès les premières lignes de traitements.

2.2 Définition, structure et synthèse des anticorps

Les anticorps sont des composants clés de la réponse immunitaire humorale et sont caractérisés par une spécificité élevée et une forte affinité de liaison pour un épitope antigénique spécifique. Ils sont fabriqués lors de la mise en place d'une réponse immunitaire face à un corps étranger (bactérie, virus, cellule transformée, etc.). Lorsque le système immunitaire reconnaît des éléments inhabituels, dits du « non-soi », une réaction immunitaire se met en place afin d'éliminer cet agent pathogène. Cette réponse se fait en deux étapes. En premier lieu, ce sont les cellules de la réponse immunitaire innée qui interviennent afin de neutraliser les éléments pathogènes. Cette réponse n'est pas très spécifique mais agit rapidement. Pendant ce temps, la réponse immunitaire acquise se met en place ; plus spécifique et plus efficace elle comprend les lymphocytes T et les lymphocytes B. Ces cellules sont hautement spécifiques de l'élément étranger et permettent de l'éradiquer efficacement.

Alors que les lymphocytes T induisent une réponse immunitaire cellulaire permettant la destruction active des agents détectés, les lymphocytes B participent à la réponse humorale, dite passive, en produisant des anticorps spécifiques de la cible. La réaction innée est immédiatement efficace (de l'ordre des jours), alors que la réponse adaptative met plus longtemps à se mettre en place (de l'ordre des semaines). En moyenne, trois semaines sont nécessaires à l'éducation du système immunitaire pour reconnaître spécifiquement l'élément étranger cible, et à l'apparition des premiers anticorps spécifiques circulants.

2.2.1 Structure des anticorps

Les anticorps, ou immunoglobulines (Igs), sont des glycoprotéines membranaires ou solubles, hautement spécifiques et complexes qui reconnaissent et éliminent les antigènes étrangers.

Format d'une immunoglobuline

Les immunoglobulines sont composées de quatre chaînes d'acides aminés organisées en forme de « Y ». Deux chaînes lourdes H similaires sont associées par des ponts disulfures à deux chaînes légères L identiques (figure 2.1). La masse moléculaire totale de cette immunoglobuline est d'environ 150 kDa avec une moyenne de 50 kDa par chaîne lourde et de 25 kDa par chaîne légère. Chez l'Homme, les gènes de chaque chaîne sont localisés sur des chromosomes différents, et indépendants les uns des autres. Les chaînes lourdes se trouvent sur le locus IGH des chromosomes 14 (14q32.3). Elles contiennent 9 isotypes ($\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4, \mu, \alpha_1, \alpha_2, \delta$ et ϵ) et sont composées d'une région variable VH et de 3 ou 4 régions constantes CH. Les deux chaînes légères, κ (locus IGK) et λ (locus IGL) sont situées respectivement sur les chromosomes 2 (2p11.2) et 22 (22q11.2) [Tonegawa, 1983]. Elles sont constituées d'une région variable VL et d'une région constante CL.

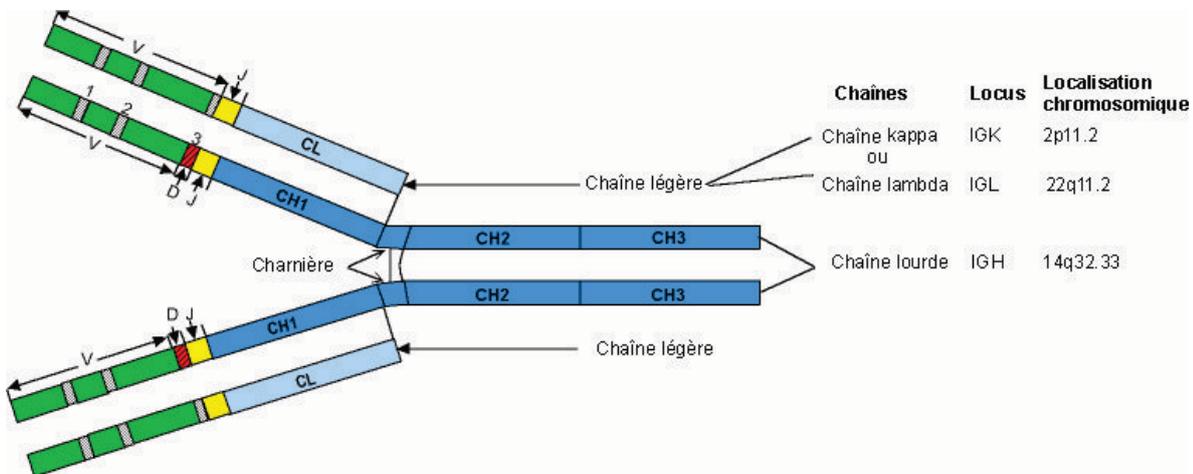


FIGURE 2.1 – Représentation schématique d'une immunoglobuline. D'après <http://www.imgt.org>.

Un anticorps se compose de deux régions différentes : une région variable V et une région constante C. La région variable est localisée dans la partie N-terminale de l'anticorps. Elle est constituée du domaine VL de la chaîne légère et du domaine VH de la chaîne lourde, et est impliquée dans la reconnaissance de l'antigène (partie verte, rouge et jaune dans la figure 2.1). La région constante, située dans la partie C-terminale, est constituée du domaine CL de la chaîne légère et des trois domaines CH1, CH2, et CH3 de la chaîne lourde (partie bleue). Cette région constitue l'architecture de l'anticorps et est très conservée au sein d'une espèce.

Cette structure est maintenue grâce à des ponts disulfures qui peuvent être rompus par digestion enzymatique. Ainsi, une digestion par la papaine au niveau des régions N-terminales VL-CL et VH-CH1 permet d'obtenir les fragments **Fab** (*fragment antigen binding*) et **Fc** (pour fragment cristallisable) (figure 2.2) [Porter, 1959]. Entre les Fab et le Fc se trouve une région charnière, très flexible, facilitant la liaison avec l'antigène. Une digestion par la pepsine permet de fragmenter l'anticorps au niveau de la région charnière, libérant les deux fragments Fab (dénommé F(ab')₂) du fragment Fc. Alors que le Fab intervient dans la liaison avec l'antigène, le Fc interagit avec les récepteurs à Fc (FcR) des cellules immunitaires effectrices.

Les différentes classes d'anticorps

Chez les mammifères, les anticorps sont classifiés en cinq classes majeures ou isotypes : IgG, IgM, IgA, IgD et IgE (figure 2.2). Toutes ces immunoglobulines présentent des structures relativement identiques, cependant les isotypes diffèrent dans leur séquence, le nombre de domaines constants, la structure de la région charnière et la valence des anticorps [Bengtén et al., 2000].

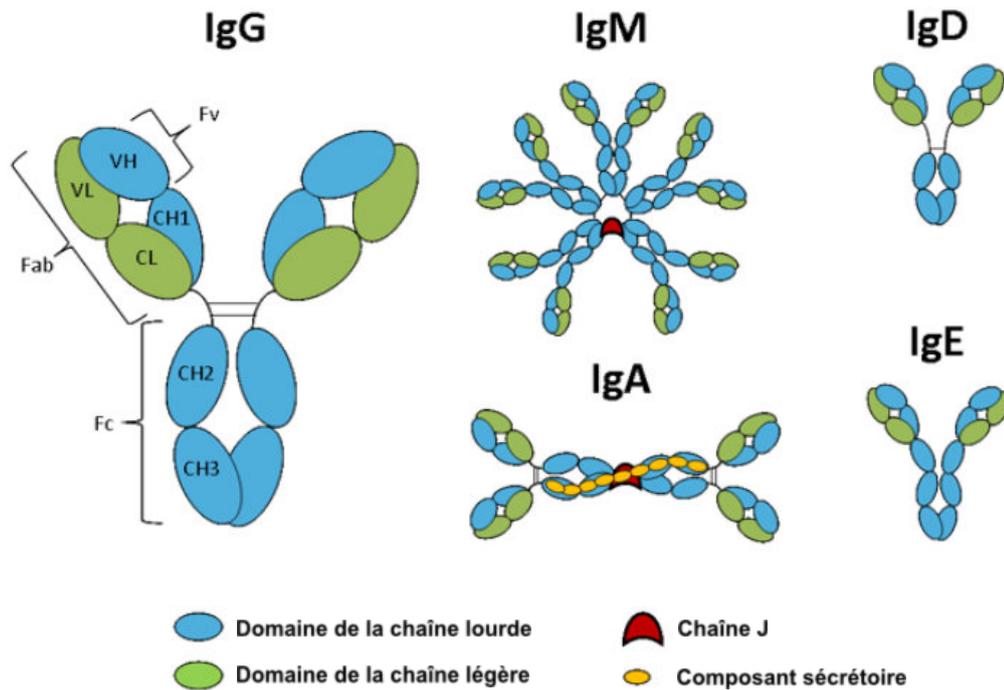


FIGURE 2.2 – Représentation schématique des différentes classes d'immunoglobulines

Chaque isotype et sous-classe d'anticorps est caractérisé par sa chaîne lourde [van Loghem and Litwin, 1972]. Il existe 9 isotypes et sous-isotypes d'Igs (voir tableau 2.1). La classe et la sous-classe conditionnent la structure, la localisation et la fonction de l'anticorps. Les chaînes légères sont de deux isotypes, κ et λ , la première étant la plus fréquemment retrouvée des deux.

Dans le plasma, la demie-vie des immunoglobulines circulantes des IgG est de l'ordre de 21 jours, alors que celle des IgM, IgA, IgD et IgE est inférieure à 7 jours [Schroeder and Cavacini, 2010]. On retrouve classiquement de 8 à 15 g d'IgG par litre de plasma.

TABLE 2.1 – Propriétés des isotypes et sous-classes d'immunoglobulines

	Sous-classe	% dans le sérum	Structure	Fixation au C1q	Opsoni-sation	Traversée du placenta	Autres fonctions	FcR
IgG		75	Monomère	+	+++	+		Fc γ R
IgG1	γ 1	67% des IgG	Monomère	++	Oui	+		I, II, III
IgG2	γ 2	22% des IgG	Monomère	+	Oui	+	Réponse secondaire et neutralisation de toxines et de virus	II, (III)
IgG3	γ 3	7% des IgG	Monomère	+++	Oui	+		I, II, III
IgG4	γ 4	4% des IgG	Monomère	-	Non	+		I, II, (III)
IgM	μ	10	Pentamère	+++	+	-	Réponse primaire	
IgA		15	Monomère, Dimère	-	-	-		
IgA1	α 1	85% des IgA	Monomère, Dimère	-	-	-	Réponse mucosale	Fc α R (CD89)
IgA2	α 2	15% des IgA	Monomère, Dimère	-	-	-		
IgD	δ	<0.5	Monomère	-	-	-	Homéostasie	Fc δ R
IgE	ϵ	<0.01	Monomère	-	-	-	Allergie	Fc ϵ R I, II

L'**IgG** est la classe d'anticorps la plus importante d'un point de vue biotechnologique. Les IgG sont prédominant dans la réponse immunitaire secondaire et sont majoritairement présent dans la circulation sanguine. Elles sont constituées de 4 sous-classes humaines contenant chacune une chaîne lourde différente. Ces sous-classes d'IgG ont été numérotées en référence aux taux sériques de ces anticorps retrouvés dans le sang. Les IgG1 et les IgG4 ont deux liaisons disulfures inter-chaîne dans la région charnière alors que les IgG2 et les IgG3 en contiennent respectivement 4 et 11. Chez la souris, la classe des IgG est divisée en cinq sous-classes (IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG2C et IgG3). Il n'y a pas de relation générale entre les sous-classes de chaque espèce [Vidarsson et al., 2014]. La variation des IgG humaines au niveau de leur Fc induit des différences structurales et fonctionnelles. Notamment, au niveau des fonctions effectrices, les IgG1 et les IgG3 sont les deux sous-classes capables de lier tous les éléments responsables des fonctions CDC et ADCC, respectivement C1q, premier composant de la voie du complément, et Fc γ RI, II et III (voir partie 2.3.1). Malgré ces différences, tous les sous-isotypes d'IgG

sont capables de traverser le placenta et ils participent tous à la réponse immunitaire secondaire [Leach et al., 1996b]. Il a été toutefois observé que les IgG1 et les IgG3 sont majoritairement induites en réponse à des antigènes protéiques alors que les IgG2 et les IgG4 sont associées à des antigènes polysaccharidiques.

L'**IgM** est un pentamère d'immunoglobulines associées entre elles par un polypeptide de 16 kDa appelé la chaîne J. C'est l'anticorps prédominant dans la réponse immunitaire primaire, il est ainsi fréquemment utilisé pour diagnostiquer une exposition aiguë à un immunogène ou un agent pathogène [Ehrenstein and Notley, 2010]. L'IgM est la première immunoglobuline exprimée au cours du développement des lymphocytes B. La chaîne lourde μ s'associe à des VH et VL qui ont subi peu de mutations somatiques en réponse à l'antigène (voir partie 2.2.2). En conséquence, les anticorps IgM ont tendance à être plus polyréactifs que les autres isotypes, ce qui permet aux cellules B porteuses d'IgM de répondre rapidement à une variété d'antigènes. Tandis que les molécules d'IgM monomères ont une faible affinité en raison de leur immaturité, le pentamère sécrété présente une haute avidité de par les interactions multimériques entre l'anticorps sécrété et l'antigène. Il peut ainsi être décavalent avec les antigènes de petites tailles, mais en raison de l'absence de région charnière, et donc de flexibilité, il est majoritairement pentavalent (IMGT). La nature pentamérique de l'IgM le rend également très efficace dans l'activation du complément et le processus d'opsonisation.

L'**IgA** est essentielle pour protéger des points d'entrée de l'organisme contre les toxines, les virus et les bactéries [Woof and Kerr, 2006]. Alors que l'IgA est généralement retrouvée sous forme de monomère dans le sérum, où son taux est légèrement plus élevé que le taux d'IgM, elle est prédominante dans les muqueuses et les sécrétions où elle est retrouvée sous forme de dimère ou IgA sécrétoires (sIgA). Ce dimère est associé à une chaîne J au niveau des CH3 et à une chaîne polypeptidique d'environ 70 kDa, appelée composant sécrétoire, au niveau des domaines CH2. Il y a deux sous-classes d'IgA : les IgA1 et les IgA2. Leurs structures diffèrent principalement au niveau de leur région charnière. Les IgA1 ont une région plus allongée, augmentant leur sensibilité aux protéases bactériennes. Ainsi, alors que les IgA2 prédominent dans de nombreuses sécrétions de muqueuses, les IgA1 sont très largement présentes dans le sérum.

L'**IgD**, faiblement retrouvé dans le sérum, est présent en grande quantité sur la membrane des cellules B [Chen and Cerutti, 2011]. L'IgD a une grande région charnière (d'environ 58 aa) offrant une grande flexibilité aux deux bras des Fab. Cet anticorps est très sensible à la digestion protéolytique, le rendant instable dans le plasma, c'est pourquoi on ne le retrouve qu'en faible quantité dans le sérum. Les IgD circulantes peuvent réagir avec des protéines spécifiques des bactéries. La liaison de ces protéines bactériennes au Fc δ entraîne une stimulation et une activation des cellules B. Toutefois, la fonction précise de l'IgD circulante reste encore indéterminée.

L'**IgE** est à l'état de trace dans le sérum. Ces anticorps sont responsables des phénomènes d'hypersensibilité et d'allergie [Stone et al., 2010]. Ils se fixent avec une affinité extrêmement élevée sur les cellules du système immunitaire inné par les récepteurs FcεRI mais beaucoup plus faiblement sur les FcεRII. La fixation d'un allergène sur l'IgE liée provoque une aggrégation des FcεRI qui entraîne une dégranulation cellulaire et une libération des médiateurs de la réponse allergique.

Glycosylation

Les composants glucidiques des glycoprotéines thérapeutiques sont importants pour leur circulation, leur biodistribution et leur bioactivité. Les immunoglobulines sont des glycoprotéines. Les structures des glycanes associées au domaine Fc de l'anticorps se sont avérées affecter la structure et la fonction effectrice des IgG [Jefferis, 2009a]. La glycosylation varie selon l'isotype [Arnold et al., 2007]. Pour les molécules d'IgG, deux chaînes de glycosylation (N-glycosylation) existent au niveau de l'asparagine 297 (Asn-297) sur chacun des deux domaines CH2. Les glycanes sur ce site interagissent avec une poche hydrophobe sur le domaine Fc qui stabilise la structure de l'immunoglobuline [Liu et al., 2006] [Siberil et al., 2006] [Jefferis, 2007]. Les structures oligosaccharidiques des IgG sont hétérogènes. La composition commune trouvée sur les IgG est un heptasaccharide constitué de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et de mannose (figure 2.3). La glycosylation se complexifie par l'ajout variable de galactose, d'acide sialique et de fucose. Ces différences peuvent conduire à de nombreux modèles de glycosylation possibles [Jefferis, 2012].

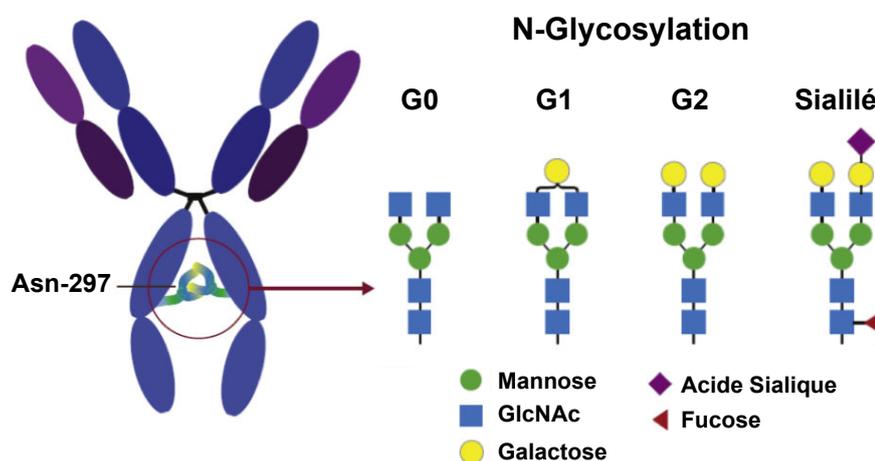


FIGURE 2.3 – Glycosylation d'une IgG. G0, G1, G2 et Sialilé, représentent différentes décorations glycanes possibles des IgG. D'après CRTI

2.2.2 Synthèse et spécificité des anticorps

La synthèse des anticorps se fait par les lymphocytes B. Les immunoglobulines IgM et IgD se retrouvent à la surface des lymphocytes B quiescents, où ils jouent le rôle de récepteurs aux antigènes pouvant les activer. Les anticorps circulants sont, quant à eux, libérés par les plasmocytes, descendants de lymphocytes B activés.

Réarrangements génomiques

La diversité des immunoglobulines est générée par plusieurs réarrangements génomiques possibles au sein des locus IGH, IGK et IGL. Ces locus sont constitués de gènes constants (C), variables (V), de diversités (D, uniquement pour le locus IGH) et de jonctions (J). La partie constante est codée par un gène C, et les parties variables sont codées par des gènes V, D, J pour les chaînes lourdes, et V et J pour les chaînes légères [Alt et al., 1987]. La combinaison de chaque fragment se fait aléatoirement, résultant en de multiples recombinaisons possibles.

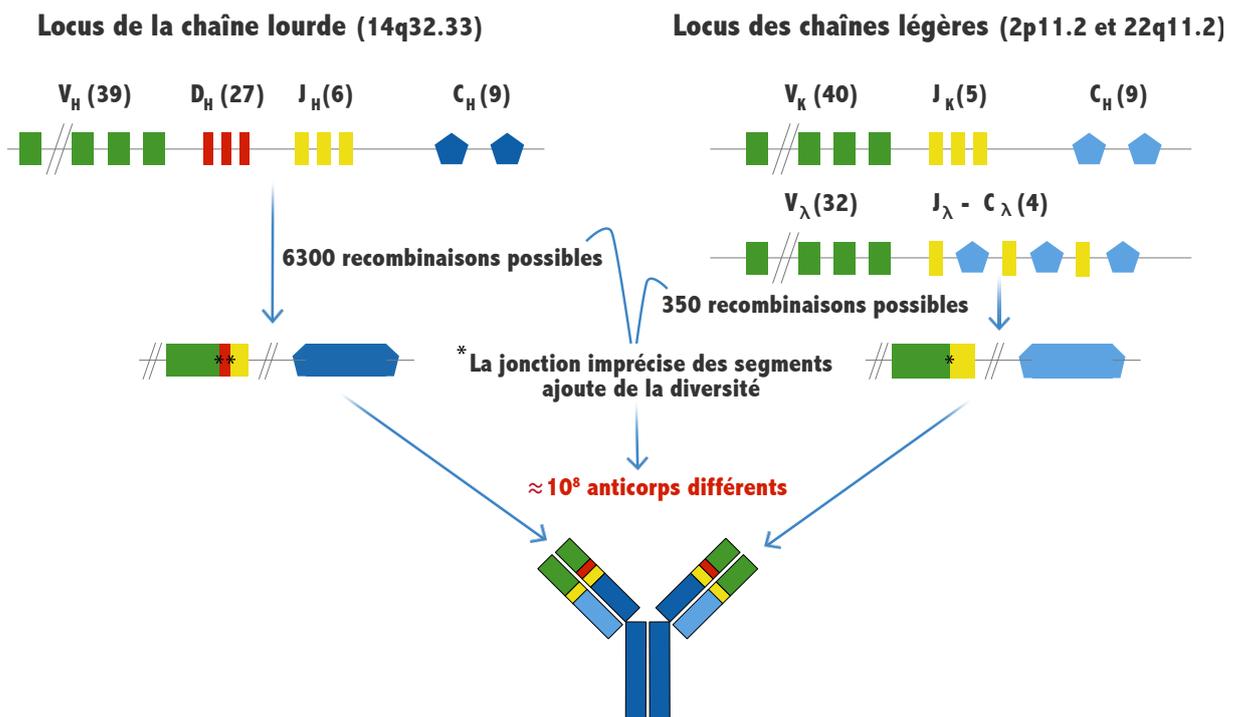


FIGURE 2.4 – Réarrangement génomique et diversité des immunoglobulines

C'est cette multitude de combinaisons de gènes possibles qui apporte la diversité du répertoire des immunoglobulines (figure 2.4) [Tonegawa, 1983]. Lors de l'association des différents gènes, des mutations ponctuelles ou réappariements peuvent également survenir [Meek, 1990]. Cette diversité jonctionnelle, arrivant majoritairement au niveau des fragments de gènes variables V, D, J, augmente à nouveau la grande variabilité des Acs, indépendamment de l'antigène, offrant un répertoire d'environ 10⁸-10⁹ constructions d'anticorps différents possibles [Dudley et al., 2005].

Reconnaissance anticorps-antigène

Ces recombinaisons permettent l'établissement de régions dites hypervariables. Au niveau des régions variables, la chaîne lourde VH et la chaîne légère VL se replient pour présenter ces régions hypervariables, également appelées CDR (*complementary-determining regions*). Il y a trois CDR par chaîne : CDR1, CDR2, CDR3, qui sont maintenues par des régions charpentes FR (*Framework Regions*). Le rapprochement spatial de ces six CDR forme ainsi le site de reconnaissance et de liaison de l'antigène, ou paratope (figure 2.5). Ce dernier reconnaît un motif spécifique d'environ 5 à 20 acides aminés sur l'antigène, dénommé déterminant antigénique ou épitope [Janeway CA Jr, 2001].

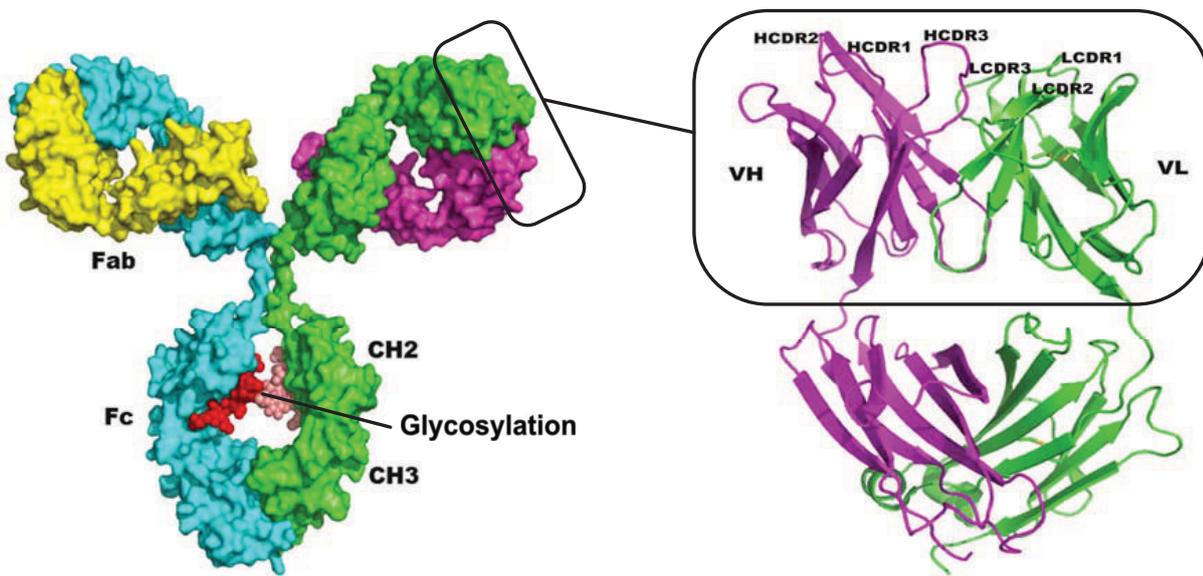


FIGURE 2.5 – Représentation tri-dimensionnelle des régions complémentaires-déterminantes (CDRs) responsables de la liaison anticorps-antigène. D'après [Murali and Greene, 2012]

La région charnière de l'anticorps permet une rotation et une flexibilité qui apporte à l'anticorps sa capacité à interagir avec l'antigène au niveau de son épitope et ce, dans différents plans de l'espace [Yguerabide et al., 1970]. Selon la nature de l'épitope, le paratope peut reconnaître soit une séquence d'acides aminés, on dit alors que l'anticorps est **séquentiel**, soit une forme tridimensionnelle, l'anticorps est alors **conformationnel**. La plupart des antigènes rencontrés naturellement (par exemple des protéines, des virus, des bactéries, etc.) contient des centaines, sinon des milliers, d'épitopes différents. Chaque anticorps spécifique, reconnaissant un épitope particulier, est produit par un lymphocyte B unique.

La biosynthèse des immunoglobulines intervient au cours de la maturation des lymphocytes B dans la moelle osseuse [Ehlich et al., 1993]. Les lymphocytes immatures suivent plusieurs stades de maturation : stade pro-B, stade pré-B, stade B immature et stade mature naïf (figure 2.6). Dans ce processus, les lymphocytes synthétisent une immunoglo-

buline membranaire qui leur est spécifique, le BCR (*B Cell Receptor*), responsable de la reconnaissance de l'antigène. La grande diversité du répertoire fait que ces BCR peuvent reconnaître des antigènes « du soi ». Par un mécanisme de sélection négatif, ces lymphocytes B sont éliminés [Nemazee, 2017]. À la fin du processus, les lymphocytes matures naïfs expriment des IgM et/ou des IgD à leur surface. Ils quittent la moelle osseuse et se disséminent dans tous les organes via le sang et la lymphe, à la recherche d'un motif équivalent. Un lymphocyte fabrique donc une seule molécule d'anticorps spécifique qui est déterminée avant même qu'il ne rencontre l'antigène [Burnet, 1957].

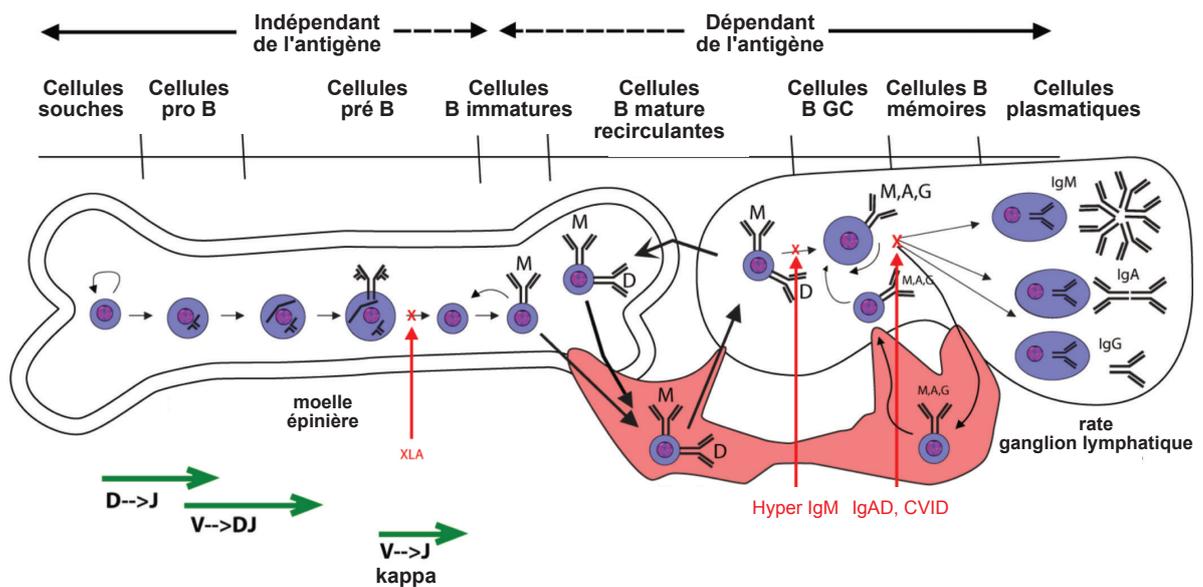


FIGURE 2.6 – Développement des cellules B et biosynthèse des immunoglobulines. D'après [Schroeder and Cavacini, 2010]

La reconnaissance d'un antigène étranger par un lymphocyte B induit son activation dans les centres germinatifs [De Silva and Klein, 2015]. Le lymphocyte ainsi primé va migrer dans la rate et se transformer en plasmocyte, stade final de différenciation des lymphocytes B. S'en suit une expansion cellulaire de ce clone spécifique permettant une production massive d'anticorps solubles. Cette sélection clonale permet de produire un arsenal d'anticorps capables de se lier à l'antigène. Les anticorps issus de ce plasmocyte sont donc monospécifiques ou monoclonaux, mais comme un certain nombre de lymphocytes peut être activé à partir d'un seul antigène, la réponse induite est dite polyclonale.

2.2.3 Développements d'anticorps monoclonaux

Un peu d'Histoire...

La première référence aux anticorps provient de Jules Héricourt et Charles Richet qui, dès 1888, ont posé les principes du transfert curatif de sérum, ou sérothérapie. Ils ont été les premiers expérimentateurs de la sérothérapie anticancéreuse en transférant à

leur patients du sérum de chiens immunisés par des extraits de sarcomes [Watier, 2009]. Malheureusement, le traitement n'a pas eu de réel impact sur les tumeurs cancéreuses. Le premier succès clinique de la sérothérapie arrive deux ans plus tard, en 1890, grâce aux travaux d'Emil von Behring et de Shibasabura Kitasato. Dans une publication historique, ils ont démontré qu'un transfert de sérum anti-diphtérique de chevaux atteints pouvait guérir les animaux infectés, présentant ainsi le concept de neutralisation de toxines par la sérothérapie [Von Behring E, 1890].

En 1900, Paul Ehrlich, l'un des fondateurs de l'immunologie moderne, utilise les termes d'anticorps et d'antigènes, en proposant le modèle d'une molécule d'anticorps ramifiée composée de plusieurs sites de liaison à des corps étrangers, connus sous le nom d'antigène [Davies and Chacko, 1993]. Ce modèle était en accord avec l'hypothèse du «verrou et de la clé» pour les enzymes proposée par Emil Fischer [Fischer, 1894].

Au début des années 1950, le mécanisme de production d'anticorps s'éclaircit. Astrid Fagraeus décrit en 1948 que les cellules B du plasma sont spécifiquement impliquées dans la production d'anticorps, et en 1957, Frank Burnet et David Talmage développent la théorie de la sélection clonale, indiquant qu'un lymphocyte fabrique une seule et unique molécule d'anticorps [Burnet, 1957]. Dans cette même période, en utilisant la papaïne et la pepsine issues de l'évolution des études biochimiques de l'après-guerre, Gerald Edelman et Rodney Porter ont proposé, indépendamment, une structure moléculaire de l'immunoglobuline IgG [Pauling, 1940], [Edelman, 1959], [Porter, 1959]. La première structure de résolution atomique d'un fragment d'anticorps ne fut publiée qu'en 1972 [Dan Inbar, 1972].

En 1960, les programmes de vaccinations et l'augmentation des dons de sang ont permis le développement de sérothérapies contenant des immunoglobulines d'origine humaine [Rubbo and Suri, 1962].

Les préparations d'anticorps polyclonaux

Les préparations d'anticorps polyclonaux se composent de clones d'immunoglobulines différents ciblant un ou plusieurs antigènes. Ces sérothérapies ont été utilisées pour induire une immunité passive contre les maladies infectieuses ou un ensemble d'agents étrangers nocifs, principalement des toxines [Walsh, 2007b], [Watier, 2009]. Les principales préparations d'anticorps polyclonaux utilisées en thérapeutique sont dirigées contre trois groupes d'agents nocifs : les pathogènes microbiens ou viraux spécifiques, les toxines microbiennes, ou les venins de serpent ou d'araignée (anti-venins). Le pool d'immunoglobulines est habituellement administré par injection directe en i.v. Bien que ceci permette une protection immunologique immédiate, son effet est transitoire et ne persiste que pendant 2 à 3 semaines (jusqu'à ce que les anticorps soient excrétés). L'immunisation passive peut être utilisée de manière prophylactique (pour prévenir un futur épisode médical) ou thérapeutique (pour traiter un état médical déjà établi). Les préparations d'anticorps utilisées pour induire une immunité passive peuvent être obtenues à partir de sources animales ou

humaines. Dans les deux cas, l'isotype d'anticorps prédominant est l'IgG. Les préparations d'origine animale, ou antisérums, sont généralement produites en immunisant des animaux sains (par exemple des chevaux) avec un antigène approprié. Des échantillons de sang sont ensuite prélevés à l'animal régulièrement et analysés quantitativement pour la présence d'anticorps d'intérêt (en utilisant un test basé sur l'ELISA). Ceci permet de récolter le sang au moment le plus approprié. Les niveaux d'anticorps sont habituellement maintenus par l'administration répétée d'injections de rappel d'antigène. Le sang est ensuite recueilli et la fraction d'anticorps est purifiée à partir du sérum. Après une purification à haute résolution, le titre d'anticorps est déterminé.

Bien que les antisérums spécifiques soient très efficaces dans le traitement de diverses conditions médicales, ils peuvent également induire des effets secondaires indésirables. Leur origine animal peut induire des réactions d'hypersensibilité pouvant parfois être mortelles (par exemple l'anaphylaxie). En raison de ces risques, les préparations d'immunoglobulines de donneurs humains sont habituellement préférées. Celles-ci peuvent être purifiées à partir de prélèvement de sang d'individus ayant été récemment immunisés contre l'antigène d'intérêt ou récupérées après une infection provoquée par l'antigène d'intérêt. Un exemple emblématique est le don du sang de l'australien James Harrison. La transfusion de son sang contenant des anticorps anti-D très rares, a évité à de nombreuses femmes enceintes de déclencher la maladie hémolytique du nouveau-né (MHN) [MCCANN et al., 1988]. Son sang aurait sauvé plus de 2,4 millions d'enfants à naître. Bien que des réactions d'hypersensibilité puissent survenir lors de l'administration de ces préparations, l'incidence de tels événements est beaucoup moins fréquente.

Cette technique a démontré de nombreux avantages contre des agents infectieux, des toxines et des venins. Toutefois, elle n'a pas été concluante concernant l'éradication des cellules tumorales. L'aspect polyclonal des sérothérapies n'est pas assez spécifique envers un antigène particulier. Il a donc fallu développer une méthode permettant d'isoler un seul lymphocyte B afin d'obtenir des anticorps monoclonaux (ou monospécifiques) dirigés contre un motif antigénique unique. Cependant, les lymphocytes B ne survivent pas à la culture *in-vitro*, rendant la production d'anticorps à long terme impossible. Ce n'est qu'après l'évolution des méthodes de biotechnologies modernes que le développement d'anticorps monoclonaux thérapeutiques a été rendu possible.

Des anticorps polyclonaux aux anticorps monoclonaux

En 1975, la technologie des hybridomes, développée par Georges Köhler et César Milstein, a permis une réelle avancée [Kohler and Milstein, 1975]. Cette technologie repose sur deux domaines de recherche : la génétique, pour la construction des cellules hybrides, et l'immunologie, pour la compréhension des anticorps. Elle permet de fusionner les cellules productrices d'anticorps avec des myélomes pouvant être maintenus *in-vitro* (figure 2.7). Les cellules résultantes, ayant des propriétés propres et complémentaires, permettent d'ob-

tenir une production *in-vitro* stable d'anticorps monoclonaux. La première étape consiste à immuniser une souris avec l'antigène d'intérêt. Ce dernier n'appartenant pas naturellement à la souris, il est reconnu comme élément étranger et provoque une réaction immunitaire, induisant la production d'anticorps murins spécifiques de l'antigène. L'étape suivante consiste à récupérer les cellules de souris productrices d'anticorps, ou splénocytes, présentes dans la rate, qui est un organe enrichi en lymphocytes B. En raison du processus d'immunisation, une quantité significative de ces lymphocytes produit des anticorps reconnaissant des épitopes spécifiques de l'antigène. Ces cellules ont donc la capacité de produire l'anticorps d'intérêt mais elles ne peuvent être maintenues *in-vitro*. Cette compétence est apportée par la fusion des splénocytes murins avec des cellules de myélomes de souris ayant les propriétés de réplifications propres aux cellules tumorales. Les cellules sont incubées en présence de polyéthylèneglycol (PEG) afin de faciliter leur fusion. Cette étape permet d'aboutir à la création de cellules hybrides immortalisées, ou hybridomes, produisant des anticorps. Les hybridomes résultants sont ensuite sélectionnés par culture dans un milieu de sélection spécifique.

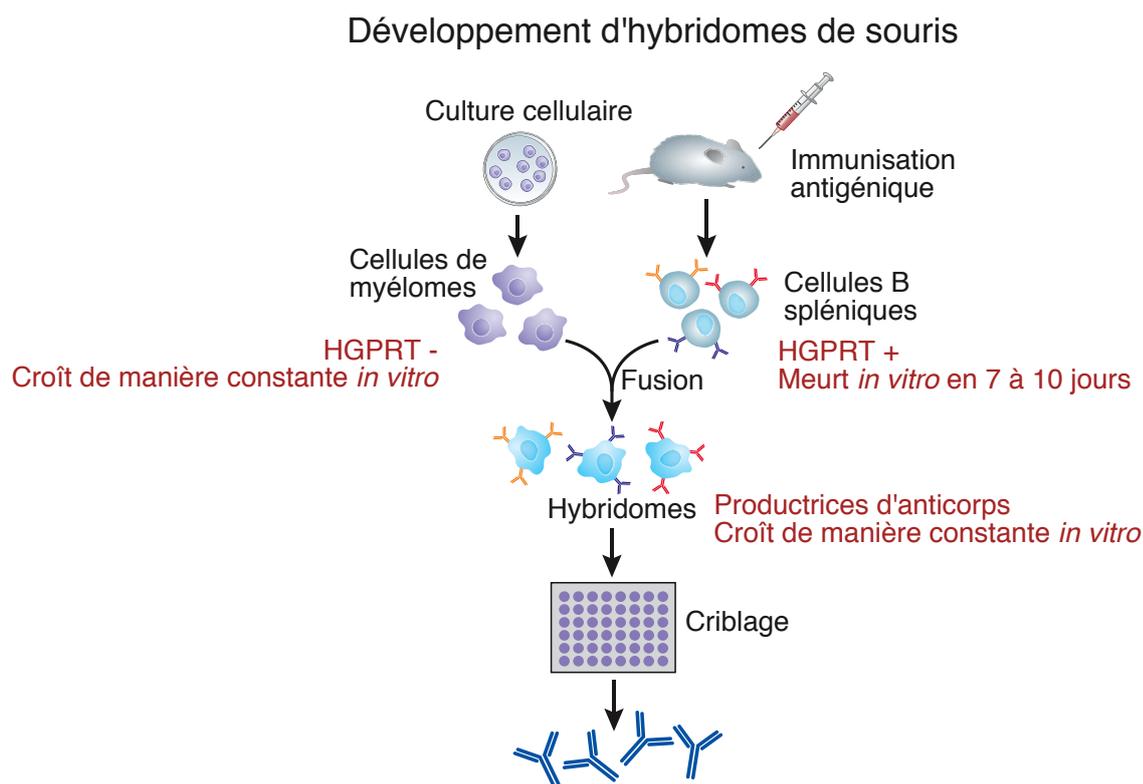


FIGURE 2.7 – Production d'anticorps monoclonaux par la technique d'hybridomes murins. D'après [Marasco and Sui, 2007].

Alors que les splénocytes non-fusionnés meurent naturellement *in-vitro*, les cellules de myélomes non-fusionnées sont éliminées par un milieu de culture contenant le HAT (Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine). Les cellules de myélomes utilisées ont été mutées afin de présenter des déficiences enzymatiques (l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl

transférase (HGPRT ou HPRT-) et la thymidine kinase (TK-)) affectant la voie de sauvetage des purines, une des deux voies de synthèse de l'ADN [Littlefield, 1964]. Ces cellules déficientes sont ainsi éliminées par le milieu sélectif contenant le HAT, qui est un inhibiteur de l'autre voie de synthèse de l'ADN. Pour les hybridomes, les splénocytes ont fourni toute la machinerie enzymatique nécessaire à synthétiser la première voie de l'ADN, et les myélomes ont apporté la capacité répliquative. La complémentation génique qui a eu lieu lors de la fusion permet ainsi aux hybridomes d'être les seules cellules survivantes au traitement. Les hybridomes, qui produisent un clone unique d'anticorps, sont séparés les uns des autres et obtenus individuellement par simple dilution. Ils sont ensuite amplifiés et les clones individuels sécrétant des anticorps monoclonaux sont criblés. Les clones appropriés sont sélectionnés et cultivés à plus grande échelle afin de produire des quantités suffisantes d'anticorps monoclonaux spécifiques de l'antigène d'intérêt.

L'utilité thérapeutique des anticorps monoclonaux a été rapidement notifiée après le développement de la technologie des hybridomes. Ces cellules hybrides représentent une source inépuisable d'anticorps monoclonaux contre pratiquement tous les antigènes désirés et permet la production en masse d'un anticorps thérapeutique, marquant le début de l'ère moderne de la recherche et de la découverte d'anticorps. A tel point que, dès 1986, le muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®) est le premier anticorps monoclonal murin autorisé [Emmons C, 1987]. Les premiers développements d'anticorps anticancéreux apparaissent au début des années 80, avec le traitement d'un patient atteint d'un lymphome B par un anticorps monoclonal ciblant le BCR [Miller et al., 1982]. Alors que la plupart des AcMs développés dans les années 80-90 ont été produits par l'utilisation de souris, la majorité des AcMs récents sont générés *in-vitro* par génie génétique (partie 2.3.2).

2.3 Anticorps monoclonaux en oncologie

L'effet anti-tumoral des anticorps repose sur leur capacité à cibler directement les cellules cancéreuses ou à recruter les cellules du système immunitaire. Les anticorps sont des molécules bi-fonctionnelles qui ont la capacité de fixer l'antigène par le Fab et la possibilité d'interagir avec les cellules effectrices du système immunitaire par le Fc. L'avènement des méthodes d'ingénierie par biologie moléculaire a permis de moduler ces fonctions. Les anticorps monoclonaux développés en oncologie présentent ainsi plusieurs mécanismes d'actions et différents formats.

2.3.1 Mécanismes d'actions des anticorps monoclonaux

L'efficacité des anticorps thérapeutiques provient de diverses fonctions biologiques permettant de bloquer ou d'éliminer les éléments étrangers. Ces fonctions de reconnaissances et fonctions effectrices sont médiées par leur fragment Fab et Fc, respectivement [Redman et al., 2015].

Activités des anticorps induits par le fragment Fab

Par leur fragment Fab, les anticorps peuvent se lier à des cibles solubles ou des cibles membranaires induisant leur neutralisation, leur activation ou leur ciblage (figure 2.8).

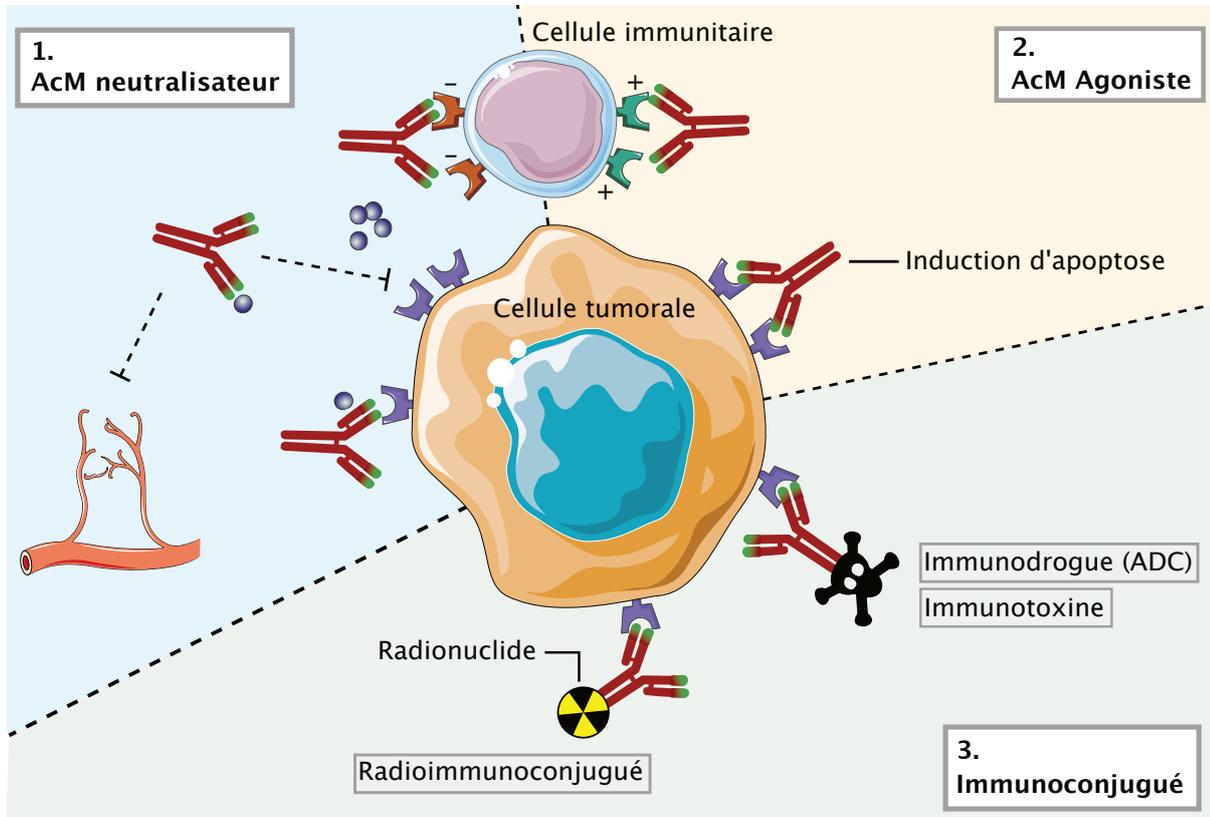


FIGURE 2.8 – Représentation schématique des différents mécanismes d’actions des anticorps monoclonaux en oncologie induits par le Fab.

• La neutralisation et/ou le blocage

Le blocage des interactions récepteur-ligand est le mécanisme d’action le plus largement employé par les anticorps anticancéreux sur le marché (voir partie 2.3.3). Au niveau de la membrane, les anticorps ont la possibilité de bloquer des signalisations importantes pour la survie de la cellule tumorale. Un anticorps peut cibler les cytokines impliquées dans ces processus, ou leurs récepteurs. Lorsqu’il cible une cytokine soluble, l’anticorps peut neutraliser son action. En masquant le site de liaison au récepteur, il bloque la fixation du ligand à son récepteur. Il peut également engendrer un encombrement stérique au niveau du ligand, empêchant son recrutement dans les multimères de récepteurs. Lorsqu’il se fixe au niveau du site de liaison du récepteur, l’anticorps entre en compétition directe avec le ligand. Il peut également empêcher le récepteur d’acquiescer stériquement la conformation nécessaire à l’induction du signal. Dans les deux cas, la présence de l’anticorps empêche la cytokine de se lier à son récepteur et inhibe la voie de signalisation normalement induite. Ce type d’anticorps est appelé anticorps **antagoniste**. Les AcMs les plus connus utilisant ce mécanisme en oncologie sont

l'anti-HER2 Trastuzumab, l'anti-EGFR Cetuximab ou encore l'anti-VEGF Bevacizumab (voir partie 2.3.3.).

Plus récemment, des anticorps ont également montré leur capacité à inhiber les mécanismes suppresseurs des cellules immunitaires. La plupart des développements, concentrés sur la modulation des points de contrôle des cellules T, montre qu'en inhibant les signaux de régulation négatif, comme le CTLA-4 et le PD-1, ces anticorps antagonistes permettent de renforcer l'action des cellules immunitaires envers les cellules tumorales [Leach et al., 1996a] [Keir et al., 2008].

- **L'activation**

L'activation d'une voie de signalisation par un anticorps est un mécanisme plus complexe. Bien qu'il ne soit que faiblement utilisé par les anticorps anticancéreux commercialisés, ce mécanisme d'action est considéré comme ayant un fort potentiel en oncologie [Carter and Lazar, 2018]. Toujours au niveau de la membrane, un anticorps peut stimuler et/ou réticuler un récepteur en mimant la liaison et les propriétés du ligand physiologique. Un tel anticorps est dit **agoniste**. L'anticorps peut se fixer directement au site de liaison du ligand et/ou apporte au récepteur la capacité de se multimériser et d'acquérir stériquement sa conformation fonctionnelle. Le récepteur peut ainsi être activé et déclencher sa voie de signalisation en absence du ligand [Horenstein et al., 2017]. Les récepteurs visés sont ceux pouvant induire une signalisation pro-apoptotique ou capables d'activer les cellules du système immunitaire. À ce jour, un seul anticorps agoniste ciblant un antigène tumoral a été accepté. L'anti-CD20 Rituximab induit directement l'apoptose dans les cellules tumorales et contribue de manière significative aux performances cliniques [Shan et al., 2000]. Cependant son mécanisme d'induction de mort cellulaire reste à clarifier. Son efficacité serait probablement due aux activités induites par son fragment constant. Une grande partie des anticorps agonistes des études cliniques et pré-cliniques ciblent des membres de la superfamille du TNFR, tels que DR4, DR5, OX40, CD27, 4-1BB et GITR. Alors que les anticorps agonistes des récepteurs pro-apoptotiques DR4 et DR5 doivent permettre la multimérisation des récepteurs et ciblent directement les cancers, les anticorps agonistes OX40, CD27, 4-1BB sont impliqués dans les signaux de co-stimulation des cellules immunitaires [Melerio et al., 2013] [Sturgill and Redmond, 2017] [Ashkenazi and Herbst, 2008]. Cependant, les paramètres influençant les propriétés intrinsèques des agonistes ne sont pas aujourd'hui encore entièrement définis.

- **Le ciblage**

Un troisième mécanisme d'action utilise les anticorps comme vecteurs lorsqu'ils sont conjugués à des radio-isotopes, des toxines ou des médicaments. Lorsqu'un antigène est clairement identifié comme étant associé aux tumeurs, ou surexprimé sur les cellules transformées, les anticorps peuvent être utilisés pour délivrer des toxines ou des médicaments [Moolten and Cooperband, 1970]. En construisant des anticorps couplés à des drogues, ou immunoconjugués (ADC pour *Antibody-Drug Conjugate*), il est possible de combiner

la capacité des anticorps à cibler spécifiquement un antigène tumoral, et la cytotoxicité d'une drogue. Un ADC est un complexe constitué de trois entités : un anticorps monoclonal ciblant un antigène d'intérêt spécifique, un agent de liaison ou *linker* et un agent cytotoxique. Le conjugué anticorps-drogue ainsi formé permet de cibler les cellules cancéreuses et de transporter des médicaments directement et spécifiquement aux sites tumoraux. Il représente un outil prometteur en oncologie puisqu'il permet, via l'anticorps spécifique de la tumeur, une délivrance sélective d'une molécule cytotoxique dans les cellules tumorales [Polakis, 2016]. La première étape du mécanisme d'action d'un ADC, dépendant de la nature de l'anticorps utilisé, est la reconnaissance et la liaison à l'antigène cible. Une internalisation via endocytose est alors nécessaire afin que l'agent de liaison soit clivé dans l'endolysosome et permette la libération de l'agent cytotoxique. Ce dernier peut ainsi exercer son action sur la cellule majoritairement via la perturbation de son cytosquelette ou par action directe sur l'ADN [Casi and Neri, 2012]. L'avantage de ces anticorps conjugués par rapport aux chimiothérapies conventionnelles est que ces agents cytotoxiques puissants peuvent être administrés à des concentrations locales plus élevées dans les tissus tumoraux, sans endommager les cellules normales.

Activités des anticorps induits par le fragment Fc

Les immunoglobulines peuvent être retrouvées à la surface des cellules effectrices NK, des macrophages et des mastocytes. Ces cellules ne les synthétisent pas mais elles expriment des récepteurs de surface cellulaire qui se lient à la région Fc des immunoglobulines (FcR). Après fixation d'un élément étranger, les complexes immuns anticorps-antigène peuvent être reconnus par les cellules immunitaires, via le fragment Fc de l'Ig. Les anticorps sont ainsi capables de recruter et de diriger les cellules immunitaires directement à la surface de la tumeur, marquant la destruction de la cellule tumorale et induisant plusieurs processus d'élimination (figure 2.9) [Nimmerjahn and Ravetch, 2012].

• Les différents Fc γ R

Des récepteurs pour toutes les classes d'immunoglobulines ont été identifiés mais les récepteurs de liaison aux IgG sont les plus étudiés en oncologie [Bruhns et al., 2009]. Les récepteurs Fc γ (Fc γ R) sont les récepteurs de surface des IgG et sont largement exprimés sur les leucocytes (majoritairement cellules NK mais également les macrophages, les CD, les monocytes et les éosinophiles). Il existe trois classes de récepteurs pour les IgG humaines retrouvées sur les leucocytes : CD64 (Fc γ RI), CD32 (Fc γ RIIA, Fc γ RIIB et Fc γ RIIC) et CD16 (Fc γ RIIIA et Fc γ RIIIB). Leur affinité vis-à-vis des IgG varie, et ils peuvent être regroupés fonctionnellement en récepteurs activateurs et inhibiteurs (figure 2.10).

En 2001, Shields et al. dissèquent les différents résidus des domaines CH2-CH3 des IgG1 et leur contribution pour la liaison aux Fc γ R [Shields et al., 2001]. Les travaux de Bruhns et al. (2009) ont permis d'élucider la spécificité et l'affinité des trois Fc γ R

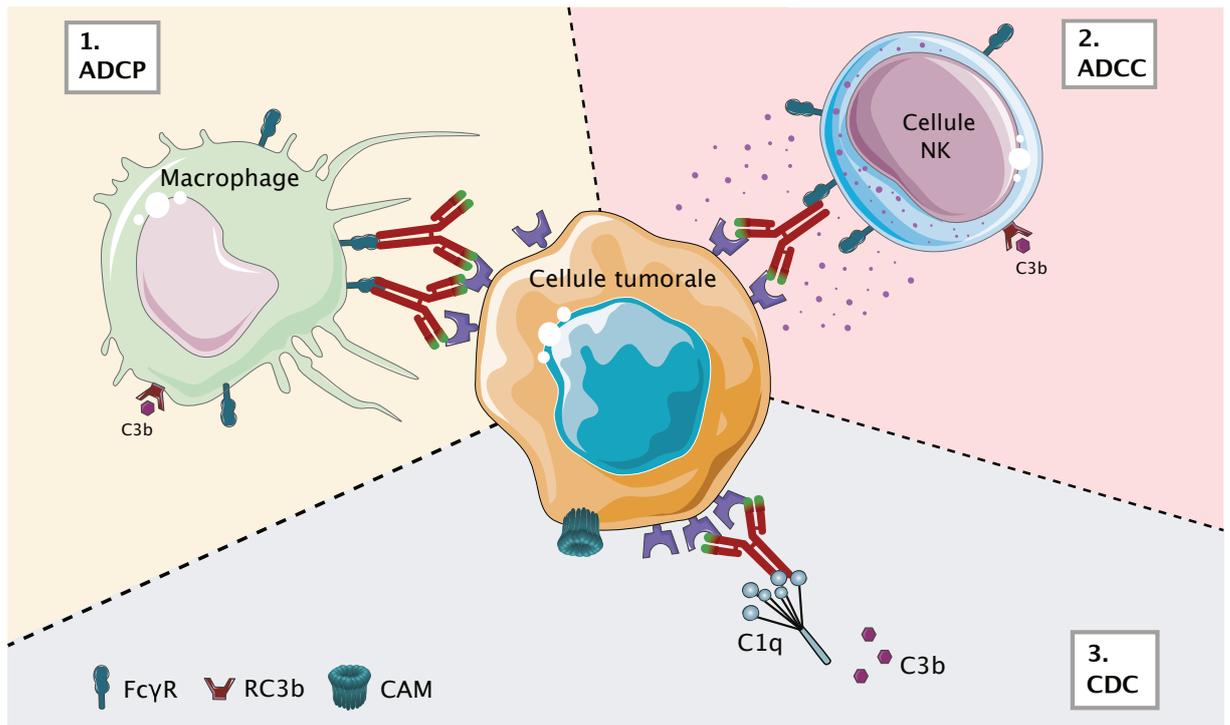


FIGURE 2.9 – Représentation schématique des différents mécanismes d’actions des anticorps monoclonaux en oncologie induits par le Fc. ADCP : activité phagocytaire dépendante de l’anticorps, ADCC : activité cytotoxique à médiation cellulaire dépendante de l’anticorps, CDC : cytotoxique dépendante du complément, Fc γ R : récepteur Fc γ des IgG, RC3b : récepteur au C3b, CAM : complexe d’attaque membranaire

(Fc γ RI, II et III) envers les 4 sous-isotypes d’IgG humaines [Bruhns et al., 2009]. Fc γ RI est classé comme le récepteur à la plus haute affinité tandis que Fc γ RII et Fc γ RIII se lient avec une affinité plus faible. Pour cette raison, seul Fc γ RI se lie aux IgG monomères tandis que les deux autres récepteurs se lient aux IgG dans les complexes immuns. Ceci permet d’éviter que la reconnaissance d’un anticorps seul déclenche les fonctions effectrices, engendrant des réactions inflammatoires néfastes. Alors que les IgG1 et les IgG3 se lient aux trois classes, les IgG4 se lient fortement à Fc γ RI et faiblement aux Fc γ RII et Fc γ RIII. Les IgG2 quant à elles se lient au Fc γ RIIA, faiblement aux Fc γ RIIB et aux Fc γ RIII, mais pas du tout aux Fc γ RI. Il y a également des différences au niveau de la voie de signalisation associée à chaque Fc γ R. Lorsque l’IgG couplée à un antigène se lie, Fc γ RI, Fc γ RIIA et Fc γ RIIIA transduisent tous un signal d’activation alors que Fc γ RIIB est le seul récepteur à transmettre un signal inhibiteur. Contrairement aux autres Fc γ R transmembranaires, Fc γ RIIB est le seul récepteur présentant une attache par une protéine à ancrage GPI (glycophosphatidylinositol). Aucun signal associé à la liaison à Fc γ RIIB n’est ainsi transmis. L’activation cellulaire est induite par les motifs d’activation à base de tyrosine (ITAM), alors que le signal inhibiteur est transmis par le motif d’inhibition à base de tyrosine (ITIM). Les deux motifs sont situés sur la partie intracellulaire du Fc γ R [Billadeau and Leibson, 2002]. Le résultat final de l’interaction de l’anticorps et de

l'antigène avec Fc γ R semble être une balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs, dépendante des sous-classes des IgG.

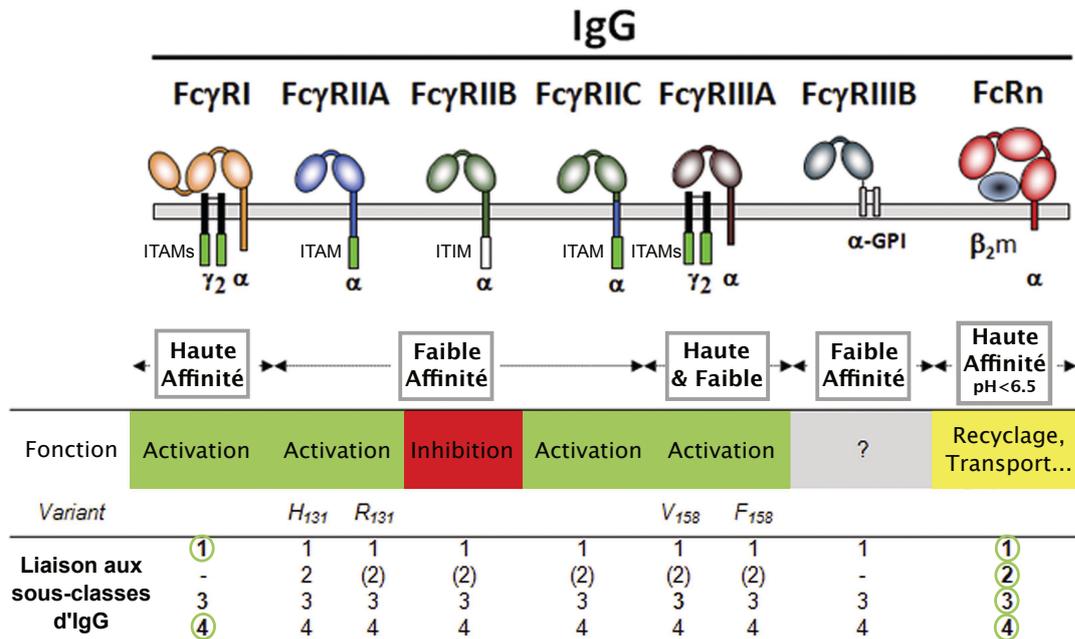


FIGURE 2.10 – Représentation schématique des différents récepteurs à la région Fc des immunoglobulines. D'après [Bruhns, 2012].

Un dernier récepteur est capable de lier les IgG, le récepteur néonatal Fc (FcRn) (figure 2.10). Ce récepteur a été décrit initialement comme médiant la transcytose des IgG maternelles chez le nouveau-né. Il a démontré par la suite être responsable du recyclage des IgG et des complexes immuns, ainsi que de la phagocytose des bactéries opsonisées par des neutrophiles. Il est présent sur les syncytiotrophoblastes, pour le transfert de l'immunité de la mère au fœtus, mais également à la surface des leucocytes, des cellules endothéliales et des cellules intestinales épithéliales [Bruhns, 2012]. L'IgG se lie à FcRn dans l'environnement acide des endosomes, le protégeant de la destruction par les lysosomes. L'IgG est ensuite recyclée à la surface et libérée par le changement de pH. FcRn intervient donc dans le temps de demie-vie des anticorps ainsi que dans la régulation de leur taux sérique. C'est la région CH2-CH3 de l'anticorps qui se lie au FcRn, et contrairement aux Fc γ R, cette liaison est strictement dépendante du pH [Yoshida et al., 2004] [Vidarsson et al., 2007].

L'interaction des IgG avec les Fc γ R, contrairement au FcRn, dépend aussi des oligosaccharides présents dans la région Fc. La glycosylation positionne les résidus critiques du domaine CH2. La composition de ces glycanes a donc un effet sur l'interaction Fc-Fc γ R, et l'activité de la fonction effectrice est connue pour être sensible aux modifications des structures oligosaccharidiques de la région Fc [Jefferis, 2007].

- **Activité phagocytaire dépendante de l'anticorps ou ADPC**

Plusieurs anticorps peuvent se fixer sur des épitopes différents d'un même antigène. Cette fixation ou « décoration immunoglobulinique » suffit pour alerter le système immunitaire de la présence d'un corps étranger. Ce processus est appelé l'opsonisation ou l'activité phagocytaire dépendante de l'anticorps (ADPC). Les anticorps fixés sont reconnus par les FcR présents sur les macrophages. La liaison du fragment Fc de l'Ig sur le FcR active alors le phagocyte ou le macrophage qui va phagocyter et ainsi éliminer l'élément fixé (ou opsonisé) par les anticorps. L'anti-CD20 Rituximab est un exemple d'anticorps sur le marché utilisant ce mécanisme d'action [Uchida et al., 2004] [Gul and van Egmond, 2015].

- **Activité cytotoxique cellulaire dépendante de l'anticorps ou ADCC**

L'activité cytotoxique à médiation cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC) est un des mécanismes majeurs lié au fragment Fc [Clynes et al., 2000]. L'ADCC se déclenche lorsqu'un complexe immun, formé avec un antigène membranaire, interagit avec le Fc γ R des cellules effectrices. Ce mécanisme très puissant nécessite que très peu d'anticorps et se déclenche dès lors qu'un anticorps lié à sa cible et se fixe sur un Fc γ R. L'anticorps engage alors une voie de signalisation qui déclenche la sécrétion de substances cytotoxiques par les cellules effectrices. Ces substances, telles que les enzymes lytiques, la perforine, les granzymes et le facteur de nécrose tumorale, vont être relarguées directement au niveau de la cellule cible, induisant sa lyse et sa destruction. Les Fc γ R lient les anticorps au niveau de la région charnière et de la région supérieure du CH2. L'induction de la fonction effectrice ADCC dépend cependant des sous-type d'IgG humaines. Alors que les IgG1 et les IgG3 permettent d'induire l'ADCC efficacement, les IgG2 et IgG4 ont une capacité très limitée à engendrer l'ADCC [Brezski et al., 2014]. Les IgG1 reconnaissent les Fc γ R activateurs avec une grande affinité. En particulier, Fc γ RIII, présent à la surface des cellules NK, semble être le récepteur majoritaire de l'induction de l'ADCC. Plusieurs AcMs sur le marché utilisent ce mécanisme qui est présenté comme un élément essentiel de leur efficacité, comme l'anti-CD20 Rituximab, l'anti-EGFR Cetuximab, ou encore l'anti-HER2 Trastuzumab [Cartron et al., 2002] [Taylor et al., 2009] [Cooley et al., 1999]. En revanche, les anticorps bloquant les récepteurs inhibiteurs des cellules immunitaires seront préférentiellement de sous-type IgG4, comme l'anti-PD-1 Nivolumab, ou ayant une faible affinité pour Fc γ RIII afin d'empêcher l'action cytotoxique envers les cellules du système immunitaire ciblées [Wang et al., 2014a].

- **Cytotoxicité dépendante du complément ou CDC**

L'activité cytotoxique dépendante du complément (CDC) est l'autre mécanisme important lié au fragment Fc. Après liaison de l'antigène tumoral cible, le fragment Fc peut également activer le complément. La formation d'un complexe antigène-anticorps permet aux IgG de recruter deux molécules de C1q. Le CDC implique donc la voie classique d'activation du complément, qui, après le recrutement de C1q et d'autres protéines du complément, provoque la formation du complexe d'attaque membranaire (appelé MAC pour *Mem-*

brane Attack Complex). Ce MAC forme des pores sur les cellules cibles provoquant la lyse directe des cellules tumorales [Introna and Golay, 2009]. Ici encore, les sous-types d'IgG humaines diffèrent quant à leur capacité à induire une réponse du complément. L'affinité pour le C1q est dépendante de la région charnière et du domaine CH2 des IgG et diffère donc avec chaque sous-type. Alors que l'affinité est décroissante avec les trois sous-classes IgG3 > IgG1 > IgG2, l'IgG4 est la seule sous-classe ne parvenant pas à recruter le complément [Tao et al., 1993]. Alors que l'anticorps Rituximab est capable d'induire la fonction CDC *in-vivo* [Di Gaetano et al., 2003], Trastuzumab et Cetuximab ne semble utiliser que faiblement voir pas du tout ce mécanisme [Wang et al., 2017] [Dechant et al., 2008]. Bien que l'activité CDC ne soit pas l'élément principal des effets antitumoraux induits par la plupart des AcMs, elle génère divers facteurs susceptibles d'améliorer l'ADCC. La libération des agents activateurs C3a et C5a entraîne un chimiotactisme permettant d'attirer au niveau de la tumeur les cellules effectrices telles que les cellules NK [Rogers et al., 2014].

Limites des anticorps produits

La première génération d'anticorps monoclonaux d'origine murine s'est révélée avoir une utilisation limitée en tant qu'agents thérapeutiques. Ces anticorps ont souvent montré une activité décevante dans les essais cliniques, due à une demie-vie sérique courte, à leur incapacité à déclencher des fonctions effectrices humaines et à des réactions indésirables [Dillman et al., 1994], et seul un anticorps murin a été autorisé, à savoir le muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®). L'étude de cet anticorps et l'avancée des connaissances autour des AcMs ont mis en évidence l'effet immunogénique des anticorps murins et ses limites. Les anticorps développés chez la souris ont été reconnus comme éléments étrangers au corps humain et ont déclenché une réaction immunitaire chez l'homme [Klee, 2000]. Les patients ont généré des anticorps anti-souris neutralisant l'anticorps thérapeutique, limitant l'efficacité du médicament et créant des effets secondaires graves [Goldstein et al., 1986] [Charpentier et al., 1991]. De plus, la partie Fc de ces anticorps étant d'origine murine, elle s'est révélée être un très mauvais activateur des fonctions immunitaires effectrices humaines énoncées ci-dessus.

La grande avancée des AcMs est venue avec l'avènement de l'humanisation des anticorps permettant de diminuer l'immunogénicité des anticorps initialement murins. Avec le développement de l'ingénierie des anticorps, de nombreuses modifications des AcMs sont devenues possibles et des avancées significatives ont été réalisées.

2.3.2 Ingénierie des anticorps

Les nouvelles technologies génétiques et moléculaires des années 80-90 ont permis le développement de nouvelles générations d'anticorps. L'ingénierie des anticorps a rendu possible l'humanisation des anticorps, ainsi que la modulation et l'optimisation de leurs activités (affinité, activité, durée de demie-vie, etc.), tout en créant de nouveaux formats.

Humanisation des anticorps monoclonaux murins

La technologie de l'ADN recombinant a permis de cloner tous les gènes des sous-types d'Ig et de générer diverses structures d'anticorps hybrides (figure 2.11 A). L'humanisation permet de conserver l'affinité de liaison et la spécificité de l'AcM parental. En éliminant la partie Fc murine, présentée comme la plus immunogène, la partie Fc alors humaine permet de réduire l'immunogénicité des AcMs et d'augmenter le potentiel des AcMs à induire les fonctions effectrices des cellules immunitaires humaines [Klee, 2000].

- **Anticorps chimériques**

La première étape a été de générer des anticorps chimériques contenant la partie Fv des anticorps murins et la partie Fc d'anticorps d'origine humaine [Boulianne et al., 1984] [Morrison et al., 1984]. La production d'anticorps chimériques, tel que l'anti-CD20 Rituximab (Rituxan) mis sur le marché en 1997 ou l'anti-EGFR Cetuximab (Erbix) autorisé en 2004, permet de conserver la spécificité des anticorps tout en diminuant les effets secondaires [Reff et al., 1994] [Maloney et al., 1997] [Baselga, 2001] [Cunningham et al., 2004].

- **Anticorps humanisés**

Le génie génétique a ensuite permis de cloner les séquences hypervariables d'Ac murins dans des vecteurs d'expression contenant les domaines humains (figure 2.11 B). Les régions déterminantes de complémentarité (CDRs) d'origine murine sont intégrées sur une région variable humaine, créant des anticorps humanisés, tel que l'anti-HER2 Trastuzumab (Herceptin), autorisé en 1998, l'anti-VEGF Bevacizumab (Avastin) mis sur le marché en 2004, ou plus récemment l'anti-PD1 Pembrolizumab (Keytruda) accepté en 2014 [Chen et al., 2003] [Hudis, 2007] [Ferrara et al., 2004]. L'anticorps humain sert alors d'échafaud aux CDRs murins, permettant leur orientation correcte [Jones et al., 1986] [Cheetham et al., 1998]. Cette approche a permis l'autorisation de nombreux AcMs, témoignant de leur sécurité et de leur tolérance chez l'homme.

- **Anticorps humains**

La volonté de réduire l'immunogénicité a abouti à la construction d'anticorps entièrement humains, comme l'anti-CTLA4 Ipilimumab (Yervoy), autorisé en 2011, l'anti-PD1 Nivolumab (Opdivo) mis sur le marché en 2015, ou plus récemment l'anti-PDL1 Durvalumab (Imfinzi) accepté en 2017 [Leach et al., 1996a] [Wolchok et al., 2013] [Scott, 2015] [Syed, 2017]. L'expression isolée de gènes du domaine variable humain dans *E. Coli* ainsi que le génie génétique ont permis de développer d'autres outils tels que la technologie du *phage display*, l'utilisation de cellules B mémoires humaines ou le développement des souris transgéniques exprimant un répertoire d'immunoglobulines humaines (figure 2.12).

La première méthode repose sur des **technologies « d'affichage »** ou de *display*, dans lesquelles le plus souvent des phages, ou encore des levures, des bactéries, mais également des ribosomes, des virus ou des cellules de mammifères, sont utilisés pour afficher des régions variables d'anticorps humains à leurs surfaces [Better et al., 1988]

a Evolution et nomenclature des anticorps murins à humains

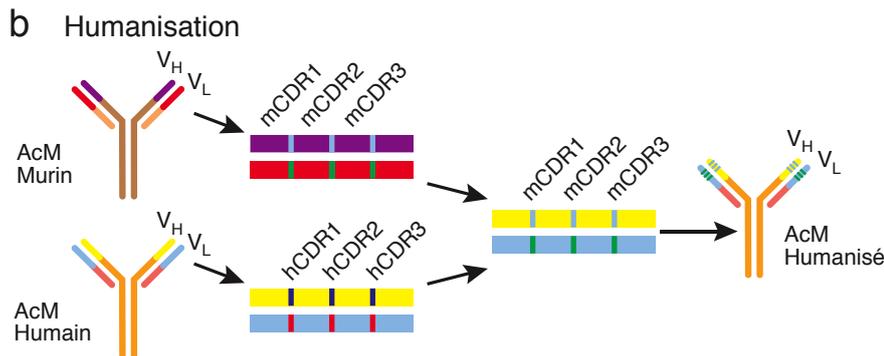
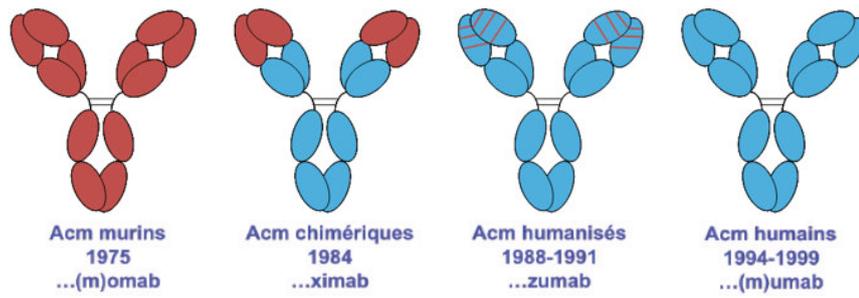


FIGURE 2.11 – Représentation schématique des différents types d’humanisation d’anticorps. D’après [Marasco and Sui, 2007].

[Skerra and Pluckthun, 1988] [Clementi et al., 2012]. Le principe est présenté sur la figure 2.12 a. Des lymphocytes B provenant de sources humaines ou animales, préalablement immunisées contre l’antigène ciblé ou non, sont isolés [Hoogenboom et al., 1998] [Benhar, 2001]. L’ARNm en est extrait et converti en ADNc puis tous les segments VH et VL sont amplifiés par PCR, constituant une banque de gènes codant pour la protéine d’intérêt [Huse et al., 1989]. Ces gènes sont ensuite insérés dans un vecteur codant pour l’une des protéines d’enveloppe du bactériophage (pIII, pIV ou pVIII). Les phages contenant le vecteur sont utilisés pour infecter des bactéries *E. coli*, permettant une forte répllication du phage. *E. coli* sécrète ensuite le bactériophage présentant à sa surface les segments VH et VL. La totalité de la banque de phages peut ensuite être criblée par sélection d’affinité, ou biopanning, sur la cible afin d’identifier les segments VH et VL spécifiques de l’antigène. Plusieurs cycles de biopanning sont effectués afin de sélectionner les clones présentant la spécificité et l’affinité la plus haute [Hoogenboom, 2005]. Les clones sélectionnés sont ensuite isolés afin d’extraire et de séquencer le gène codant pour la protéine d’intérêt. Ce gène est ensuite incorporé dans un système d’expression microbien ou cellulaire afin de produire les fragments sélectionnés à plus grande échelle. Les productions dans des cellules eucaryotes sont souvent préférées afin de permettre les modifications post-traductionnelles propres aux cellules de mammifères, et d’obtenir les décorations liées à la glycosylation

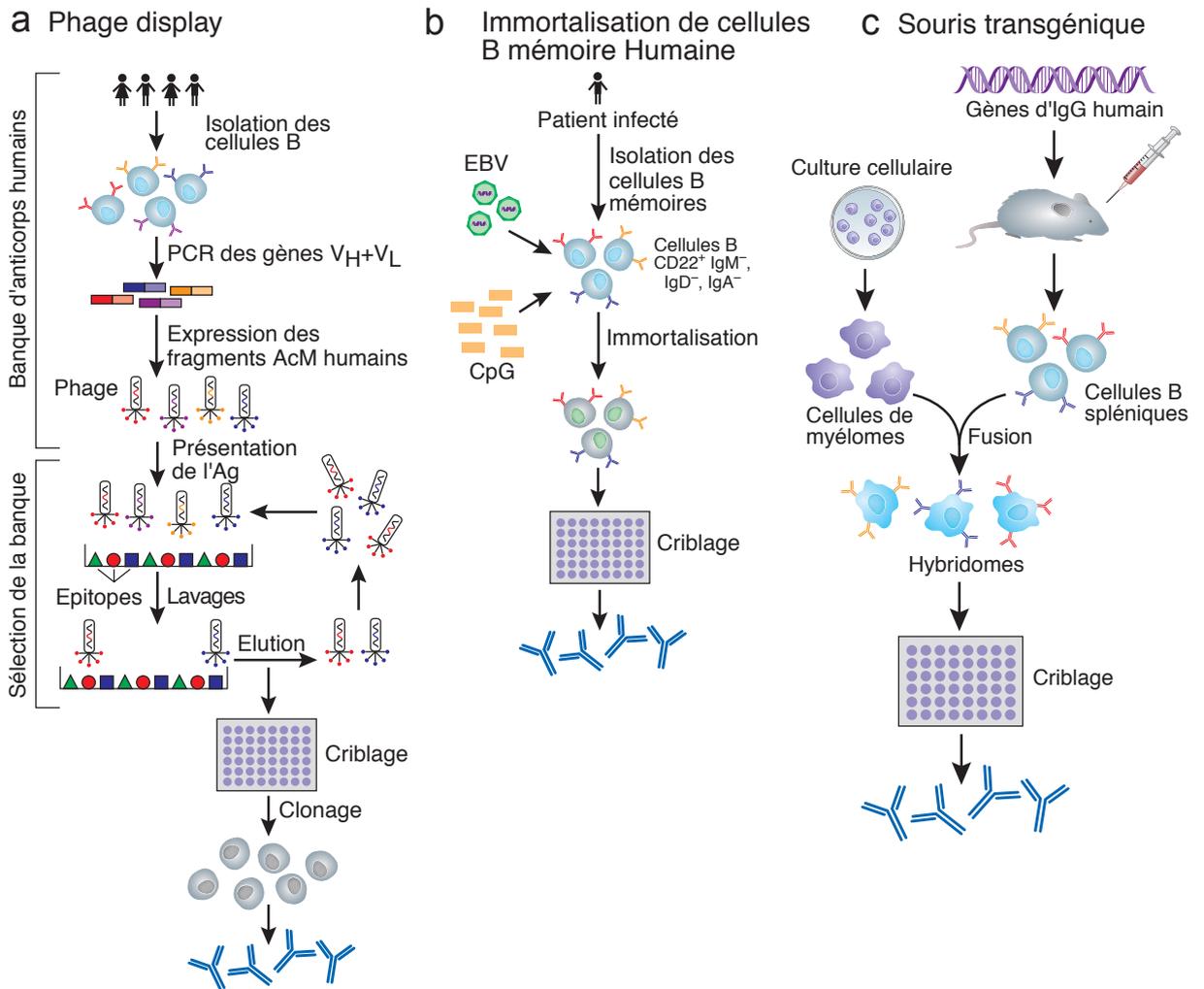


FIGURE 2.12 – Techniques de production d’anticorps monoclonaux humains. D’après Marasco, 2007

les plus proches des anticorps humains natifs [Dinnis and James, 2005]. Ces plateformes de présentation à la surface des phages permettent donc une identification rapide des fragments d’intérêt, sans immunisation car tout le processus est effectué *in-vitro*.

Une autre technique implique l’utilisation de **cellules B mémoires humaines** issues d’individus ayant été préalablement infectés (figure 2.12 b) [Bernasconi et al., 2002]. Afin d’éviter l’étape de fusion, les lymphocytes B mémoires sont immortalisés par le virus d’Epstein-Barr (EBV), en présence d’agents activateurs des cellules mémoires tels que les oligonucléotides CpG (appartenant à la famille des ligands TLR4 (Toll like receptor 4)). Les lymphocytes B résultants sont ensuite sous-clonés en suivant la même méthodologie que pour les hybridomes murins. Cette technique a l’avantage de produire directement des cellules sécrétrices d’anticorps monoclonaux humains, sans étape de fusion. Cependant, une immunisation humaine étant éthiquement non acceptable, les sources de lymphocytes B sont rares.

La troisième technologie repose sur des **souris génétiquement modifiées** dans lesquelles un locus de gène d'immunoglobuline humaine a été ajouté pour remplacer le locus du gène d'immunoglobuline de souris (figure 2.12 c). Une immunisation classique permet ainsi de produire des anticorps directement humains après la fusion et le clonage des cellules B résultantes [Green et al., 1994] [Lonberg, 2005] [Chen and Murawsky, 2018].

Les souris transgéniques et les *phages display* sont actuellement les plateformes les plus communément utilisées pour la génération d'AcMs thérapeutiques, la technologie de *phage display* permettant de générer directement des anticorps humains, sans nécessiter de fusion ni d'humanisation. Toutefois, il est important de noter que l'immunoréactivité induite par les régions variables murines reste controversée. Bien que les nouvelles générations d'anticorps soient beaucoup moins immunogènes, des réponses immunitaires contre les anticorps thérapeutiques sont encore notées [Hwang and Foote, 2005]. Les séquences des régions variables étant relativement proches entre espèces, le gain apporté par les anticorps entièrement humains par rapport aux anticorps chimériques est questionné [Clark, 2000].

Différents formats

Les anticorps entiers ont un poids moléculaire d'environ 150 kDa. Ils diffusent difficilement jusqu'au cœur de la tumeur et sont éliminés lentement. Une des limitations aux traitements de tumeurs solides par les anticorps est leur faible pénétration dans la masse tumorale. La thérapie par AcMs s'est révélée plus efficace dans le traitement des cancers disséminés (comme les leucémies ou les lymphomes par exemples). Dans certains cas, la taille peut être un problème pour l'application aux tumeurs solides. Par conséquent, des fragments d'anticorps ont été développés. Ils conservent leur capacité de liaison à l'antigène, tout en présentant de meilleures caractéristiques de pénétration tissulaire et/ou tumorale et une meilleure clairance.

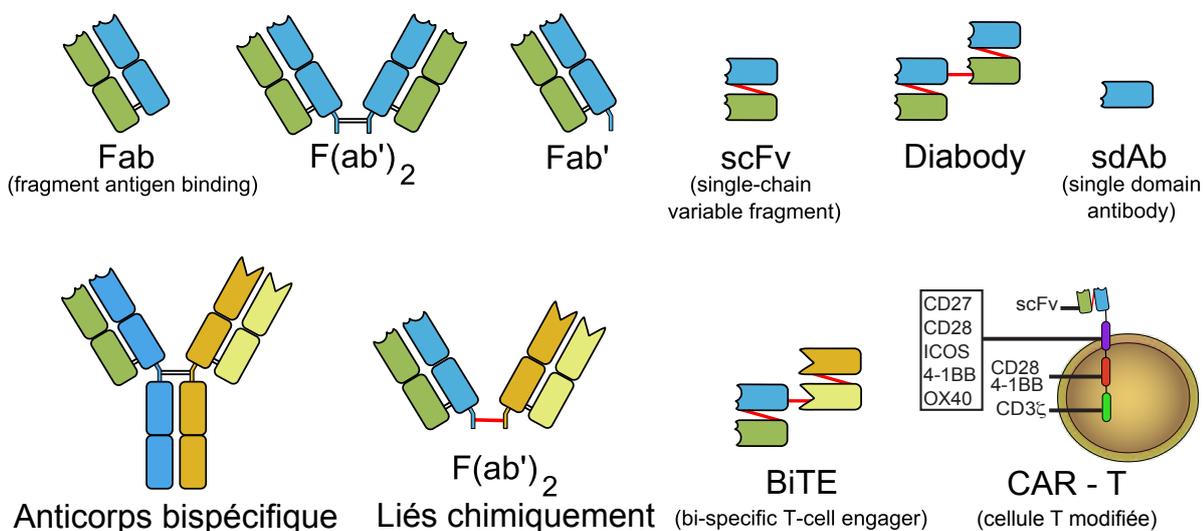


FIGURE 2.13 – Représentation schématique des différents formats d'anticorps

Des fragments d'anticorps comme les Fab, les anticorps variables monocaténares (scFv) ou les diabodies peuvent être générés en enlevant toute la région constante, une partie, ou la totalité de la portion Fc (figure 2.13). Les technologies d'ADN recombinant, comme le phage display, permettent d'obtenir de tels formats d'anticorps. Les phages display peuvent contenir des répertoires de fragments de liaison à l'antigène (Fabs), d'anticorps variables monocaténares (scFv), ou uniquement de domaine d'anticorps (sdAb) à leur surface. Plusieurs fragments plus ou moins gros peuvent être obtenus à partir du Fab (Fab, F(ab')₂, Fab'). En général, le plus petit fragment d'un anticorps qui conserve la spécificité de liaison à l'antigène de l'anticorps entier est le Fv dans lequel les domaines VH et VL sont associés de manière non covalente, même un seul domaine V peut se lier aux antigènes [Ward et al., 1989]. En raison de son instabilité à de faibles concentrations, les domaines VH et VL de Fv sont liés par un agent de liaison peptidique flexible pour former une chaîne unique Fv (scFv) [Bird et al., 1988]. Tout en maintenant une reconnaissance spécifique de la cible, leur plus petite taille (environ 25 kDa) leur permet d'atteindre des compartiments tumoraux plus profonds, entraînant une meilleure pénétration tumorale [Ahmad et al., 2012]. Dans un format légèrement différent appelé diabody, les VH et VL sont conçus pour former un scFv exprimé deux fois en tandem. Dans une autre variante, seul un domaine de l'anticorps est utilisé (sdAb). Bien que leur masse moléculaire inférieure puisse contribuer à une pénétration plus efficace de la tumeur, les anticorps entiers restent toutefois plus efficaces, en particulier s'ils sont utilisés à des fins thérapeutiques. En effet, les fragments présentent généralement des demi-vies sériques trop réduites et ne peuvent pas déclencher de fonctions effectrices. Ainsi, les fragments d'anticorps conviennent mieux à des fins d'imagerie diagnostique et de radiothérapie.

Les scFv offrent la possibilité de produire d'autres formats d'anticorps. Le premier utilise des anticorps entiers bispécifiques ou des protéines chimériques capables de se lier spécifiquement à deux cibles différentes, chacun de leur Fab reconnaissant différents épitopes, permettant une intervention thérapeutique antitumorale sélective [Zhang et al., 2017] (figure 2.13). Ces stratégies permettent une meilleure spécificité de la cible, ainsi qu'une réduction de la toxicité hors cible. Des fragments peuvent ensuite être construits sur la base de ces anticorps bi-spécifiques comme des F(ab')₂ bi-spécifiques ou encore des diabodies bi-spécifiques capables d'engager les cellules T (BiTE). À ce jour, seul un anticorps bi-spécifique est autorisé en oncologie, l'anti CD3-CD19 blinatumomab mis sur le marché en 2013 [Nagorsen et al., 2012].

Un autre format bifonctionnel intéressant est le développement de ce que l'on appelle les cellules T modifiées par CAR. Construit à la surface de cellules T, un CAR comprend un domaine scFv extracellulaire spécifique d'un antigène tumoral ainsi qu'un domaine intracellulaire comprenant les domaines transmembranaires et costimulateurs des cellules T [Gross et al., 1989b] [Gross et al., 1989a] [Sadelain et al., 2017] [Labanieh et al., 2018]. Ces récepteurs-anticorps chimériques CAR combinent à la fois la puissance de reconnais-

sance de l'antigène ainsi que la capacité destructrice des cellules T cytotoxiques. Ces CAR sont générés à partir des cellules T d'un patient qui sont extraites et modifiées afin qu'elles expriment le CAR à leur surface puis elles sont réinjectées au patient. Le répertoire des lymphocytes T est alors redirigé vers les cellules cancéreuses cibles. Au contact de l'antigène spécifique associé à la tumeur, les CAR induisent des fonctions de signalisation des lymphocytes T, telles que la sécrétion de cytokines, la prolifération cellulaire et la survie. Une réponse immunitaire spécifique qui détruit les cellules tumorales est ainsi mise en place, améliorant les fonctions des cellules effectrices [Sadelain et al., 2009]. Les premiers grands succès ont été obtenus sur les hémopathies malignes (en ciblant par exemple le CD19) [Maude et al., 2014]. Ces cellules CAR T sont également à l'étude pour des cibles de tumeurs solides (par exemple HER2, EGFR) [Jackson et al., 2016].

Amélioration de l'affinité de liaison à l'antigène

Les anticorps générés par *phage display* ou par des souris transgéniques sont souvent soumis à une ingénierie supplémentaire afin de modifier l'affinité de liaison à l'antigène. L'augmentation de l'affinité ou la maturation par affinité des anticorps a été facilitée par l'utilisation des techniques de *display*. Des mutations dans les séquences CDRs ou dans les domaines variables sont introduites afin de moduler finement la capacité de liaison des Fab. Les multiples variants sont ensuite criblés à haut débit afin de sélectionner ceux présentant une affinité améliorée. Ces différentes approches peuvent être divisées en deux catégories. La première introduit de la diversité par des mutations aléatoires, générant de grandes banques de construits [Barbas et al., 1994] [Schier et al., 1996] [Adams et al., 1998] [Zhang et al., 2004] [Lopez et al., 2018]. La deuxième, généralement préférée, consiste à créer de petites banques par mutagenèse focalisée, imitant la maturation d'affinité *in-vivo* [Yang et al., 1995] [Chowdhury and Pastan, 1999]. Il est également possible de combiner des mutations générant de petites augmentations d'affinité. Ces combinaisons ont souvent un effet additif et conduisent à une affinité grandement améliorée [Wu et al., 1998] [Wu et al., 1999b].

La facilité d'action des technologies de *display* permet de cribler un nombre important de variants, dans le seul but d'isoler uniquement les variants à plus haute affinité envers la cible. Une autre stratégie est de moduler la forme du site de liaison entre l'épitope et le paratope afin qu'elle soit plus propice à la liaison à l'antigène [Kiyoshi et al., 2014] [Ho et al., 2005] [Raghunathan et al., 2012].

En améliorant l'affinité de liaison entre un anticorps et sa cible, l'activité thérapeutique est augmentée. Ceci permet d'utiliser des doses plus faibles, de diminuer les effets secondaires et d'augmenter la fenêtre thérapeutique.

Amélioration des fonctions effectrices

Comme décrit plus haut, la liaison entre le Fc d'une Ig et les différents FcR engage de nombreuses fonctions effectrices. L'ingénierie des anticorps permet de moduler ces activités en améliorant l'affinité du Fc envers les différents récepteurs FcR, plus particulièrement les Fc γ R [Wang et al., 2018].

En premier lieu, le choix d'un isotype peut être suffisant. L'isotype et le sous-type d'un anticorps déterminent l'affinité de l'anticorps envers le FcR et donc l'efficacité thérapeutique résultant des fonctions effectrices. Par exemple, une IgG1 a plus d'affinité pour les Fc γ R activateurs que pour l'inhibiteur Fc γ RIIB [Shields et al., 2001]. Les IgG1 sont donc les isotopes de choix pour un ciblage direct de la tumeur [Bruhns et al., 2009] [Nimmerjahn and Ravetch, 2008]. En revanche, lors du développement d'anticorps stimulant les cellules immunitaires, une activité cytotoxique n'est pas favorable. Les isotopes IgG4, étant incapable de déclencher les fonctions ADCC et CDC, ces isotopes sont préférables. Toutefois, ces IgG4 peuvent recruter le Fc γ RI et ont la capacité unique d'échanger leur bras Fab *in-vivo*, ce qui peut affecter leurs propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Ces IgG sont donc à utiliser avec précaution [Kolfshoten et al., 2007] [Labrijn et al., 2009].

En second lieu, les approches d'ingénieries du fragment Fc ont permis de déterminer les sites d'interactions clés du domaine Fc avec les Fc γ R et C1q. La connaissance des sites de liaisons responsables des activités ADCC ou CDC a conduit à des efforts d'ingénierie pour moduler les fonctions effectrices des IgG [Duncan and Winter, 1988] [Duncan et al., 1988]. La plupart du temps, ce sont les capacités à induire l'ADCC et le CDC qui sont recherchées et optimisées. Un certain nombre de mutations dans le domaine Fc ont été identifiées qui, directement ou indirectement, améliorent la liaison des Fc γ R activateurs. De ce fait, la cytotoxicité cellulaire est augmentée de manière significative. Plusieurs études se sont intéressées aux variants IgG1 et ont démontré une affinité plus forte pour le Fc γ RIIIA ainsi qu'une liaison diminuée pour le récepteur inhibiteur Fc γ RIIB [Shields et al., 2001] [Lazar et al., 2006] [Richards et al., 2008] [Stewart et al., 2011]. En classant la contribution de chaque résidu, trois variants ont été identifiés comme présentant une liaison au Fc γ RIIIA améliorée et une capacité à induire une activité ADCC plus importante. L'activité CDC semble plus influencée par la région charnière et la région CH2 [Sensel et al., 1997] [Klein et al., 1981]. Des mutations au niveau de la région CH2 ont permis de délimiter un épicode de 4 aa responsable de la potentialisation de l'activité CDC [Idusogie et al., 2000]. Dans une volonté de s'affranchir des effets ADCC et CDC, des mutations ont été recherchées pour réduire ou supprimer la liaison du domaine Fc avec les Fc γ R et C1q. Des chercheurs ont ainsi identifié plusieurs mutants allant jusqu'à supprimer cette liaison [Hezareh et al., 2001] [Oganessian et al., 2008]. D'autre part, pour une stratégie de développement d'anticorps agonistes, comme les anticorps ciblant la superfamille des TNFR, un recrutement du récepteur inhibiteur Fc γ RIIB peut être intéressant car il

est le plus performant pour réticuler les AcMs. Comme énoncé précédemment, pour de tels anticorps, la réticulation est un élément indispensable pour induire une activité efficace *in-vivo*, parfois plus importante que les activités ADCC et CDC [White et al., 2013] [Li and Ravetch, 2012] [Kim and Ashkenazi, 2013] [Wilson et al., 2011]. Dans cette optique, plusieurs variants ont également été produits, présentant des affinités améliorées uniquement envers le Fc γ RIIB. Un ensemble de 6 mutations appelées V12 ont permis d'obtenir un anticorps présentant une affinité 200 fois supérieure à l'IgG1 initiale, améliorant l'activité agoniste *in-vitro* de l'anticorps [Chu et al., 2008] [Mimoto et al., 2013]. D'autres mutations du Fc ont permis une multimérisation directement au niveau de l'anticorps, indépendamment du Fc γ RIIB, facilitant la formation d'hexamères d'anticorps. Ces construits permettent à la fois d'induire une réticulation des anticorps, tout en conservant les activités ADCC et CDC [White et al., 2015] [Diebolder et al., 2014]. L'une ou l'autre de ces stratégies peut ainsi être utilisée en fonction du besoin d'induire uniquement une multimérisation des anticorps ou également les fonctions ADCC et CDC [Zhang et al., 2016].

L'activité de la fonction effectrice est également connue pour être sensible aux modifications des structures oligosaccharidiques de la région Fc [Jefferis, 2009b]. Les activités effectrices peuvent ainsi être modulées par glyco-ingénierie [Niwa and Satoh, 2015] [Jefferis, 2009a]. Un certain nombre de lignées cellulaires modifiées ainsi que des inhibiteurs de glycosidase sont disponibles pour diriger la composition en sucres des glycanes sur une immunoglobuline [Schulz et al., 2018] [Liu et al., 2018]. L'exemple le plus frappant est que l'élimination du fucose sur les anticorps améliore considérablement la liaison aux Fc γ R ainsi que l'activité ADCC et ADCP en résultant [Shields et al., 2002] [Shinkawa et al., 2003] [Herter et al., 2014] [Liu et al., 2015b]. Probablement à cause de l'encombrement stérique, la présence de fucose dans les glycanes à proximité du site de fixation au niveau de l'Asn162 réduit l'ADCC [Ferrara et al., 2006]. À l'inverse, la présence de mono-*N*-acetylglucosamine (mono-GlcNAc), de galactose et de sialyl augmente les fonctions effectrices [Dekkers et al., 2016] [Lin et al., 2015].

Amélioration des propriétés pharmacocinétiques

Les anticorps thérapeutiques IgG ont généralement une demie-vie plasmatique de 6 à 32 jours chez l'homme. La biodistribution et la demie-vie d'un anticorps peuvent également être modulées. Ceci suggère une augmentation de la durée d'action des anticorps, réduisant ainsi les doses thérapeutiques. Deux caractéristiques majeures sont utilisées dans la modification de la pharmacocinétique (PK) des anticorps : la liaison au FcRn, qui intervient dans le recyclage des IgG1, et la taille de l'AcM.

En internalisant les IgG, le récepteur Fc néonatal (FcRn) maintient les IgG plus longtemps dans l'organisme avant leur élimination et les protège des protéolyses, leur permettant de prolonger leur demie-vie à environ 21 jours [Keizer et al., 2010]. La liaison

au FcRn dicte donc la demie-vie plasmatique d'une IgG [Rath et al., 2015]. Il est possible de muter ces Igs afin qu'elles présentent une liaison renforcée pour le FcRn. Des études de mutagenèse ont démontré que des mutations à l'interface de la liaison Fc-FcRn peuvent augmenter ou diminuer les interactions avec le FcRn *in-vitro* et *in-vivo*. Plusieurs mutations ont entraîné une plus forte affinité de l'IgG envers le FcRn, résultant en une augmentation de la demie-vie sérique des mutants IgG1 chez des primates et des souris transgéniques possédant le FcRn humain, jusqu'à 4 fois supérieure à leurs homologues non mutés [Dall'Acqua et al., 2002] [Hinton et al., 2004] [Petkova et al., 2006] [Dall'Acqua et al., 2006].

La taille joue également un rôle essentiel dans la PK des anticorps. Plus un élément est gros, plus sa clairance va être lente. Les anticorps entiers ont parfois des temps de demie-vie encore trop courts. Une méthode capable d'augmenter l'encombrement stérique des anticorps est appelée PEGylation. Elle consiste à conjuguer des chaînes de polyéthylène glycol aux anticorps. La PEGylation des protéines est un processus éprouvé qui permet de réduire l'immunogénicité, d'augmenter la demie-vie sérique, d'augmenter la solubilité et de réduire la sensibilité aux protéases, tout en maintenant des propriétés pharmacologiques intéressantes [Chapman, 2002]. L'activité de liaison à l'antigène est complètement préservée. Comme énoncé précédemment, la demie-vie plasmatique des fragments d'anticorps est excessivement plus courte que celle des anticorps entiers. Ici aussi, une PEGylation permet une biodistribution plus lente, tout en conservant une pénétration plus performante [Jevsevar et al., 2012].

2.3.3 Le marché des anticorps anticancéreux

Contexte du marché des anticorps thérapeutiques

Le marché des produits pharmaceutiques évolue dans un contexte très spécifique : un besoin constant d'innovations pour un secteur dont la recherche et le développement demandent des études longues et coûteuses, avec une réglementation très stricte [Pammolli et al., 2011] [Ecker et al., 2015]. Pour pouvoir commercialiser un médicament sur un marché, il est nécessaire d'obtenir une approbation par l'organisme de santé publique correspondant, comme la FDA (Food and Drug Administration, USA) ou l'EMA (European Medicine Agency, UE). Pour l'obtention de cette autorisation de mise sur le marché (ou AMM), il est souvent considéré que 10 à 15 ans sont nécessaires pour la mise au point d'un médicament, pour un coût de 800 M€ à 1 G€ (LEEM, Recherche et Développement). Il est donc nécessaire d'amener un maximum de produits sur le marché, et ce, le plus tôt possible.

Les produits biopharmaceutiques ont été largement développés depuis les années 80. Plus particulièrement, les médicaments à base d'anticorps ont contribué de façon remarquable à l'expansion de ce segment au sein de l'industrie pharmaceutique

[Kinch and Griesenauer, 2018] [Hernandez et al., 2018]. Les anticorps ayant démontré leur fort potentiel thérapeutique, d'important efforts ont été mis en place pour leur développement, résultant en un nombre toujours croissant de médicaments à base d'anticorps, et ce dans de nombreux domaines thérapeutiques, notamment en oncologie. Depuis l'AMM du premier anticorps en 1992, le muromonab-CD3, la FDA et l'EMA ont autorisé la mise sur le marché d'environ 80 nouveaux anticorps thérapeutiques, avec une augmentation significative depuis 2014, aboutissant à un record jamais atteint en 2017 de 10 nouveaux anticorps ayant obtenu l'AMM.

Les anticorps anticancéreux sur le marché

Sources : Food and Drug Administration (FDA), Agence Européenne des Médicaments (EMA), Les Entreprises du Médicament (LEEM), Antibody Society.

Parmi tous les anticorps ayant reçu une AMM, plus de 45% sont indiqués pour les cancers (hématologiques et non-hématologiques), suivis des anticorps ciblant les maladies auto-immunes, les maladies infectieuses, puis les maladies cardiovasculaires [Kaplou and Reichert, 2018]. Les premiers développements d'AcMs anticancéreux visaient à cibler directement les cellules malignes et à induire leur élimination. L'AMM des deux premiers AcMs, l'anti-CD20 Rituximab et l'anti-HER2 Trastuzumab a fourni les preuves de concepts de l'efficacité et des modes d'actions de ces AcMs. Aujourd'hui, une trentaine d'anticorps à visée anticancéreuse a été autorisée (tables 2.2, 2.3, 2.4).

Parmi eux, sept anticorps ont marqué des tournants importants dans le traitement du cancer :

— Rituximab

Il est le premier anticorps anticancéreux autorisé par la FDA pour le traitement de tumeurs malignes à cellules B CD20 positives. Cet anticorps chimérique, ciblant le CD20 à la surface des cellules B et induisant leur apoptose, est le seul anticorps agoniste sur le marché [Vega et al., 2009] [Lim and Levy, 2014]. Son activité dépend largement des fonctions effectrices ADCC, CDC et ADCP [Weiner, 2010]. Rituximab est très probablement l'anticorps le plus étudié, avec plus d'une dizaine de dérivés présentant des fonctions effectrices optimisées [Boross and Leusen, 2012].

— Trastuzumab

Le traitement par les AcMs des tumeurs solides a débuté en 1998 avec l'autorisation de l'anti-HER2 humanisé Trastuzumab pour le traitement du cancer du sein qui surexprime HER2 (*Human Epidermal Growth Factor 2*). Cet anticorps se lie à la région juxtamembranaire IV du domaine extracellulaire de l'antigène de surface HER2. Le mécanisme exact d'action de Trastuzumab reste à éclaircir, bien que l'on sache que la dimérisation et la phosphorylation du récepteur soient des éléments indispensables à l'activité de HER2. Trastuzumab semble inhiber la dimérisation du récepteur en induisant son internalisation et sa dégradation [Hudis, 2007] [Chen et al., 2003]. Une étude récente a cependant révélé

qu'en l'absence d'autres membres de la famille HER, Trastuzumab n'empêchait ni l'homodimérisation ni la phosphorylation de HER2, mais exerçait son action via les fonctions effectrices d'ADCC [Maadi et al., 2018] [Kohrt et al., 2012].

— **Cetuximab**

Les systèmes liés aux facteurs de croissance étant surexprimés sur les tumeurs, ils sont des cibles intéressantes pour le développement d'AcMs anticancéreux. Les anticorps qui ciblent les récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR pour *Epithelial Growth Factor Receptor*) figurent parmi les inhibiteurs les plus puissants de la transduction du signal. L'anti-EGFR chimérique Cetuximab agit en bloquant physiquement l'interaction entre le récepteur et son ligand activateur et en empêchant le récepteur d'acquiescer stériquement sa conformation dimérique active [Ferguson, 2004]. Ceci affecte l'initiation de la transduction d'un signal de croissance et de survie. Cetuximab a également démontré des capacités d'induire l'ADCC et le CDC [Kimura et al., 2007].

— **Bevacizumab**

Une autre action intéressante est la neutralisation des systèmes apportant les nutriments aux tumeurs ou stimulant leur croissance. Les cellules tumorales ont besoin de former de nouveaux vaisseaux sanguins afin de les alimenter. Une des cytokines intervenant dans ce processus est le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et son récepteur est le VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*). Bevacizumab (Avastin®), autorisé en 2004, neutralise la cytokine VEGF-A, et l'empêche de se lier à ses récepteurs (VEGFR-1 et -2) [Kim et al., 1993]. En bloquant ce système, cet anticorps empêche l'angiogenèse, ou néovascularisation, ce qui a pour conséquence d'affamer la tumeur [Ferrara et al., 2004]. Bevacizumab a démontré une efficacité intéressante dans les cancers colorectaux et le cancer du poumon non à petites cellules [Lyseng-Williamson and Robinson, 2006].

— **Ipilimumab, Pembrolizumab et Durvalumab**

Au cours des dernières années, des progrès majeurs ont été réalisés dans le traitement à base d'AcMs grâce à l'utilisation d'anticorps immunomodulateurs, capables de bloquer les mécanismes suppresseurs des cellules immunitaires [Sharma and Allison, 2015]. La première preuve de concept arrive avec la découverte que l'anti-CTLA4 humain (Ipilimumab) apporte des bénéfices significatifs aux patients atteints de mélanome et carcinome. En bloquant la liaison entre CTLA4 et B-7, mécanisme important dans l'inhibition des cellules T, Ipilimumab renforce le système immunitaire [Schadendorf et al., 2015]. Deux anticorps ciblant l'axe PD-1/PD-L1 (l'anti-PD1 Pembrolizumab et l'anti-PD-L1 Durvalumab) ont démontré que d'autres récepteurs impliqués dans les signaux inhibiteurs des cellules T, des cellules B et des cellules NK amélioreraient également la fonction immunitaire.

Les versions optimisées de ces anticorps (Obinutuzumab, Panitumumab, Nivolumab, etc.) ne sont pas détaillées ici, mais elles sont présentées dans les tableaux 2.2, 2.3, 2.4.

L'augmentation du nombre d'AcMs à recevoir une AMM tend à persister car de nombreux anticorps sont en développement. Il apparaît que 12 anticorps sont susceptibles d'être acceptés courant 2018. Parmi eux, 4 sont indiqués contre des cancers (sacituzumab govitecan, moxetumomab pasudotox, cemiplimab, ublituximab), tandis que 19 autres sont actuellement en phase clinique dont 10 contre des cancers [Kaplon and Reichert, 2018]. De nombreux efforts continuent ainsi à être mis en place pour développer de nouvelles constructions d'anticorps, qui permettront d'offrir de nouvelles solutions thérapeutiques pour les années à venir. Les anticorps agonistes présentent un fort potentiel thérapeutique à exploiter [Carter and Lazar, 2018]. Les récepteurs DR4 et DR5 sont des cibles de choix pour le développement d'AcMs anticancéreux car ils sont préférentiellement exprimés sur les cellules tumorales et peuvent agir directement pour déclencher sélectivement l'apoptose des cellules cancéreuses.

TABLE 2.2 – Anticorps anticancéreux sur le marché période 1997 - 2007

Nom Commercial	Anticorps	Entreprise	Cible	Type	Indication	Ière autorisation par l'EMA	Ière autorisation par la FDA
Rituxan®	Rituximab	Biogen Idec, Genentech (Roche)	CD20	IgG1 chimérique	Lymphome non hodgkinien; leucémie lymphocytaire chronique	1998	1997
Herceptin®	Trastuzumab	Genentech (Roche)	HER-2	IgG1 humanisé	Cancer du sein; adénocarcinome gastrique ou gastro-oesophagienne métastatique	2000	1998
Mylotarg®	Gemtuzumab ozogamicin	Wyeth	CD33	ADC (IgG4 humanisé)	Leucémie myéloïde aiguë (AML)	Non autorisé	2000 (retiré en 2010 et autorisé en 2017)
Campath®	Alemtuzumab	Millennium Pharm. et Genzyme	CD52	IgG1 humanisé	Leucémie lymphoïde chronique à cellules B	2001	2001
Bexxar®	Tositumomab et tositumomab iodine 131	Corixa et GSK	CD20	IgG2a murin	Lymphome non-hodgkinien	Non autorisé	2003
Zevalin®	Ibritumomab tiuxetan	Biogen Idec	CD20	IgG1 murin	Lymphome non-hodgkinien	2004	2002
Erbix®	Cetuximab	Eli Lilly, Merck Serono et BMS	EGFR	IgG1 chimérique	Cancer de la tête et du cou; cancer colorectal	2004	2004
Avastin®	Bevacizumab	Genentech (Roche)	VEGF	IgG1 humanisé	Cancer colorectal métastatique; cancer du poumon non à petites cellules; cancer du sein et cancer rénal métastatiques; glioblastome multiforme	2005	2004
Vectibix®	Panitumumab	Amgen	EGFR	IgG2 humanisé	Carcinome colorectal métastatique	2007	2006

TABLE 2.3 – Anticorps anticancéreux sur le marché période 2008 - 2015

Nom Commercial	Anticorps	Entreprise	Cible	Type	Indication	lère autorisation par l'EMA	lère autorisation par la FDA
Arzerra®	Ofatumumab	Genmab et GSK	CD20	IgG1 humain	Leucémie lymphocytaire chronique	2010	2009
Xgeva®	Denosumab	Amgen	RANKL	IgG2 humain	Métastases osseuses	2011	2010
Yervoy®	Ipilimumab	BMS	CTLA-4	IgG1 humain	Mélanome	2011	2011
Adcetris®	Brentuximab vedotin	Seattle Genetics	CD30	ADC (IgG chimérique -MMAE)	Lymphome de Hodgkin (HL), lymphome anaplasique à grandes cellules systémiques(ALCL)	2012	2011
Perjeta®	Pertuzumab	Roche	HER-2	IgG1 humanisé	Cancer mammaire	2013	2012
Kadcyla®	Trastuzumab emtansine	Roche	HER-2	ADC (IgG1 humanisé)	Cancer du sein	2013	2013
Gazyvaro®	Obinutuzumab	Roche	CD20	IgG1 humanisé (glyco-ingénierie)	Leucémie lymphocytaire chronique (CLL)	Non autorisé	2013
Sylvant	Siltuximab	Janssen Pharmaceutical	IL-6	IgG1 chimérique	Maladie de Castleman multicentrique	2014	2014
Cyramza®	Ramucirumab	Eli Lilly	VEGF	IgG1 humanisé	Néoplasmes de l'estomac	2014	2014
Keytruda®	Pembrolizumab	Merck Sharp & Dohme	PD-1	IgG4 humanisé	Mélanome	2015	2014
Blinicyto®	Blinatumomab	Amgen	CD19 et CD3	BiTE (anticorps bispécifique)	Cellule précurseur leucémie lymphoblastique; lymphome	2015	2014
Opdivo	Nivolumab	Bristol-Myers Squibb Pharma	PD-1	IgG4 humain	Carcinome; carcinome pulmonaire non à petites cellules; Mélanome de la maladie de Hodgkin	2015	2015
Unituxin	Dinutuximab	United Therapeutics Europe	GD2	IgG1 humain	Neuroblastome	2015 (retiré en 2017)	2015

TABLE 2.4 – Anticorps anticancéreux sur le marché période 2015 - août 2018

Nom Commercial	Anticorps	Entreprise	Cible	Type	Indication	ère autorisation par l'EMA	ère autorisation par la FDA
Darzalex®	Daratumumab	Janssen-Cilag	CD38	IgG1 humain	Myélomes multiples	2016	2015
Portrazza	Necitumumab	Eli Lilly	EGFR	IgG1 humain	Carcinome pulmonaire non à petites cellules	2016	2015
Empliciti	Elotuzumab	Bristol-Myers Squibb	SLAMF7	IgG1 humanisé	Myélomes multiples	2016	2015
Tecentriq®	Atezolizumab	Genentech (Roche)	PD-L1	IgG1 humanisé	Cancer bronchique métastatique non à petites cellules	Non autorisé	2016
Lartruvo	Olaratumab	Eli Lilly	PDGFR- α	IgG1 humain	Sarcome	2016	2016
Poteligeo	Mogamulizumab	Kyowa Hakko Kirin	CCR4	IgG1 humanisé (glyco-ingénierie)	Lymphome cutané à cellules T	2016	2018
Imfinzi®	Durvalumab	Astrazeneca UK	PD-L1	IgG1 humain	Carcinome urothélial métastatique	2017	2017
Bavencio	Avelumab	EMD Serono et Pfizer	PD-L1	IgG1 humain	Carcinome à cellules de Merkel	2017	2017
Ocrevus	Ocrelizumab	Roche	CD20	IgG1 humanisé	Sclérose en plaque	2017	2017
Besponsa	Inotuzumab ozogamicin	Pfizer	CD22	ADC (IgG4 humanisé)	Leucémie lymphoblastique aigüe	2017	2017
Lexigen/Quarziba	Dinutuximab beta	EUSA	GD2	IgG1 chimérique	Neuroblastome	2017	Non autorisé

Chapitre 3

Anticorps monoclonaux et dérivés ciblant le système TRAIL

Après la découverte attrayante de la sélectivité et des propriétés de signalisation de TRAIL, les tentatives pour amener le système TRAIL-TRAILRs jusqu'à son utilisation clinique ont été nombreuses. Pour initier la voie extrinsèque de l'apoptose, les récepteurs DR4 et DR5 doivent être multimérisés. Plusieurs composés ont été développés pour induire cette multimérisation, utilisant TRAIL recombinant ou des constructions d'anticorps monoclonaux (AcM) anti-DR4 et anti-DR5. D'abord développée par Genentech, la première génération de composés agonistes ou dérivés de TRAIL n'a malheureusement pas montré les résultats escomptés, les traitements ne présentant pas d'efficacité clinique [Micheau et al., 2013]. Toutefois, les études récentes sur la transduction du signal TRAIL ont permis de mieux comprendre ses mécanismes et ses exigences. Ces nouvelles données ont conduit au développement d'un nombre important de dérivés plus efficaces, comme par exemple, des fragments d'anticorps (scFv), des anticorps bis-spécifiques, des récepteurs-anticorps chimériques (CAR) ou des dérivés conjugués (ADC) [Dubuisson and Micheau, 2017].

3.1 Essais cliniques de TRAIL

3.1.1 Première génération

Le TRAIL humain recombinant, rhTRAIL, a été largement testé au niveau préclinique pour ses propriétés de destruction sélective des tumeurs et sa sûreté [Ashkenazi et al., 1999]. Les bons résultats ont encouragé Genentech à développer la dulcanermine, rhApo2L / TRAIL, une protéine recombinante codant pour les acides aminés (aa) 114 à 281 de TRAIL. Les essais cliniques de phase I/II ont montré que la dulcanermine est bien tolérée chez les patients [Herbst et al., 2006] [Ling et al., 2006]. Toutefois, en monothérapie, la dulcanermine n'a pas présenté d'activité antitumorale clinique. De nombreuses études

pré-cliniques ont démontré la capacité des médicaments chimiothérapeutiques conventionnels à augmenter ou restaurer la sensibilité du TRAIL dans les cellules tumorales. Des essais cliniques supplémentaires ont donc été mis en place pour évaluer l'efficacité thérapeutique de la dulanermine combinée à des chimiothérapies ou avec des traitements incluant des AcMs [Micheau et al., 2013]. Malheureusement, bien que ces combinaisons soient bien tolérées chez les patients, les traitements n'ont pas induit d'activité thérapeutique globale suffisante pour continuer le développement clinique [Soria et al., 2010] [Quintavalle and Condorelli, 2012] [Cheah et al., 2015].

Les limitations de son efficacité pourraient s'expliquer par deux facteurs principaux, la courte biodisponibilité de la dulanermine ainsi que la résistance inhérente des tumeurs primaires à la mort cellulaire induite par TRAIL. L'instabilité, due au maintien de la structure par des liaisons non-covalentes, et la rapide clairance de la dulanermine induisent une demie-vie allant de 40 min à 1 h après l'injection. La demie-vie de la dulanermine s'est révélée trop courte, limitant considérablement sa fenêtre d'activité thérapeutique [Wang et al., 2014b].

Le deuxième problème est la résistance possible des cellules cancéreuses au traitement. Au niveau de la membrane cellulaire, la résistance peut être due à l'expression d'inhibiteurs, comme les récepteurs antagonistes DcR1, DcR2 dont l'affinité de liaison avec la dulanermine est presque identique à celle de DR4 et DR5 [Truneh et al., 2000]. Le microenvironnement tumoral est un système biologique complexe, dans lequel l'action antitumorale de la dulanermine est également susceptible d'être compromise, quelle que soit la sensibilité initiale de la tumeur elle-même. De même, il a été récemment proposé que les cellules stromales hébergeant des DcR sont également susceptibles d'entraver l'efficacité de la dulanermine [O'Leary et al., 2016]. Au niveau intracellulaire, le nombre assez conséquent d'inhibiteurs peut induire une résistance de TRAIL après liaison à ses récepteurs agonistes, l'inhibiteur le plus important étant c-FLIP, dont l'expression dans les cellules cancéreuses s'est avérée être régulée positivement par les biomolécules actives dérivées du sérum, telles que les phospholipides [Kang et al., 2004]. De même, dans les lymphomes folliculaires, CD40L est capable d'induire la voie NF- κ B, augmentant la quantité des inhibiteurs c-FLIP et Bcl-xL, et protégeant les cellules de l'apoptose induite par TRAIL [Travert et al., 2008]. La régulation positive de ces inhibiteurs dans les tumeurs primaires contribue très certainement au manque d'efficacité de la dulanermine. Ce constat a soulevé le besoin de développer des produits présentant une meilleure efficacité. Il convient de noter toutefois qu'un nouvel essai clinique de phase III, visant à évaluer les effets de la dulanermine dans le traitement du cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) avancé, vient tout juste de démontrer un avantage modéré à l'utilisation de la dulanermine. Ces traitements pourraient donc être encourageants pour les patients atteints de CPNPC avancé [Ouyang et al., 2018].

3.1.2 Nouvelles versions de TRAIL

En réponse aux résultats décevants de la dulanermine, plusieurs nouvelles formulations de TRAIL ont été développées pour améliorer la stabilité et la demie-vie de TRAIL [Schneider et al., 2010] [Lemke et al., 2014b] [Lim et al., 2015] [de Miguel et al., 2016]. Un certain nombre en est présenté dans la figure 3.1. La plupart des tentatives sont basées sur la multimérisation de TRAIL par des chaînes simples (scTRAIL), par exemple, en le fusionnant au fragment d'anticorps variable monocaténaire (scFv-TRAIL) ou à des protéines particulières (6xHis-TRAIL, LZ-TRAIL, ténascine-C). Parmi les nombreuses formulations de TRAIL fusionnés, les constructions ténascine-C-TRAIL (TNC-TRAIL), 6xHis-TRAIL, SuperKiller TRAIL, TRAIL-Fc et TRAIL monocaténaire (scTRAIL) présentent des propriétés conformationnelles et pharmacocinétiques intéressantes. Des constructions telles que TNC-TRAIL, SuperKiller TRAIL ou 6xHis-TRAIL ont été développées pour stabiliser la conformation multimérique de TRAIL, permettant d'augmenter à la fois l'agrégation des récepteurs et l'apoptose [Berg et al., 2007] [Dufour et al., 2017a]. TRAIL-Fc et scTRAIL ont été utilisés pour augmenter la biodisponibilité et la demie-vie de TRAIL, ainsi que son activité tumoricide [Wang et al., 2014c]. Plus précisément, le trimère scTRAIL hautement stable (APG350) a été conçu comme un TRAIL hexavalent. Cette construction de TRAIL est capable d'induire une mort cellulaire programmée robuste sans nécessiter de réticulation supplémentaire, comme cela est parfois requis pour augmenter d'autres préparations recombinantes de TRAIL, comme Flag-TRAIL [Gieffers et al., 2013] [Wajant et al., 2001].

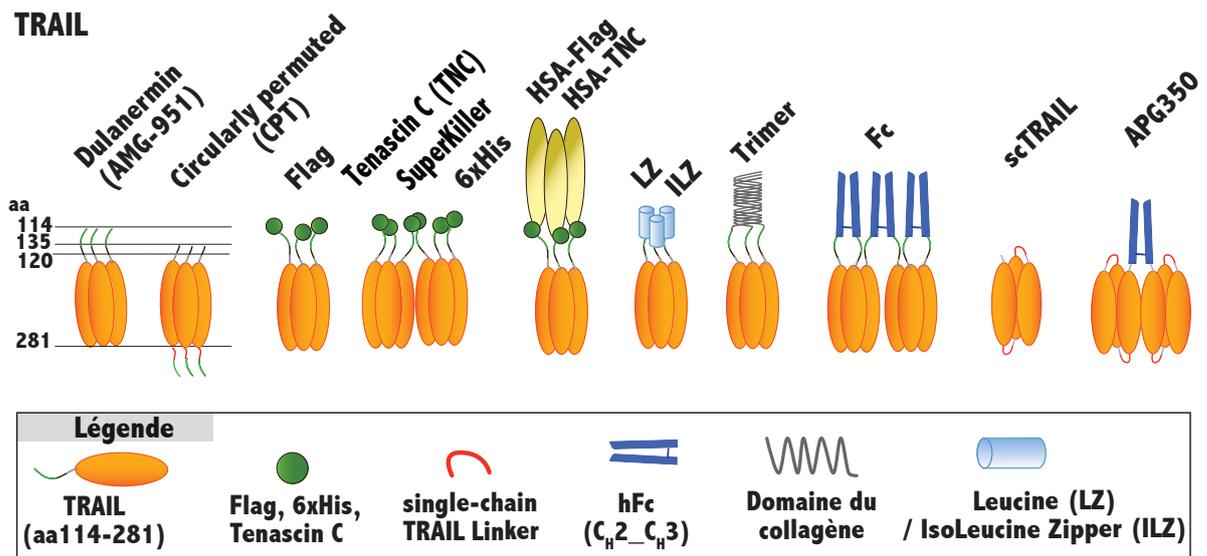


FIGURE 3.1 – Représentation schématique des principales nouvelles version de TRAIL recombinant utilisés dans des essais cliniques ou en laboratoire pour induire l'apoptose via DR4 et/ou DR5.

Plus récemment, Beijing Sunbio Biotech Co. Ltd. (Pékin, Chine) a développé une nouvelle préparation, TRAIL circulairement permuté (CPT). Ce variant présente une meilleure stabilité, une demie-vie plus longue et une activité antitumorale plus forte par rapport à la dulanermine. Dans les essais cliniques précoces de phase II, CPT est bien toléré avec des toxicités limitées. CPT induit une réponse antitumorale, seul ou associé au thalidomide et / ou à la dexaméthasone, chez des patients atteints de myélome multiple récidivant ou réfractaire [Chen et al., 2012] [Geng et al., 2014] [Leng et al., 2017]. CPT s'est ainsi révélé, jusqu'à présent, le dérivé de TRAIL le plus performant et le plus prometteur. Cependant, semblable à TRAIL, CPT se lie aux récepteurs leurres et pourrait potentiellement favoriser la migration cellulaire et les métastases.

Toutes ces limitations ont donc entraîné le développement de thérapies plus spécifiques ciblant uniquement DR4 et DR5.

3.2 Anticorps monoclonaux ciblant DR4 et DR5 et essais cliniques

Les anticorps monoclonaux représentent des outils de choix pour le ciblage de DR4 et DR5. Ils offrent clairement des avantages pour l'éradication des tumeurs. Premièrement, ils ont une demie-vie *in-vivo* plus longue que TRAIL (environ 21 jours). Deuxièmement, leurs domaines Fc permettent des interactions avec les récepteurs Fc (FcR) présents sur la surface cellulaire des cellules immunitaires conduisant à la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et à la cytotoxicité cellulaire dépendante du complément (CDC). Enfin, en raison de leur sélectivité et de leur spécificité envers DR4 ou DR5, les AcMs sont totalement indépendants de l'expression des récepteurs leurres, que ce soit sur les cellules tumorales ou sur le microenvironnement. Mais ces anticorps présentent aussi des limitations. En étant bivalents, ils pourraient être moins capables de multimériser les récepteurs agonistes et risquent d'être moins actifs que TRAIL.

Jusqu'à présent, sept anticorps monoclonaux agonistes ont été testés dans des essais cliniques : un anti-DR4 et six anti-DR5. La plupart de ces anticorps induisent une mort apoptotique canonique, à part lorsque cela est spécifié.

3.2.1 Anti-DR4

Mapatumumab (HGS-ETR1)

Mapatumumab, également connu sous le nom de HGS-ETR1 ou TRM1, est le seul anticorps monoclonal anti-DR4 évalué dans des essais cliniques jusqu'à présent. Développé par Human Genome Science (HGS) en 2005, cet agoniste a démontré une liaison sélective et élevée à DR4, ainsi qu'une cytotoxicité efficace [Pukac et al., 2005]. Cet anticorps entièrement humain a été construit par phage display en utilisant une large banque de gènes

scFv de lymphocytes B humains non immunisés. Afin d'obtenir Mapatumumab, le scFv correspondant à HGS-ETR1 a été sélectionné pour sa forte activité puis converti en IgG1. Mapatumumab promeut l'apoptose de divers types de cellules tumorales *in-vitro*, et sur des modèles de xénogreffes *in-vivo* [Pukac et al., 2005]. Cet anticorps induit l'apoptose de manière dose-dépendante *in-vitro* dans un large spectre de lignées cellulaires tumorales humaines. Comme exposé précédemment, DR4 ne nécessite pas de réticulation secondaire pour engager le processus apoptotique [Pukac et al., 2005]. Le mécanisme d'action de cet anticorps semble donc venir de sa capacité à multimériser et à engager DR4, induisant la signalisation apoptotique. Mapatumumab a également démontré la capacité d'induire les fonctions ADCC et CDC sur des lymphomes et potentialise les effets du Rituximab [Maddipatla et al., 2007]. *In-vivo*, Mapatumumab permet une regression tumorale chez des souris portant des xénogreffes de tumeurs humaines Colo205 (colorectal), H2122 (pulmonaire) et A498 (rénale) [Pukac et al., 2005]. La combinaison du Mapatumumab avec des chimiothérapies permet d'augmenter leur effet anti-tumoral, suggérant que Mapatumumab pourrait être utile en association avec des agents chimiothérapeutiques. Des études pharmacocinétiques et toxicologiques ont été réalisées sur des singes cynomolgus et des chimpanzés. Des doses allant jusqu'à 40 mg/kg tous les 10 jours pendant 6 mois ont été bien tolérées. La durée de demie-vie est d'environ 23 jours [Tolcher, 2007].

TABLE 3.1 – Essais cliniques incluant Mapatumumab seul ou en combinaison

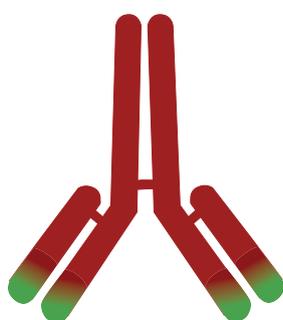
Mapatumumab	Phase Clinique	Indication	Réponses	Références
Seul				
	Ia	Tumeurs solides avancées	Bien toléré à 20 mg/kg	[Tolcher, 2007] [Hotte et al., 2008]
	Ib / II	LNH récidivant ou réfractaire	3/15 réponses cliniques	NCT00094848 [Younes et al., 2010]
	II	CPNPC	Bien toléré Pas d'avantage	NCT00092924 [Greco et al., 2008]
		Cancer colorectal réfractaire	Maladie stable	[Trarbach et al., 2010]
Combinaisons				
Paclitaxel & carboplatine	I/Ib	Tumeurs solides avancées	Bien toléré	[Chow et al., 2006a] [Leong et al., 2009]
	II	CPNPC avancé	Pas d'avantage	[von Pawel et al., 2014]
Gemcitabine & cisplatine	Ib	Tumeurs solides avancées	Bien toléré à 30 mg/kg	[Mom et al., 2009]
Cisplatine & radiothérapie	Ib/II	Cancer cervical avancé de première ligne	/	NCT01088347
Sorafenib	Ib	Carcinomes hépatocellulaires avancés	Bien toléré à 30 mg/kg	NCT00712855 [Sun et al., 2011]
	II	Carcinomes hépatocellulaires avancés de première ligne	Pas d'avantage	NCT01258608 [Ciuleanu et al., 2016]

Toutes ces données encourageantes ont permis d'évaluer Mapatumumab dans plusieurs essais cliniques de phase I et II. Mapatumumab a été testé seul ou en combinaison avec des agents cytotoxiques, du sorafenib ou de la radiothérapie (table 3.1). Mapatumumab, utilisé à des doses variants de 20 à 30 mg/kg présente peu de toxicité, qu'il soit utilisé seul ou en combinaison. Malheureusement, aucun de ces essais n'a atteint les objectifs initiaux, ce qui a entraîné l'arrêt de son développement clinique.

Anticorps anti-DR4 en recherche

Cependant, le développement de nouveaux AcM ciblant DR4 se poursuit. Plusieurs AcMs ciblant DR4 ont été décrits dans des études précliniques, présentant un potentiel pro-apoptotique intéressant (figure 3.2).

anti-TRAIL-R1



Igs en Recherche

4H6 & 4G7

Chuntharapai, et al J Immunol 2001

AY4

Sung et al Mol Can Ther 2009

m921/922

Feng et al mAbs 2010

TR1-mAbs

Lin et al BBRC 2010

Guo et al J Can 2017

Igs en Clinique

Mapatumumab

(HGS-ETR1 or TRM1)

Pukac et al Brit J Cancer 2005

Georgakis et al Brit J Haematol 2005

Tolcher et al JCO 2007

FIGURE 3.2 – Représentation schématique des anticorps anti-DR4. m921, 4H6 & 4G7, AY4 et TR1-mAbs sont des anticorps murins testés dans des études pré-cliniques. Mapatumumab est le seul anticorps ciblant DR4 évalué lors d'essais cliniques.

- 4H6 et 4G7

Les deux anticorps 4H6 et 4G7 ont été développés par immunisation protéique en utilisant des souris Balb/c. Ces anticorps ont une affinité de 20 pM et 5 pM pour 4G7 et 4H6 respectivement [Chuntharapai et al., 2001]. Alors que 4H6 est une IgG1, qui reconnaît sûrement le même épitope que TRAIL puisqu'il entre en compétition avec ce dernier, 4G7 est une IgG2a qui ne bloque pas la liaison de TRAIL avec DR4. Bien que ces deux anticorps n'induisent une activité pro-apoptotique *in-vitro* que lorsqu'ils sont réticulés, 4H6 est capable d'induire une régression tumorale totale *in-vivo* sans l'ajout d'agents réticulants, alors que IgG2a-4G7 ne fait que ralentir la croissance tumorale. Le changement d'isotype de chacun des deux anticorps a mis en avant l'importance de l'isotype IgG1 pour induire une activité anti-tumorale *in-vivo*, indépendamment de la qualité de liaison envers DR4. L'activité de ces anticorps est donc très probablement due à une agrégation *in-vivo* par les cellules du système immunitaire possédant un Fc γ R, ou à une forte activité des fonctions effectrices, à savoir l'ADCC, l'ADCP et/ou le CDC [Chuntharapai et al., 2001].

- AY4

L'anticorps AY4 a également été obtenu par une approche protéique d'immunisation de souris Balb/c. Il a été sélectionné pour sa capacité à reconnaître DR4 recombinant et pour son activité tumoricide. AY4 se lie au DR4 avec une affinité de $7,1 \pm 0.6$ nM. Il permet d'induire une cytotoxicité dose-dépendante sur un panel de 7 lignées cancéreuses humaines sensibles à TRAIL. Cette cytotoxicité n'est cependant pas retrouvée sur des lignées cancéreuses résistantes à TRAIL ou sur des hépatocytes humains normaux. Le traitement *in-vivo* par AY4 retarde la pousse tumorale des cellules de carcinomes non à petites cellules (H460). Cet anticorps est donc capable d'induire une activité pro-apoptotique intéressante pour des développements thérapeutiques futurs [Sung et al., 2009].

- m291

Cet anticorps humain a été développé par phage display en utilisant une banque de gènes scFv issus de lymphocytes B humains naïfs. Il a été sélectionné pour son haut niveau de liaison envers DR4 recombinant, et semble chevaucher le site de liaison de TRAIL. La version entière IgG1 présente une haute avidité et une sélectivité envers DR4 exprimé à la surface de la lignée cellulaire de lymphome B ST486. Sur cette même lignée, m921 induit seul une cytotoxicité dose-dépendante à forte concentration (500 nM). Aucune cytotoxicité n'est retrouvée sur des cellules MCF-7, n'exprimant pas de DR4 membranaire dans cette étude. La toxicité est donc spécifique. L'effet est cependant inférieur au rTRAIL utilisé à une concentration 100 fois plus faible (5 nM), mais une optimisation de l'affinité de l'anticorps pourrait augmenter l'efficacité de l'AcM et diminuer les doses utilisées. Seule l'inhibition de la croissance a été testée et le mécanisme induisant la mort cellulaire n'a pas été identifié. Il aurait peut être été nécessaire de tester l'apoptose par cytométrie en flux et/ou d'évaluer l'induction de la cascade pro-apoptotique par western blot afin de vérifier si la mort cellulaire observée est bien due à l'apoptose. Il semblerait également intéressant d'évaluer si cette forte concentration n'entraîne pas de toxicité sur d'autres cellules [Feng et al., 2010].

- TR1-mAbs

Les derniers travaux impliquant des anticorps anti-DR4 ont été effectués par une collaboration japonaise et chinoise. Ces chercheurs ont tout d'abord développé plusieurs anti-DR4 humains en utilisant des souris TC (TransChromo) génétiquement modifiées exprimant l'intégralité des gènes des immunoglobulines humaines. En utilisant la technologie de single cell (ISAAC), ils ont testé 9 anticorps dirigés contre DR4 sur un panel de cellules cancéreuses [Lin et al., 2010]. Deux d'entre eux ont démontré des propriétés intéressantes en combinaison avec TRAIL. TR1-419 semble potentialiser TRAIL alors que TR1-422 semble inhiber son action [Hao et al., 2016]. Cependant, les effets sont relativement faibles. La combinaison de TR1-419 et TRAIL ne permet d'abaisser la viabilité cellulaire que de 20% maximum comparée au TRAIL seul et aucun anticorps ne semble avoir d'effet agoniste seul. De plus, ces effets n'ont été caractérisés que par viabilité cel-

lulaire et l'analyse de la cascade apoptotique n'a été effectuée que sur les cellules HeLa.

Ces anticorps ont ensuite été convertis en IgM. Sur les cellules de cancer colorectal Colo205, les formes IgG utilisées seules n'induisent que faiblement l'apoptose, alors que les formes IgM présentent un fort potentiel apoptotique *in-vitro* et *in-vivo* [Piao et al., 2016] [Guo et al., 2017]. Il est intéressant de noter ici que les deux anticorps TR1-419 et TR1-422 sous forme IgM sont capables d'induire l'apoptose avec ou sans TRAIL. La valence de l'IgM, et donc son avidité supérieure par rapport à l'IgG pourrait réticuler plus de récepteurs et serait sûrement responsable de cette activité supérieure.

3.2.2 Anti-DR5

Contrairement à DR4, un nombre plus conséquent d'anticorps monoclonaux contre DR5 ont été générés et évalués dans des essais cliniques. Seuls ou en association, Conatumumab, Drozitumumab et Tigatuzumab sont passés à des essais cliniques de phase II, alors que Lexatumumab, DS-873a et LBY-135 n'ont pas dépassé la phase I (voir tables 3.2 et 3.3). Cependant, la majorité des anticorps anti-DR5 développés nécessite une réticulation secondaire pour être actifs. Dans les modèles de xéno greffes, cette fonction de réticulation est assurée par la liaison aux Fc γ R [Li and Ravetch, 2013] [Wajant, 2015].

Lexatumumab (HGS-ETR2)

Lexatumumab, également connu sous le nom de HGS-ETR2, est l'homologue du Mapatumumab mais dirigé contre DR5. Également développé par Human Genome Science (HGS) en 2005 en utilisant la méthode du phage display, cet anticorps DR5-agoniste est entièrement humain. D'abord testé sur un ensemble de cellules primaires de carcinome rénal, il reconnaît efficacement DR5 [Zeng et al., 2006]. *In-vitro*, cet anticorps est capable d'induire la mort cellulaire et l'apoptose. Cependant, la réticulation de HGS-ETR2, par un anticorps secondaire reconnaissant la partie Fc des IgG humaines, est nécessaire pour augmenter considérablement son effet pro-apoptotique. Testé sur des xéno greffes, cet anticorps semble capable de supprimer la croissance tumorale *in-vivo* lorsqu'il est réticulé, et utilisé seul, il semble ralentir la pousse tumorale. Cependant les volumes tumoraux des souris non traitées présentés dans cette étude ne sont pas très élevés. Il serait donc intéressant de regarder l'effet sur la pousse tumorale sur un temps plus long. HGS-ETR2 a ensuite été étudié dans de nombreux essais pré-cliniques, seul ou en combinaison avec des agents anticancéreux ou de la radiothérapie [Shimada et al., 2007] [Belyanskaya et al., 2007] [Engesaeter et al., 2012] [Luster et al., 2009] [Wu and Kakehi, 2009] [Marini et al., 2006]. Les réponses plutôt encourageantes suggèrent une induction de l'apoptose des cellules cancéreuses de manière dépendante de la concentration et du temps. De plus, la synergie avec les différents agents thérapeutiques permet de valider l'utilisation de Lexatumumab en combinaison. Malgré l'intérêt de cet anticorps, il y a eu peu d'essais cliniques. Lexatumumab n'a été testé que sur des lymphomes, des tumeurs solides pédiatriques ou avancées,

TABLE 3.2 – Essais cliniques des anticorps anti-DR5.

Lexatumumab	Phase Clinique	Indication	Réponses	Références
Seul				
	Ia	Tumeurs solides avancées et lymphomes	Bien toléré à 10 mg/kg	[Plummer et al., 2007] [Wakelee et al., 2010]
	I	Tumeurs solides pédiatriques	NC	NCT00428272 [Merchant et al., 2012]
Combinaisons				
Gemcitabine, pemetrexed, doxorubicin ou FOLFIRI	Ib	Tumeurs solides avancées	Réponses partielles	[Sikic et al., 2007]
IFN γ	I	Tumeurs solides pédiatriques réfractaires	NC	NCT01445093
Conatumumab	Phase Clinique	Indication	Réponses	Références
Seul				
	I/Ia	Tumeurs solides avancées	Bien toléré à 20 mg/kg	[Herbst et al., 2010] [LoRusso, 2007]
Combinaisons				
Ganitumab (479)	I	Tumeurs solides avancées ou réfractaires	Bien toléré à 15 mg/kg	NCT00819169 [Chawla et al., 2010]
Doxorubicin	II	Sarcomes de tissus mous non résécables	Avantage	NCT00626704 [Demetri et al., 2012]
FOLFOX & Beva	Ib/2	CCRm	NC	NCT00625651
FLOFIRI \pm 479	II	seconde ligne de CCRm	Avantage	[Cohn et al., 2012]
Gemcitabine \pm 479	II	CPm	Bien toléré à 10 mg/kg	NCT00630552 [Kindler et al., 2010]
Carboplatine & paclitaxel	Ib/2	CPNPC	NC	NCT00534027
Panitumumab	Ib/2	CCRm	NC	NCT00630786
Bortezomib ou vorinostat	Ib	Lymphomes réfractaires ou récidivants	NC	NCT00791011
Drozitumab	Phase clinique	Indication	Réponses	Références
Seul				
	Ia	Tumeurs solides avancées ou réfractaires	Toléré à 20 mg/kg	[Camidge, 2008]
	II	CPNPC avancé chondrosarcomes avancés	Pas d'avantage	NCT00480831 NCT00543712
Combinaisons				
Rituximab	II	LNH récidivants	Pas d'avantage	NCT00517049 [Wittebol et al.,]
Carboplatin, paclitaxel \pm Beva	II	1ère ligne de CCRm	Bien toléré à 15 mg/kg	[Karapetis CS, 2010]
Cetux & irinotecan ou FLOFIRI \pm Beva	Ib	1ère ligne de CCRm	Bien toléré à 15 mg/kg	NCT00497497 [Baron et al., 2011]
FOLFOX \pm Beva	Ib	1ère ligne de CCRm	Pas d'avantage	NCT00851136

TABLE 3.3 – Essais cliniques des anticorps anti-DR5 suite

DS-8273a	Phase Clinique	Indication	Réponses	Références
Seul				
	I	Tumeurs solides avancées & Lymphomes	Bien toléré à 24 mg/kg	[Forero et al., 2017] NCT02076451
Combinaisons				
Nivolumab	I	Cancer colorectal avancé Mélanome au stade IV	NC	NCT02991196 NCT02983006
LBY-135	Phase Clinique	Indication	Réponses	Références
Seul				
	I	Tumeurs solides avancées	Bien toléré à 20 mg/kg	[Sharma et al., 2014]
Combinaisons				
Capecitabine	I	Tumeurs solides avancées	Toléré à 20 mg/kg	[Sharma et al., 2014]
Tigatuzumab	Phase clinique	Indication	Réponses	Références
Seul				
	I	Tumeurs solides avancées ou réfractaires & Lymphome	Toléré à 8 mg/kg	NCT00320827 [Forero-Torres et al., 2010]
Combinaisons				
Carboplatin & paclitaxel	II	CPNPCm ou non résécable	Pas d'avantage	NCT00991796 [Reck et al., 2013]
	II	COm ou localement avancé	NC	NCT00945191
Gemcitabine	II	CPm ou non résécable	Contribution possible	[Forero-Torres et al., 2013]
Irinotecan	II	CCRm	Pas d'avantage	NCT00969033
FOLFIRI	I	Patients dont les autres TTT ont échoués	NC	NCT01124630
Sorafetinib	II	Cancer du foie avancé	Pas d'avantage	[Cheng et al., 2015]
Abraxane (paclitaxel)	II	Cancer du sein triple négatif métastatique	Pas d'avantage	NCT01307891 [Paoletti et al., 2015]

CCRm : cancer colorectal métastatique, CPm : cancer pulmonaire métastatique, CPNPC : cancer pulmonaire non à petites cellules, CPNPCm : CNPCN métastatique, LNH : lymphomes non hogkiniens, COm : cancer ovarien métastatique, TTT : traitements, NC : non communiqué

et peu de combinaisons ont été évaluées. Tous les traitements sont bien tolérés et la durée de demie-vie varie de 2 à 18 jours. Toutefois, cet anticorps ne semble pas capable d'induire les fonctions ADCC et CDC sur les lymphomes et il n'a démontré que de faibles avantages thérapeutiques.

Conatumumab (AMG655)

AMG655 a été développé par Amgen et Takeda Bio à partir d'immunisation protéique de souris transgéniques exprimant les gènes codant les Ig humaines. Cet anticorps agoniste, entièrement humain, se lie spécifiquement au domaine extracellulaire de DR5. *In-vitro* et *in-vivo*, il a démontré une capacité à induire l'apoptose des cellules de cancers pulmonaires, pancréatique et du colon, mais uniquement lorsqu'il est réticulé [Kaplan-Lefko et al., 2010]. Les études pré-cliniques démontrent également que Conatumumab augmente légèrement le potentiel des chimiothérapies comme 5-FU, l'irinotecan ou gemcitabine [Kaplan-Lefko et al., 2010]. Les résultats de l'essai clinique de phase I indiquent que Conatumumab est bien toléré chez les patients, seul ou en combinaison, et que sa demie-vie est de l'ordre de 16 jours [Herbst et al., 2010] [Doi et al., 2011]. Cependant, bien que cet anticorps ait été testé jusqu'en phase II, les études combinées ont montré quelques divergences dans les effets induits par Conatumumab. Quelques réponses cliniques ont été observées en association avec l'anti-IGFR1 Ganitumumab ou gemcitabine, mais l'inverse est observé avec la doxorubicine. Conatumumab a été arrêté à ce stade. Toutefois, des études pré-cliniques plus récentes ont démontré une synergie de TRAIL et de cet anti-DR5. Le co-traitement augmente l'activité anti-tumorale et sensibilise les cellules initialement résistantes à TRAIL *in-vitro* et *in-vivo* [Graves et al., 2014] [Tuthill et al., 2015]. Ces résultats sont très intéressants et ouvrent de nouvelles possibilités pour le développement d'agents thérapeutiques ciblant TRAIL et ses récepteurs.

Drozitumab (Apomab ou PRO955780)

Drozitumumab a été développé par Genentech en utilisant la méthode du phage display. Les clones ont été criblés sur les cellules Colo205. Les clones sélectionnés ont été ensuite convertis en IgG entièrement humaines. Le clone qui présentait l'activité la plus intéressante, à savoir Apomab, a été sélectionné et son affinité a été optimisée en utilisant la mutagenèse dirigée [Adams et al., 2008]. L'étude sur la liaison entre Apomab et DR5 a démontré que cet anticorps se fixait, comme TRAIL, sur les régions CRD2 et CRD3 de DR5 et qu'il induit un regroupement des DR5 à la surface cellulaire [Adams et al., 2008]. Apomab a un effet sur les cellules de cancers colorectal, pancréatique, mammaire et sur les rhabdomyosarcomes mais il nécessite également une réticulation supplémentaire à l'aide d'un anticorps secondaire anti-Fc humain [Eng et al., 2016] [Kang et al., 2011] [Wilson et al., 2011] [Zinonos et al., 2009]. Dans les essais cliniques, il est le seul anti-DR5 suspecté d'induire une petite cytotoxicité hépatique dans la phase I. Cependant il

est globalement bien toléré et présente des effets antitumoraux intéressants contre les tumeurs solides avancées. Sa demie-vie est de 7 à 21 jours. Il fait partie des anti-DR5 testés au cours d'essai clinique de phase II, malheureusement aucune réponse objective n'a été attribuée à l'administration de Drozitumumab chez l'homme.

Tigatuzumab (CS-1008 ou TRA-8)

Tigatuzumab a été produit par Daiichi-Sankyo à partir de l'anticorps murin TRA-8. Cet anticorps a été généré par immunisation de souris Balb/c classique en utilisant une protéine de fusion exprimant la partie extracellulaire de DR5 et la partie Fc d'une IgG1 humaine (DR5-Ig). TRA-8 induit l'apoptose de cellules tumorales de gliome et d'astrocytome *in-vitro* et présente une activité tumoricide *in-vivo* sans nécessiter de réticulation [Ichikawa et al., 2001]. Son activité peut être augmentée par radiation ou par l'ajout d'agents chimiothérapeutiques [Buchsbaum et al., 2003] [DeRosier et al., 2007]. Les CDRs murins de TRA-8 ont ensuite été greffés sur un anticorps humain, pour obtenir Tigatuzumab, la version humanisée de TRA-8. Tigatuzumab a été testé chez l'homme pour les lymphomes récidivants ou des tumeurs solides. Il a été bien toléré et sa demie-vie est estimée entre 8 et 16 jours. Cet anticorps a été testé en phase II combiné à de nombreux agents (table 3.3). Toutefois, l'ensemble des résultats cliniques n'a pas démontré d'amélioration due au Tigatuzumab.

LBY135

LBY135, développé par Novartis, est l'unique anticorps chimérique murin-humain anti-DR5. Cet anticorps ne présente pas de toxicité envers les cellules normales. Il est actif sur les leucémies chroniques (LLC) et sur un spectre plus large de cellules tumorales [Natoni et al., 2007] [Sharma et al., 2014]. Cependant, cet anticorps nécessite une réticulation secondaire pour être efficace [Natoni et al., 2007]. Il démontre une synergie en combinaison avec des chimiothérapies telles que doxorubicine, 5-FU, irinotécan et paclitaxel. Il a été testé au cours d'un essai clinique de phase I seul ou en combinaison avec du capecitabine. Il présente une demie-vie d'environ 10 jours, et malgré des profils non toxiques et une tolérance favorable dans les tumeurs solides avancées, une activité clinique limitée a été observée dans cette étude [Sharma et al., 2014].

DS-8273a

Développé par Daiichi-Sankyo, DS-8273a est anticorps entièrement humanisé. Il se lie plus fortement au domaine extracellulaire de DR5 que son homologue CS-1008, et démontre dans les essais pré-cliniques une activité pro-apoptotique intéressante [Burvenich et al., 2016]. Fait marquant, la première publication décrivant cet anticorps démontre que DS-8273a pourrait être utile pour éradiquer les cellules suppressives déri-

vées de myéloïdes chez les patients atteints de cancer avancé, indiquant que DS-8273a pourrait indirectement contribuer à des thérapies antitumorales [Dominguez et al., 2017]. Cet anticorps a été testé en essai clinique de phase I [Forero et al., 2017] où sa demie-vie a été déterminée entre 9 et 13 jours. En dépit du fait qu’aucune réponse objective n’a été observée dans cette étude, trois autres essais cliniques sont en cours, visant à évaluer son innocuité chez les patients atteints de tumeurs solides avancées et de lymphomes, et ses bénéfices associés au Nivolumab chez les patients atteints de cancer colorectal avancé et du mélanome II et IV.

GEN1029

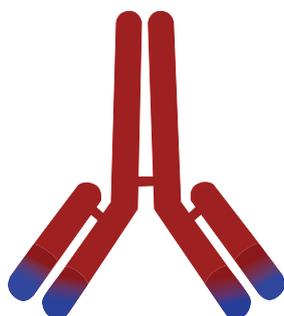
Récemment, Genmab a développé une construction particulière d’anticorps : un hexaBody-DR5/DR5. Cet hexaBody est composé de deux anticorps anti-DR5 non compétitifs, ayant reçu la mutation E430G dans leur domaine Fc respectif. Cette mutation E430G leur apporte la capacité à former des hexamères [van der Horst et al., 2017]. Très peu d’information sur GEN1029 sont disponibles. La seule communication est un abstract présentant GEN1029 comme un anti-DR5 capable de détruire les cellules tumorales indépendamment de la réticulation à médiation par le $Fc\gamma R$ [van der Horst et al., 2017]. Le potentiel thérapeutique de ce composé a été testé sur les myélomes multiples, et il semble démontrer des effets cytotoxiques, à la différence de leurs homologues non mutés. Début mai 2018, un essai clinique de phase I/II a débuté (NCT03576131) sur des patients atteints de tumeurs solides. Les résultats sur la toxicité de ce nouveau composé prometteur sont attendus pour 2022.

Anticorps anti-DR5 en recherche

La recherche sur les anticorps ciblant DR5 continue, et d’autres anti-DR5 sont développés et testés en pré-clinique.

- LaDR5

LaDR5 est un anticorps développé *in silico* en modélisant des structures 3D du domaine supposé fonctionnel de DR5. Des souris immunisées par DR5 ont permis d’obtenir LaDR5 puis la structure du Fv de LaDR5 a été simulée par la méthode d’assemblage moléculaire ou *molecular docking method*. Trois mutants du site de liaison prédictif ont ainsi été construits pour étudier la liaison de LaDR5 avec DR5. LaDR5 a démontré une liaison proche du ligand TRAIL puisqu’il entre en compétition avec ce dernier. LaDR5 peut induire une cytotoxicité sur les Jurkat mais pas sur les cellules Daudi, bien qu’elles présentent une quantité suffisante de DR5 à leur surface. Dans les cellules Daudi, une mutation sur la protéine pro-apoptotique Bax la rend non-fonctionnelle. Ceci pourrait expliquer la résistance de cette lignée [Meijerink et al., 1998]. Sur les Jurkat, le traitement de LaDR5 a permis la formation d’un DISC fonctionnel, sans réticulation secondaire. Les trois mutants



Igs en Recherche

KMTR2

Motoki et al Clin Cancer Res 2005
Tamada et al Sci Rep 2015

LaDR5

Qiao et al BMC Immunol 2012

TR2-3

Lei et al Int J Mol Sciences 2017

WD1

Wang J et al Cell Mol Immunol 2008

Zaptuximab/ HMCAZ5 /AD5.10

Guo et al JBC 2005
Li et al Mol Ther 2012
Qiu et al IUBMB Life 2012

Zaptuzumab (AD5.10)

Chen et al IUBMB Life 2017

Igs en Clinique

Conatumumab (AMG655)

Herbst et al Clin Can Res 2010
Kaplan-Lefko et al Can Biol Ther 2010

Drozitumab (Apomab or PR095780)

Adams et al Cell Death Differ 2008
Camidge et al Clin Can Res 2010
Kang et al Clin Can Res 2011

DS-8273a

Bruvenich et al Theranostics 2016
Forero et al Invest New Drugs 2017
Dominguez et al. Clin Can Res 2017

LBY135

Sharma et al Inv New Drugs 2014

Lexatumumab (HGS-ETR2)

Belyanskaya et al Mol Can 2007

Tigatuzumab (CS-1008 or TRA-8)

Ichikawa et al Nat Med 2001
Forero-Torres et al Can Bioth
Radiopharm 2010

GEN1029

Van der Horst et al Blood 2017

FIGURE 3.3 – Représentation schématique des anticorps anti-DR5. KMTR2, LaDR5, LBY135, mDRA6, TR2-3, WD1 et Zaptuximab/Zaptuzumab sont les anticorps testés dans des études pré-cliniques. Conatumumab, Drozitumab, DS-8273a, KTRM2, Lexatumumab et Tigatuzumab sont les anticorps testés en clinique.

ont permis de déterminer que les résidus 59/62/67/68 (DR5M2) semblaient importants dans la liaison au DR5 [Qiao et al., 2012].

- WD1

WD1 a été développé par immunisation protéique de DR5 soluble. WD1 se lie au DR5 recombinant et au DR5 à la surface des cellules de Jurkat et de Molt-4 mais ne se lie pas au DR4. Ces cellules sont sensibles au traitement par WD1, de manière dose-dépendante, sans réticulation secondaire [Wang et al., 2008]. Cet anticorps est donc un bon candidat pour le développement d'un anticorps anti-DR5 en thérapie anticancéreuse, mais aucun essai utilisant cet anticorps n'a encore été publié.

- AD5-10 / Zaptuximab / Zaptuzumab

AD5-10 est un anticorps murin ciblant DR5 généré à partir d'immunisation protéique

de souris Balb/c. AD5-10 est capable d'induire une cytotoxicité ainsi que la cascade des caspases des cellules cancéreuses Jurkat, SMMC-7721, MDA-MB-231, U251 et HCT-116, en l'absence de réticulation secondaire. A la différence de TRA-8, AD5-10 n'entre pas en compétition avec la liaison du ligand TRAIL. Ici, AD5-10 est capable de potentialiser l'effet du ligand TRAIL. De manière étonnante, l'anticorps est capable de tuer les cellules de Jurkat, même en présence de l'inhibiteur de pan-caspases Z-VAD. Cet anticorps utilise donc **un mécanisme de mort cellulaire distinct de l'apoptose** [Guo et al., 2005]. Zaptuximab ou HMCAZ5 est la version chimérique de l'anticorps AD5-10 et Zaptuzumab en est la version humanisée. Zaptuximab est aussi affin que son homologue murin parental et présente une toxicité envers diverses cellules tumorales, mais pas envers les hépatocytes normaux. *In-vivo*, l'anticorps seul est capable de réduire la progression tumorale des tumeurs colorectales et hépatocellulaires humaines. Il faut toutefois noter qu'il faut parfois attendre que les volumes tumoraux soient vraiment importants (au-delà de 1500mm³) pour observer un effet. Toutefois, Zaptuximab est capable d'induire une activité ADCC et CDC et la combinaison avec l'épirubicine permet d'augmenter l'expression de DR5, il y a donc une synergie des deux traitements *in-vitro* et *in-vivo* [Qiu et al., 2012] [Li et al., 2012]. La version humanisée du Zaptuximab conserve à peu près les mêmes effets, même si ici l'activité anti-tumorale testée après des xénogreffes de NCI-H460 est très faible, avec une concentration d'anticorps très forte (entre 40 et 80 mg/kg) et des volumes tumoraux trop importants [Chen et al., 2017]. Il est démontré ici que l'autre mécanisme de mort serait très probablement induit par autophagie.

- KMTR2

KMTR2 est un IgG4, agoniste de DR5 totalement humain. Il a été généré par immunisation de souris génétiquement modifiées. Il induit très efficacement la mort cellulaire de toute une batterie de lignées cellulaires, sans nécessiter de réticulation secondaire, avec une concentration de l'ordre du nanogramme alors que la majorité des anticorps agit à des concentrations de l'ordre du microgramme [Motoki et al., 2005] [Tamada et al., 2015]. Dans les premières études, KMTR2 a été décrit comme étant capable de supprimer la croissance de xénogreffes de gliome sous-cutanées, et de prolonger la durée de vie des animaux portant des xénogreffes intracérébrales [Nagane et al., 2010]. Plus récemment, la structure cristallographique du domaine extracellulaire de DR5 et d'un domaine Fab (fragment-binding d'antigène) dérivé de KMTR2, a démontré que KMTR2 est capable d'induire une super-oligomérisation de DR5. C'est la première démonstration de la capacité des anticorps à former de telles structures. Ce réseau de plus de 20 molécules d'anticorps et de DR5 permet une multimérisation très forte des récepteurs, et donc un regroupement plus efficace des domaines de mort intracellulaires. Ceci permet sans doute de former un DISC très puissant, d'où l'activité de l'anticorps à faible dose [Tamada et al., 2015]. Cet anticorps est donc un candidat très intéressant pour le développement d'agents anti-DR5 anticancéreux.

- TR2-3

Enfin, TR2-3, un scFv-DR5 est un outil très prometteur. La forme scFv, développée par phage display, est capable d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses Colo205 et MDA-MB-231 sans ajout d'un agent réticulant. *In-vivo*, ce scFv-DR5 est capable de ralentir la pousse tumorale des Colo205 [Lei et al., 2017]. La combinaison avec le cisplatine permet d'augmenter l'effet pro-apoptotique de TR2-3. Cet agent pourrait donc également être utilisé en combinaison avec des chimiothérapies [Lei et al., 2018]. L'affinité de ce composé n'est pas très forte ($KD = 126$ nM), mais il est prévu que ce scFv-DR5 soit non seulement transformé en une forme IgG totale, mais également que l'affinité envers DR5 soit optimisée. TR2-3 représente ainsi un candidat potentiel si les effets anti-tumoraux sur la forme IgG totale sont confirmés.

3.2.3 Limites

Malgré des résultats précliniques encourageants, les résultats de ces essais cliniques ont été décevants. La plupart de ces anticorps semblent relativement sûrs et bien tolérés par les patients, mais aucun ne présente d'avantages cliniques suffisants. Au mieux, ces AcMs induisent une stabilisation, mais aucun d'entre eux n'améliore les taux de réponse, qu'ils soient utilisés seuls ou combinés. Par conséquent, et à l'exception de DS-8273a et de GEN1029, les sociétés ont abandonné leur développement [Fulda, 2015] [Ashkenazi, 2015] [Holland, 2014]. Une des raisons du manque d'efficacité clinique de ces AcMs peut être la résistance inhérente des tumeurs primaires à l'apoptose. Après liaison à ses cibles, les AcMs initient la formation du DISC TRAIL, mais la transduction efficace du signal de l'apoptose peut être inhibée très tôt, au niveau de DISC par c-FLIP, ou plus en aval, au niveau mitochondrial par les membres de la famille Bcl-2 (cIAP1 / cIAP2) et XIAP. Le contournement de ces points de contrôle inhibiteurs a été rendu possible dans un certain nombre de modèles précliniques en utilisant les chimiothérapies conventionnelles. Ces dernières peuvent rétablir la sensibilité des cellules tumorales des agonistes ciblant DR4 ou DR5, en agissant sur les inhibiteurs intracellulaires ou en augmentant l'expression membranaire de DR4 et/ou DR5 [Wang, 2008]. Malheureusement, aucune des combinaisons testées jusqu'à présent n'a montré d'avantages cliniques. Il convient de noter ici que le mode d'administration des traitements combinés dans ces essais cliniques précoces a pu également contribuer au manque d'efficacité de TRAIL ou des agonistes anti-DR4 et anti-DR5. Ces composés sont souvent administrés au patient simultanément ou à de courts intervalles, alors que dans les modèles précliniques, le médicament chimiothérapeutique correspondant est connu pour restaurer efficacement la mort cellulaire induite par TRAIL, mais doit être donné 24 à 72 h avant l'administration de TRAIL.

Une autre explication du manque d'efficacité de ces anticorps, et probablement la raison principale, pourrait être leur plus faible capacité à déclencher l'apoptose. La multimerisation des récepteurs agonistes de TRAIL est obligatoire pour transduire le si-

gnal apoptotique. Contrairement à TRAIL, dont la capacité à trimériser les récepteurs agonistes à la surface cellulaire est naturellement conférée par son association spontanée en tant que trimère, les AcMs sont bivalents. Cette valence limitée pourrait, au moins en partie, expliquer pourquoi ces anticorps monospécifiques n'ont pas démontré les effets cliniques escomptés. Comme discuté ci-dessus, l'obtention d'une agrégation efficace de DR4 ou DR5 est probablement l'élément principal à prendre en compte lors du développement d'anticorps ou de dérivés ciblant TRAIL pour le traitement du cancer. Parmi les anticorps monoclonaux anti-DR4 et DR5 décrits jusqu'à présent, plusieurs sont incapables d'induire la destruction des cellules tumorales en absence de réticulation [Watanabe et al., 1998] [Griffith et al., 1999a]. Les anticorps agonistes de DR5 sont, pour la plupart, incapables de déclencher l'apoptose seuls. Cependant, ils présentent une activité antitumorale *in-vivo*, sûrement due à des cellules exprimant Fc γ R qui induisent leur réticulation [Bruhns et al., 2009] [Chuntharapai et al., 2001]. Il a été démontré que le potentiel antitumoral *in-vivo* de Conatumumab nécessite une réticulation médiée par les Fc γ R pour inhiber la croissance tumorale [Li and Ravetch, 2013] [Cheng et al., 2016]. Fc γ R oligomérisent les anticorps qui sont alors capables de trimériser les récepteurs, fournissant une activité antitumorale plus efficace. Par conséquent, la liaison de Fc γ R doit être obligatoire pour induire une apoptose efficace. Néanmoins, des études supplémentaires et les nouveaux développements d'anticorps DR5 mettent en avant le fait que l'apoptose peut être réalisée sans cette liaison Fc γ R. Certains anticorps ont été décrits pour induire l'apoptose très efficacement en l'absence de réticulation. Par exemple, les anticorps DR4 convertis en IgM présentent une induction de l'apoptose nettement améliorée [Piao et al., 2016]. Le développement du nouvel anti-DR5 Zaptuzumab a montré des actions anticancéreuses prometteuses sans nécessiter de réticulation [Chen et al., 2017]. L'anticorps anti-DR5 KMTR2, quant à lui, induit une super-oligomérisation de DR5 menant à des résultats remarquables. C'est également le cas pour les formats scFv-DR5 et scFv-TRAIL qui, sans partie Fc donc sans la capacité de se lier à Fc γ R, ont montré des résultats prometteurs [Gieffers et al., 2013] [Lei et al., 2017]. Tout ceci pourrait indiquer qu'une augmentation de la valence des AcMs ou que le pouvoir de regroupement des récepteurs peuvent être des prérequis pour induire une agrégation et une apoptose suffisantes [Wajant, 2015]. Il est toutefois important de noter que, jusqu'à présent, aucune de ces options thérapeutiques n'a été évaluée en clinique. Indépendamment du fait que l'engagement de Fc γ R soit nécessaire ou non pour induire une mort cellulaire programmée appropriée, il faut probablement garder à l'esprit que seul un co-engagement avec Fc γ RIIB confère aux anticorps agonistes anti-TNFR le potentiel de déclencher l'apoptose *in-vivo* [Li and Ravetch, 2013].

Il ne fait cependant aucun doute que des versions améliorées voient le jour en clinique. C'est la raison pour laquelle des sociétés comme Genmab ont racheté la licence de l'hexabody DR5/DR5.

DR4 et DR5 restent toujours des cibles attrayantes pour la thérapie du cancer, des efforts considérables sont encore mis en œuvre, incluant le développement d'une grande variété de dérivés d'agonistes de DR4 et DR5.

3.3 Nouveaux variants dérivants de TRAIL ou d'anticorps anti-DR4 et anti-DR5

Les anticorps conventionnels sont composés de deux parties : deux Fab (fragment fixant l'antigène) liés à un Fc (fragment cristallisé). Les Fab contiennent des régions hautement spécifiques de l'épitope, tandis que le Fc détermine la classe d'immunoglobuline, et donc le potentiel d'anticorps pour la réponse immunitaire à médiation cellulaire. L'essor du génie génétique et notre compréhension croissante des exigences de transduction des signaux pro-apoptotiques de TRAIL offrent des possibilités sans précédent de développer de nouveaux dérivés prometteurs associés à TRAIL avec un potentiel antitumoral accru [Hendriks et al., 2017].

3.3.1 Dérivés multivalents

Bien que les anticorps évalués dans des essais cliniques aient été décrits pour induire la mort cellulaire dans des modèles précliniques, indépendamment de leur réticulation, leur manque d'efficacité clinique est très probablement due à leur plus faible capacité à induire l'agrégation des récepteurs. En accord avec cette hypothèse, il a été démontré que l'anticorps tétravalent dérivé de sc-Fv :DR5 présente des activités antitumorales supérieures à celles des anticorps dans les études précliniques. La traduction de l'anti-DR4 ou de l'anti-DR5 multivalent en clinique reste incertaine jusqu'à présent car il a récemment été constaté dans un essai clinique de phase I visant à évaluer sa sécurité et tolérabilité que le nanobody scFv :DR5, TAS266, seul, présentait une hépatotoxicité [Papadopoulos et al., 2015]. Il convient de noter, cependant, que DR4 et DR5 présentent des exigences de réticulation distinctes (cf figure 1.9). DR5 est cependant capable d'induire l'apoptose lorsqu'il est activé par TRAIL membranaire, ou par un dérivé de TRAIL fusionné à un scFv [Wajant et al., 2001]. Cette stratégie, qui permet l'immobilisation dépendante de l'antigène de TRAIL à la surface cellulaire, a été largement explorée avec un grand panel de scFv.

3.3.2 Dérivés bi- et tri-spécifiques

Sur la base de leur capacité à reconnaître des cibles spécifiques avec une sensibilité élevée, des fragments scFv et des anticorps bi-spécifiques ont été développés et combinés à une variété de dérivés TRAIL pour induire une destruction spécifique des cellules can-

céreuses. Produites par des phages, des levures et des ribosomes, les scFv ne contiennent que les régions variables des anticorps qui reconnaissent la cible, sans la partie constante.

scFv-TRAIL

Différentes formulations de scFv-TRAIL ont été développées, chacune ayant ses propres avantages [de Miguel et al., 2016] [Naoum et al., 2017]. La plupart du temps, l'apoptose induite par TRAIL n'est possible que dans les cellules portant des antigènes ciblés par le scFv. Mais les cellules non tumorales peuvent également être ciblées pour présenter TRAIL comme une protéine liée à la membrane, pour augmenter son efficacité de destruction. Deux types de scFv-TRAIL ont été conçus (figure 3.4).

scFv-TRAIL et dérivés bispécifiques

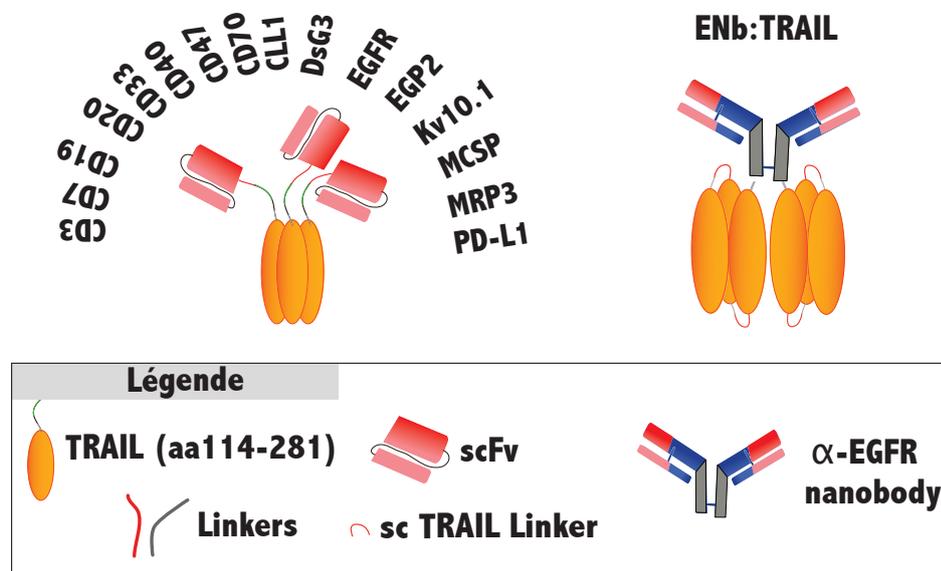


FIGURE 3.4 – Représentation schématique des scFv-TRAIL et dérivés bispécifiques. Ciblage de TRAIL sur différents cancers via les scFv reconnaissant des protéines présentes à la surface des cellules tumorales. Les dérivés bi-spécifiques Enb :TRAIL cible le récepteur EGFR.

Le premier type comprend des antigènes de ciblage scFv exprimés spécifiquement ou surexprimés par des cellules cancéreuses. La construction dimérique scFv :EGFR-TRAIL est un exemple emblématique d'une telle construction. L'EGFR est un récepteur tyrosine kinase (TKR) dont l'expression dans les tumeurs solides est souvent associée au développement et à la progression tumorale [Ettinger, 2006]. scFv :EGFR-TRAIL a transformé TRAIL soluble en une forme liée à la membrane, permettant une apoptose efficace dans une série de lignées cellulaires tumorales exprimant DR4-DR5 et EGFR [Bremer et al., 2005]. Sur la base du même principe, des constructions telles que ENb :TRAIL, un autre nanobody ciblant l'EGFR fusionné à la molécule TRAIL, présente

une activité antitumorale puissante vis-à-vis des cellules normalement résistantes aux inhibiteurs de l'EGFR seul ou au TRAIL. *In-vitro* et *in-vivo*, ENb :TRAIL a pu bloquer la signalisation de l'EGFR tout en induisant l'apoptose médiée par TRAIL des cellules cancéreuses ciblées [Zhu et al., 2017]. Fait intéressant, la fusion du scFv anti-EGFR à du TRAIL monocaténaire (scTRAIL), au lieu d'un seul monomère de TRAIL, a encore multiplié par 10 l'efficacité de destruction tumorale de la variante scFv-TRAIL, soulignant l'importance de la valence TRAIL pour son efficacité [Hutt et al., 2017]. Dans le même esprit, un anticorps anti-EGFR lié au scTRAIL s'est avéré présenter un fort potentiel antitumoral à la fois *in-vitro* et *in-vivo* [Siegemund et al., 2016].

Le second type de scFv ou de protéines recombinantes TRAIL cible des antigènes de cellules immunitaires. Ces constructions ont été générées dans le but d'accélérer et de renforcer les réponses immunitaires de deux manières différentes. La première approche vise à activer les cellules immunitaires alors que la deuxième bloque les signaux inhibiteurs. Ces protéines de fusion bifonctionnelles confèrent une double capacité de signalisation pro-apoptotique en amenant les cellules immunitaires à proximité immédiate des cellules tumorales. A titre d'exemple, scFv-CD40-TRAIL a la double capacité de stimuler les cellules dendritiques (DC) et de déclencher l'apoptose des cellules ciblées par les CD [El-Mesery et al., 2013]. De même, un exemple clé particulièrement intéressant de dérivés inhibiteurs est scFv-PD-L1 : TRAIL. Ce scFv bispécifique arme ou charge les cellules myéloïdes (DC et macrophages) exprimant PD-L1 avec la molécule TRAIL. Grâce à la liaison compétitive à PD-L1, il inhibe, d'une part, l'interaction PD-1 / PD-L1, restituant ainsi l'immunité antitumorale, et puisqu'il charge les cellules immunitaires avec le TRAIL recombinant, il permet d'autre part l'apoptose médiée par TRAIL des cellules tumorales ciblées [Hendriks et al., 2016].

Anticorps bispécifiques et non-conventionnels

Des dérivés d'anticorps non conventionnels ou des anticorps bispécifiques ciblant à la fois DR4 et DR5, ou DR5 et un antigène spécifiquement exprimé par une cellule tumorale ou dans son microenvironnement, ont été générés et évalués pour leur capacité à déclencher la destruction sélective des tumeurs. Ils ont principalement été produits à partir de la technologie d'affichage par phages. Plusieurs dérivés d'anticorps bispécifiques DR4-DR5 ont été décrits (figure 3.5).

En utilisant la technologie d'affichage des phages, MedImmune a développé de nombreuses constructions scFv sélectives pour DR4 et / ou DR5 [Dobson et al., 2009]. Sur le criblage publié, 10 scFv anti-DR4 et 6 scFv anti-DR5 ont été sélectionnés. Chacun d'entre eux présente une spécificité vis-à-vis de sa propre cible, mais ces scFv ne présentent que de faibles propriétés anticancéreuses *in vitro*, et ce, en présence de cycloheximide. De manière frappante, bien que DR4 et DR5 montrent une homologie de séquence élevée, et malgré le fait que les principaux acides aminés homologues sont accessibles comme immunogène,

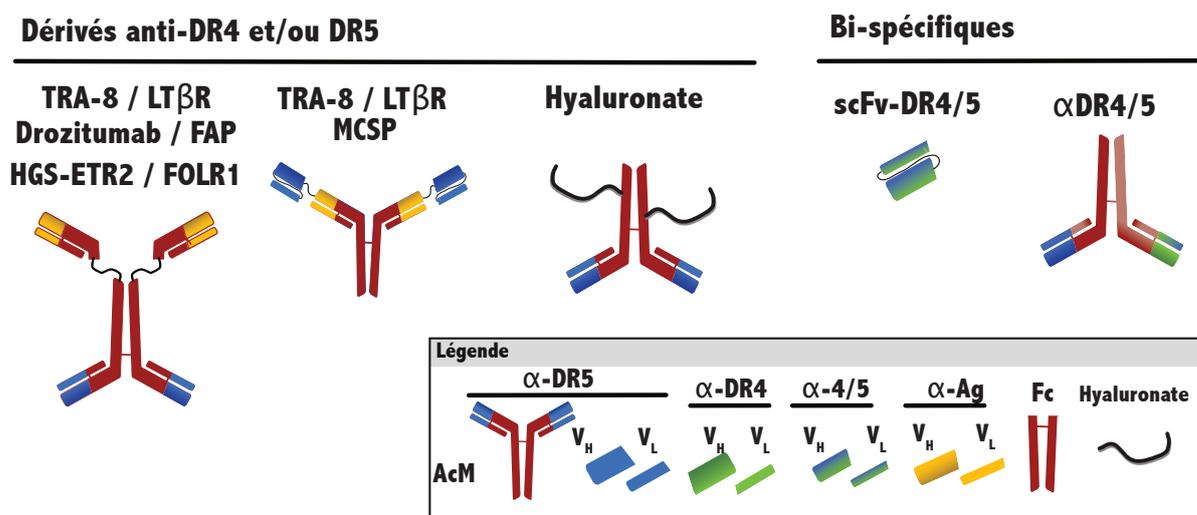


FIGURE 3.5 – Représentation schématique des dérivés anti-DR4/DR5 et anticorps bispécifiques ciblant DR4 et DR5.

très peu de scFvs - moins de 2% - ont démontré une cross-réactivité pour les deux récepteurs. Un second criblage, a permis d'identifier 134 scFv-bispécifiques pour DR4 et DR5. Cependant, aucun de ces scFv n'a été capable d'induire la mort cellulaire dans les deux lignées cellulaires testées, HT1080 et ST486, un fibrosarcome et un lymphome de Burkitt, respectivement [Dobson et al., 2009]. Cette banque représente néanmoins une source très intéressante de scFv pour la construction de diabodies ou d'anticorps entiers ciblant uniquement DR4, DR5, ou les deux. En utilisant une approche similaire, un anticorps réagissant de façon croisée avec DR4 et DR5 a été trouvé. Cet anticorps nécessite une réticulation pour déclencher son activité tumorale *in-vitro* mais il a démontré une activité puissante *in-vivo* [Milutinovic et al., 2016].

D'autres dérivés bispécifiques décrits jusqu'à présent sont basés sur des anticorps tétra-valents. Ceux-ci hébergent des chaînes variables de TRA-8, du Drozitumab ou de HGS-ETR2 et des fragments scFv ciblant soit LT β R (*lymphotoxin β receptor*), MCSP (*melanoma associated chondroitin sulfate proteoglycan*) ou FOLR1 (*folate receptor alpha-1*). Les anticorps bi-spécifiques TRA-8xLT β R visent à cibler les lignées cellulaires cancéreuses épithéliales [Michaelson et al., 2009]. Construits avec un scFv :LT β R fusionné à l'extrémité N- ou C-terminale de la chaîne lourde de l'anticorps TRA-8, ces deux anticorps bi-spécifiques inhibent la croissance tumorale des cellules exprimant LT β R *in-vivo*. Un anticorps bispécifique MCSPxDR5, issu d'un AcM MCSP de haute affinité, fusionné aux domaines de liaison variables du tigituzumab, a été évalué pour sa sélectivité antitumorale vis-à-vis des mélanomes. MCSP est une cible bien établie dans l'immunothérapie du mélanome car il est surexprimé dans plus de 90% des cas, mais son expression est limitée dans les mélanocytes normaux. En ciblant cette protéine membranaire avec l'anticorps bispécifique MCSP \times DR5, les auteurs de cette étude ont pu démontrer deux éléments importants. Le premier est que la liaison de MCSP \times DR5 se produit principalement sur les cellules

MCSP⁺DR5⁺, par rapport aux cellules MCSP-DR5⁺, indiquant que la liaison se produit principalement par MCSP. Le second est que l'AcBs MCSP×DR5 est capable d'induire la mort des cellules tumorales d'une manière ADCC-dépendante et indépendante *in-vitro* [He et al., 2016]. Par conséquent, MCSP×DR5 représente un composé intéressant pour le traitement des mélanomes. Plus récemment, un anticorps bispécifique a été construit pour cibler FOLR1 et DR5 sur les cancers ovariens. L'anticorps bispécifique FOLR1×DR5 a été construit à partir d'un anti-FOLR1 testé en clinique et du Lexatumumab, dans le but de traiter les cancers ovariens surexprimants les récepteurs FOLR1 [Shivange et al., 2018]. Cet anticorps bispécifique permet d'augmenter jusqu'à 100 fois l'activité pro-apoptotique induite par DR5 *in-vitro* et *in-vivo* comparé au Lexatumumab seul. Il semblerait que cette activité soit principalement due à une stabilisation, via la liaison au FOLR1, de la réticulation de DR5 par les cellules exprimant FcγRIIB.

La dernière catégorie d'AcBs cible les antigènes présents dans le microenvironnement tumoral. Ces derniers incluent RG7368, un AcBs DR5×FAP dérivé du Drozitumab et la protéine d'activation des fibroblastes (FAP), présente dans le stroma de la tumeur. Cette stratégie permet de mettre en contact des agents anti-DR5 dans un microenvironnement tumoral FAP-positif. RG7368 induit une destruction tumorale puissante d'une manière dépendante de la FAP et inhibe la croissance tumorale *in-vivo* [Brunker et al., 2016]. La combinaison du RG7368 avec l'irinotécan ou la doxorubicine a également démontré une augmentation substantielle de la régression de la croissance tumorale dans les xénogreffes de cellules colorectales dérivées de patients. Un autre anticorps hybride scFv :DR5 tétravalent a également été évalué, avec succès, pour sa capacité à éliminer les métastases hépatiques dans des modèles de xénogreffes d'animaux précliniques [Lee et al., 2016]. La multivalence dans ce cas est apportée par la fonctionnalisation covalente de l'hyaluronate (HA) au scFV :DR5.

3.3.3 Récepteurs d'antigènes chimériques, CARs

Les récepteurs d'antigènes chimériques sont des formats tumoricides prometteurs. Ils sont conçus par un scFv reconnaissant un antigène tumoral spécifique fusionné à un système d'activation de cellule T intracellulaire [Gross et al., 1989a] [Gross et al., 1989b]. À ce jour, un seul CAR ciblant les récepteurs de mort TRAIL a été décrit (figure 3.6). Ce TR1-scFv-CAR a été développé en utilisant scFv reconnaissant DR4, il a été exprimée à la surface des cellules Jurkat déficientes en DR4, sur une lignée cellulaire NK, ou sur des cellules du sang périphérique humaines (PBL). Ce CAR a induit l'apoptose des cellules cibles exprimant DR4 de manière endogène. Exprimé dans les cellules immunitaires (NK et PBL), TR1-scFv-CAR induit une activité cytolytique médiée par CAR, démontrant que les CAR ciblant les DR pourraient être utilisés comme outils thérapeutiques anticancéreux induisant une régression tumorale [Kobayashi et al., 2014].

Récepteur d'antigène chimérique (CAR)

Dérivés d'immunoconjugués de TRAIL

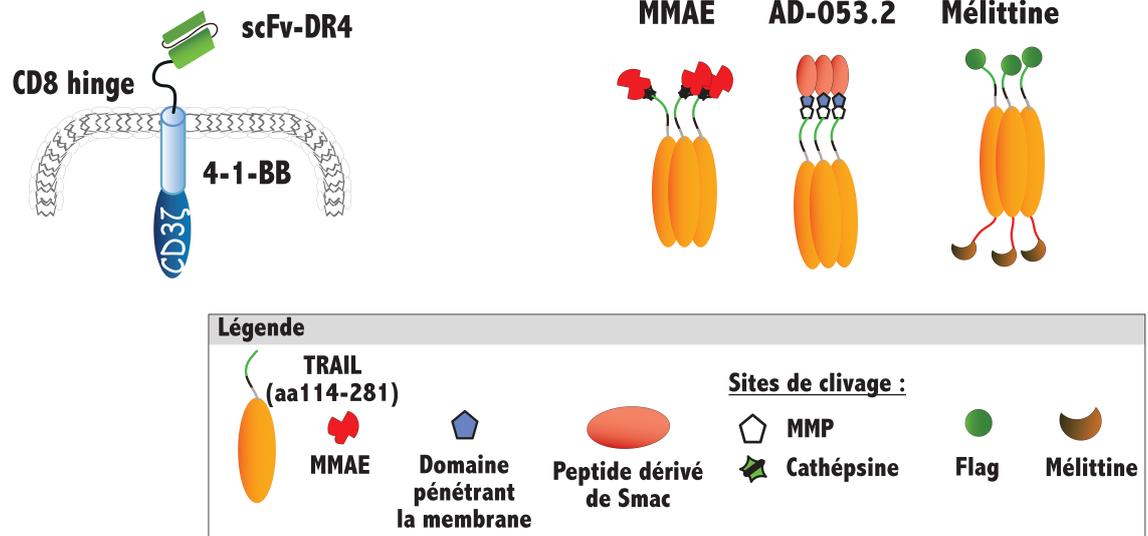


FIGURE 3.6 – Représentation schématique des récepteurs chimérique CAR et des dérivés de TRAIL-ADC. À droite est présentée la construction des CAR, contenant un domaine scFv extracellulaire ciblant DR4, une région charnière CD8 et un domaine CD3 intracellulaire médiant l'activation des cellules T. Ce composé est capable d'activer l'apoptose induite par DR4 et la cytotoxicité spécifique des cellules T. La représentation des constructions TRAIL-ADC est sur la gauche. Trois composés existent, TRAIL lié à la monométhyl auristatine E, à un dérivé de Smac / Diablo ou encore à la méliittine, un antibactérien hautement cytotoxique.

3.3.4 Dérivés d'immunoconjugués de TRAIL

La technologie ADC tire parti de la haute spécificité des anticorps pour leurs antigènes cibles, pour délivrer un agent cytotoxique puissant à des cellules tumorales et ce de manière spécifique [Beck et al., 2017] [Lambert and Morris, 2017]. Bien que cette méthode n'ait, jusqu'à présent, jamais été testée avec des AcMs ou des dérivés ciblant DR4 ou DR5, elle a été évaluée avec trois variants de TRAIL recombinants pour surmonter la toxicité liée à la chimiothérapie ainsi que la résistance au TRAIL (figure 3.6).

Le premier exemple est TRAIL conjugué avec la monométhyl auristatine E (TRAIL-MMAE) via la liaison valine et citrulline ou le PEG. Le ciblage de la tumeur par TRAIL a permis l'administration sélective du médicament cytotoxique MMAE. Après liaison, TRAIL-MMAE est rapidement internalisé dans le cytoplasme des cellules cancéreuses ciblées, et libéré au niveau du lysosome par le clivage spécifique du linker lysosomal. Une fois dans le cytoplasme, le médicament cytotoxique exerce son action antimitotique, conduisant à la mort des cellules cancéreuses. Cette étude démontre *in-vitro* que la lignée cellulaire MCF-7, carcinome mammaire humain résistant au TRAIL, intériorise efficacement le MMAE dans son cytoplasme et meurt par apoptose. *In-vivo*, TRAIL-MMAE a montré une longue demie-vie (> 11 h) et de puissantes activités antitumorales dans les

modèles de xénogreffes, tout en restant sans danger pour l'animal car aucun signe de toxicité n'a pu être détecté [Pan et al., 2015]. Le conjugué TRAIL-MMAE PEGylé s'est également avéré présenter une bonne pharmacodynamique, avec une demie-vie atteignant près de 7h. Cet ADC TRAIL-MMAE PEGylé a un potentiel antitumoral sélectif, et aucun signe d'hépatotoxicité [Wei et al., 2017].

AD-O53.2 est un autre dérivé de TRAIL de type ADC. Il a été conçu en fusionnant TRAIL et Smac / Diablo avec un linker contenant un site de clivage par une métalloprotéase et un peptide pénétrant la membrane, dans le but de diminuer la résistance des cellules cancéreuses à TRAIL. AD-053.2 a augmenté *in-vitro* de 3 à 6 fois la sensibilité des cellules tumorales à l'apoptose et a induit la régression tumorale dans les modèles animaux de xénogreffe [Pieczykolan et al., 2014].

Enfin, un dérivé de TRAIL de type ADC à base de Melittin, un peptide hydrosoluble de 26 aa dérivé du venin d'abeille d'*Apis mellifera*, a été testé pour sa capacité à induire la destruction des cellules tumorales. Pour des raisons inconnues ce peptide exerce une cytotoxicité sélective sur une grande variété de cellules tumorales, mais n'est pas toxique pour les cellules saines. Il avait été décrit initialement pour sensibiliser l'apoptose induite par TRAIL dans les carcinomes hépatocellulaires [Wang et al., 2009]. Fusionné à TRAIL de manière semblable à l'ADC, le conjugué TRAIL-Melittin s'est avéré présenter une augmentation modérée des propriétés antitumorales *in-vitro*, comparativement au TRAIL seul [Liu et al., 2013]. Ces résultats suggèrent que la construction de dérivés DR4 ou DR5 semblable à l'ADC, pourraient très probablement s'avérer sans danger *in-vivo* et se montrer efficaces pour inhiber la croissance tumorale.

Chapitre 4

Méthodes d'immunisations ADN pour l'obtention d'anticorps monoclonaux conformationnels

4.1 Principes et avantages de la méthode

Le développement d'anticorps thérapeutiques par immunisation est aujourd'hui un procédé optimisé et bien maîtrisé. L'immunisation classique se fait via l'utilisation de protéines recombinantes ou de peptides analogues à la cible. Cependant, toutes les cibles ne peuvent être reproduites de façon recombinante. Certaines d'entre elles sont altérées par le processus de production et de purification. En faisant varier drastiquement le pH des tampons, ces procédés peuvent endommager les épitopes, qui ne seront alors plus natifs. D'autre part, le caractère très hydrophobe de certaines protéines ou encore leur complexité conformationnelle font qu'elles sont difficiles à produire [Yang et al., 2006]. En effet, la difficulté à générer certaines modifications post-traductionnelles rendent les conformations endogènes et natives des protéines d'intérêt compliquées à reproduire *in-vitro* [Chow et al., 2006b] [Zhang et al., 2013]. Or, pour les épitopes conformationnels, présents par exemple sur des boucles extra-cellulaires ou encore les protéines multi-membranaires, la protéine doit absolument être présentée sous sa forme native pour être reconnue efficacement par l'anticorps [Alexandrenne et al., 2009] [Hazen et al., 2014] [Khademi et al., 2017]. Dans ce cas, l'immunisation par peptide ou protéine recombinante peut difficilement permettre d'obtenir la conformation tridimensionnelle exacte de la protéine immunogène et ses épitopes natifs. Cette difficulté constitue un réel défi pour la production d'anticorps thérapeutiques spécifiques de ces protéines complexes.

Pour toutes ces raisons, une nouvelle forme d'immunisation a été développée au début des années 90, l'immunisation ADN [Nabel et al., 1990] [Acsadi et al., 1991]. Cette méthode consiste à immuniser directement les souris avec l'ADN de la protéine d'intérêt pour une production *in-situ* de la protéine sous sa **conformation native**. Pour ce faire, un plasmide codant la protéine d'intérêt est injecté aux souris. Le plasmide est alors incorporé par les cellules murines, utilisant leur machinerie cellulaire pour exprimer nativement la protéine à la membrane des cellules. Ces protéines tri-dimensionnelles sont alors reconnues par le système immunitaire murin, induisant la production d'anticorps spécifiques de la forme native et conformationnelle de la cible. Initialement utilisée comme méthode de vaccination [Ulmer et al., 1993], l'immunisation ADN a démontré sa capacité à induire une réponse cellulaire et humorale significative [Tang et al., 1992] [Shedlock and Weiner, 2000]. Une équipe de recherche a notamment montré que l'immunisation ADN était plus efficace que l'immunisation par protéines pour activer les cellules B du centre germinatif. Elle présente en outre plusieurs avantages pour la production d'anticorps monoclonaux [Ni et al., 2004][Liu et al., 2016].

La production de protéines recombinantes est un procédé souvent compliqué, long et coûteux, qui est considéré comme une étape limitante de l'immunisation protéique conventionnelle. La production de plasmides est quant à elle, bien plus simple, rapide et moins onéreuse. La durée d'immunisation par ADN est elle aussi plus courte que celle utilisant exclusivement des protéines recombinantes. De plus, cette méthode offre la possibilité d'immuniser les souris avec de **nouveaux designs d'immunogènes**. Cette flexibilité permet de diversifier les anticorps ainsi produits. Enfin, elle permet d'obtenir non seulement les épitopes natifs et conformationnels des protéines d'intérêt, mais également de les produire directement au sein de la souris hôte. Une immunisation par ADN, moins contraignante, permet ainsi d'obtenir des **épitopes de qualité**, conduisant à des anticorps bien spécifiques de la cible d'intérêt [Alexandrenne et al., 2009]. Tous ces avantages offrent la possibilité de développer de potentiels nouveaux outils dans des pathologies où les besoins médicaux sont encore non satisfaits.

4.2 Les différents types d'immunisations ADN

Un plasmide ne pouvant pas entrer naturellement dans une cellule, plusieurs méthodes ont été utilisées afin de permettre aux acides nucléiques de traverser la membrane plasmique et d'intégrer les cellules murines. Depuis les premiers développements d'immunisation par ADN, effectués par simple injection à l'aiguille, des efforts considérables ont été faits pour optimiser la méthode d'injection et la voie d'administration. Ce sont trois méthodes physiques qui ont donné les meilleurs résultats. La première utilise un pistolet à gène, « *gene gun* », où des billes d'or sont recouvertes de l'ADN d'intérêt. La force balistique des particules d'or force la pénétration du plasmide dans

les cellules des tissus cibles, majoritairement la peau, pour une expression intradermique de la protéine [Tang et al., 1992] [Fynan et al., 1993]. La seconde méthode se fait par injection intra-musculaire [JA et al., 1990] [Ulmer et al., 1993]. Toutefois, pour être entièrement efficace, cette technique doit être couplée à de l'électroporation [Morel et al., 2004] [Chow et al., 2006b] [Chua et al., 2008]. L'injection se fait à l'aiguille et l'application d'un courant électrique au site d'injection permet de faciliter l'entrée de l'ADN dans les cellules. Ces deux méthodes sont efficaces mais les dispositifs sont souvent coûteux et rarement présents au laboratoire. Assez tôt, une troisième méthode ne demandant pas d'équipement particulier a été développée : la méthode hydrodynamique (méthode HTV ou HLV). Le principe utilisé repose sur les propriétés de la dynamique des fluides (figure 4.1). Pour ce faire, un grand volume est rapidement injecté par voie intraveineuse dans la queue (HTV) ou dans la patte (HLV), et selon un principe de mécanique des fluides, la force hydrodynamique générée va forcer le plasmide à intégrer les cellules murines [Bates et al., 2006] [Herweijer and Wolff, 2007].

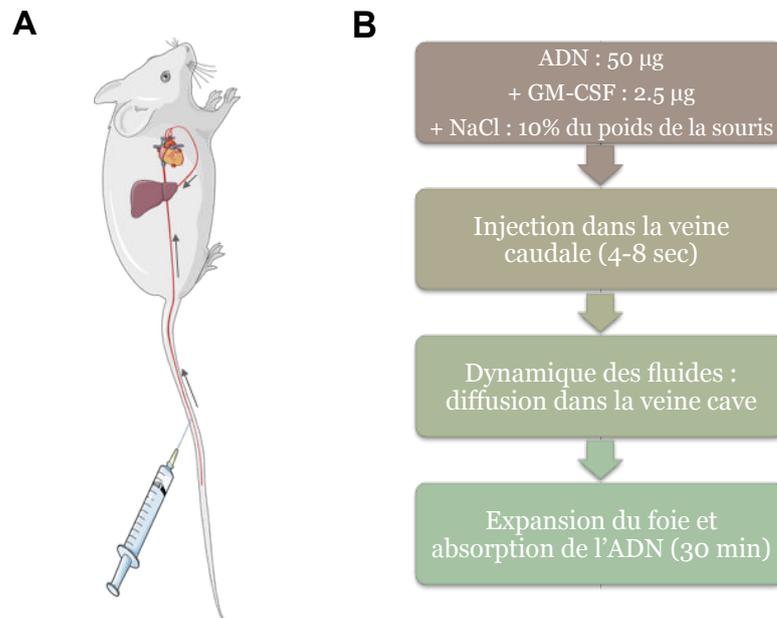


FIGURE 4.1 – Schéma d'injection hydrodynamique d'ADN dans la veine caudale **A**. Distribution hydrodynamique des plasmides **B**. Différentes étapes de l'immunisation HTV

Des expériences suggérant que l'administration intracellulaire d'acides nucléiques peut être réalisée par injection d'un grand volume de solution ont d'abord été rapportées par Budker *et al.* [Budker et al., 1996]. Cependant, le principe de distribution hydrodynamique combinant l'effet du grand volume et de l'injection rapide n'a été établi qu'en 1999 [Liu et al., 1999] [Zhang et al., 1999]. En effet, il y a trois éléments critiques dans la distribution hydrodynamique : le volume important, la vitesse d'injection élevée, et une vascularisation disponible [Liu et al., 2010]. Liu *et al.* et Zhang *et al.* ont démontré qu'une administration efficace de gène chez la souris était

possible par une injection rapide dans la veine caudale (4-8s) d'ADN plasmidique, dans un volume égal à 8-10% du poids corporel. Dans de telles conditions expérimentales, l'expression du gène rapporteur a été détectée dans tous les organes internes examinés, y compris le poumon, le cœur, la rate, les reins et le foie, avec le taux le plus élevé observé dans le foie. Cette technique a par la suite été efficacement étudiée et le mécanisme d'administration hydrodynamique aux hépatocytes a bien été identifié [Suda et al., 2007] [Suda and Liu, 2007]. Ce procédé permet un passage à la veine cave puis au foie pour une intégration de l'ADN plasmidique dans les cellules hépatiques et une expression native des protéines à leur membrane (figure 4.1). Cette technique a notamment permis de développer des anticorps ciblant des molécules aussi complexes qu'un transporteur comprenant 12 domaines transmembranaires [Hazen et al., 2014].

Pour toutes ces spécificités, la méthode d'immunisation ADN hydrodynamique par injection dans la veine caudale (immunisation HTV) nous a semblée intéressante pour la production d'anticorps ciblant les récepteurs transmembranaires DR4 et DR5.

4.3 Les différents schémas d'immunisations

Au delà des voies et méthodes d'injection, un autre élément important à prendre en compte est le schéma d'immunisation ADN. Les facteurs critiques sont l'utilisation de modulateurs de l'immunité, le design du plasmide, ainsi que l'utilisation de rappels.

Aujourd'hui, il n'existe pas de consensus quant au schéma d'immunisation ADN. Dans la plupart des cas, des plasmides codant pour un modulateur de l'immunité, comme le GroEL ou le GM-CSF, sont ajoutés avec le plasmide d'intérêt pour augmenter l'immuno-réactivité de la cible [Shkreta et al., 2004] [Takatsuka et al., 2011] [Fujimoto et al., 2012] [Hazen et al., 2014]. Le schéma d'immunisation dépend donc majoritairement du type de plasmide utilisé et du choix du rappel.

4.3.1 Le promoteur plasmidique

Le promoteur plasmidique est un élément important à prendre en compte lors du schéma d'immunisation car il détermine le temps d'expression de la protéine *in-situ*. Un promoteur CMV (provenant du cytomégalo virus) permet d'exprimer efficacement la protéine d'intérêt [Liu et al., 1999] [Andersson et al., 2000] [Morel et al., 2004] [Signori et al., 2010]. Dans ce cas, une injection par semaine est nécessaire, pendant majoritairement 4 semaines. La construction d'un plasmide avec un promoteur CAG et d'une séquence WPRE (pCAGGS), permet quant à lui d'exprimer la protéine plus longtemps [Hazen et al., 2014]. Le promoteur CAG est un promoteur de β -actine de poulet, modifié pour inclure la séquence accepteur d'épissage du promoteur du gène de la β -globine de lapin. La séquence WPRE est un élément de régularisation post-transcriptionnelle, stabilisant les mRNA à l'intérieur des cellules. Les vecteurs pCAGGS contenant cette séquence

ont démontré une efficacité supérieure à l'utilisation d'un vecteur contenant le promoteur CAG seul. Une injection toutes les deux semaines est alors suffisante pour induire une réponse immunitaire efficace.

Cependant, quel que soit le promoteur utilisé, il est très rare de trouver dans la littérature des schémas d'immunisation allant au-delà de 4 injections d'ADN.

4.3.2 Les rappels

Toutefois, lorsque cela est le cas, les rappels suivant les injections ADN représentent un autre élément important dans les schémas d'immunisation. Alors que certaines équipes se sont arrêtées après 4 injections d'ADN, d'autres ont prolongé l'immunisation par des rappels cellulaires ou protéiques [Nagata et al., 2003]. Les rappels cellulaires apportent l'avantage de garder une conformation native de la protéine, mais souvent d'autres anticorps spécifiques de la lignée cellulaire et non plus de la protéine d'intérêt apparaissent au cours du temps, détériorant la qualité de l'immunisation [Nagata et al., 2003][Allard, 2012]. Cette méthode présente donc quelques inconvénients si plusieurs rappels sont effectués. D'autres études ont mis en avant l'avantage d'utiliser des rappels protéiques, lorsque ces protéines recombinantes sont relativement proches de la conformation native de la cible, comme les protéines uni-transmembranaires ou les protéines à ancrage glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). Pour celles-ci, de tels rappels, effectués avec des protéines sous forme recombinantes, présentent un grand avantage pour l'induction de réponses d'anticorps de haut titre et de haute qualité. Cette approche hétérologue permet d'induire des réponses plus robustes de cellules B spécifiques aux antigènes, de générer un titre plus élevé et de développer des anticorps de meilleure qualité [Shkreta et al., 2004] [Zhang et al., 2013] [Li et al., 2013]. Ces résultats ont été également confirmés par une co-immunisation ADN/protéine [Xue et al., 2009][Jalah et al., 2014][Liu et al., 2015a] ou en comparant une immunisation protéique avec une immunisation ADN suivi de rappels protéiques [Yang et al., 2006].

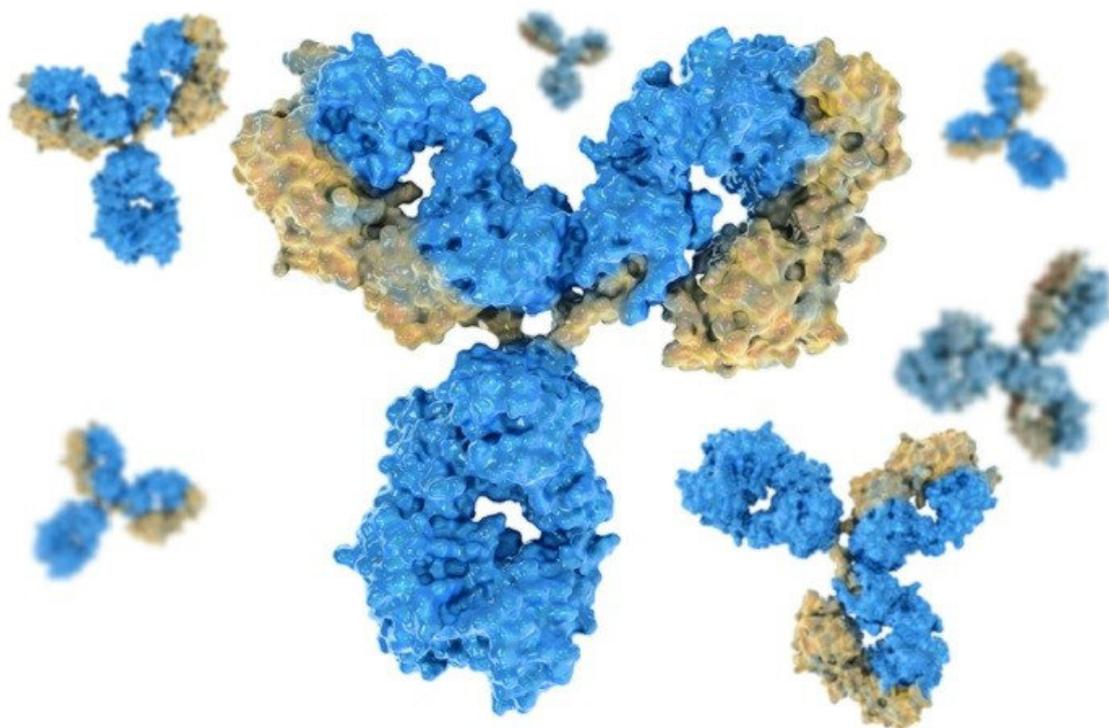
Deuxième partie

**OBJECTIFS DES TRAVAUX DE
THÈSE**

La découverte du système TRAIL-TRAILRs au milieu des années 90 a suscité beaucoup d'intérêt en oncologie. De par leur sélectivité envers DR4 ou DR5, récepteurs surexprimés sur les cellules tumorales, les anticorps monoclonaux (AcM) représentent des outils très intéressants pour le ciblage des cellules cancéreuses et l'induction d'apoptose. L'évaluation préclinique et clinique des AcM agonistes des récepteurs TRAIL de première génération n'a cependant pas démontré une efficacité suffisante. Des recherches récentes ont conduit à une meilleure compréhension des événements moléculaires régissant la transduction du signal d'apoptose médié par TRAIL, et l'avènement d'une ingénierie biomoléculaire innovante suggère que le ciblage des récepteurs TRAIL par les AcM est encore prometteur pour la thérapie contre le cancer. L'engagement de l'apoptose par DR4 et DR5 repose principalement sur la capacité du ligand ou des AcM agonistes à induire une agrégation des récepteurs. Jusqu'à présent, les évaluations d'AcM en clinique se sont principalement concentrées sur DR5, avec un seul anti-DR4 évalué en phase I / II. En gardant à l'esprit que DR4 l'emporte sur DR5 dans la transduction de l'apoptose et que les AcM anti-DR4 et anti-DR5 peuvent potentialiser la mort cellulaire induite par TRAIL, la prochaine génération d'AcM ciblant DR4 et DR5 est donc susceptible de redonner espoir aux thérapeutiques anti-tumorales. Lorsque j'ai commencé ce travail, seul l'AcM anti-DR5 AMG655 (Conatumumab) avait été évalué en combinaison avec TRAIL, et l'association d'un AcM anti-DR4 avec TRAIL n'avait pas encore été étudiée.

Il existe donc un réel besoin d'ouvrir d'autres voies pour générer de nouveaux AcM ayant la capacité d'engager efficacement la voie pro-apoptotique. L'immunisation ADN représente une voie intéressante car elle permet de produire des AcM **reconnaissant la forme tri-dimensionnelle et native** de la protéine ciblée, ou **reconnaissant plusieurs récepteurs pré-assemblés, par leur région PLAD**. Chacun des schémas d'immunisation d'ADN présente des avantages et des inconvénients. Nous avons choisi de mettre en place la méthode d'immunisation ADN par injection hydrodynamique (HTV) sur la base des travaux de l'équipe de Hazen [Hazen et al., 2014]. La méthode par immunisation ADN HTV n'a jamais été utilisée pour le développement d'AcM ciblant des récepteurs agonistes de la superfamille du TNF (TNFSF) comme DR4 et DR5. Cette méthode pourrait permettre de générer des AcM présentant des caractéristiques nouvelles et spécifiques. L'utilisation de l'immunisation ADN pourrait permettre de cibler des épitopes intervenant dans la réticulation des récepteurs et/ou dans la formation des PLAD, ou induisant leur multimérisation lorsque les AcM sont utilisés en combinaison avec TRAIL.

Nous avons donc décidé de nous fixer comme objectif pour ce travail de tenter de générer, par la méthode d'immunisation ADN HTV, de **nouveaux AcM anti-DR4 et anti-DR5** démontrant des activités pro-apoptotiques intéressantes, **seuls (anticorps agonistes) ou en combinaison avec TRAIL (anticorps potentialisateurs)**.



Troisième partie

RÉSULTATS

Chapitre 5

Production des anticorps monoclonaux ciblant DR4 et DR5

5.1 Constructions plasmidiques

5.1.1 Production des plasmides pour les immunisations ADN

Afin d'effectuer les immunisations par ADN des souris, plusieurs plasmides ont été construits au cours de cette thèse.

Les plasmides pCR3 encodant DR4 ou GMCSF, déjà présents au laboratoire, contiennent un promoteur CMV. Ces plasmides seront dénommés DR4-pCR3 (OM319) et GMCSF-pCR3 (OM1438) par la suite et sont présentés sur la figure 5.1.

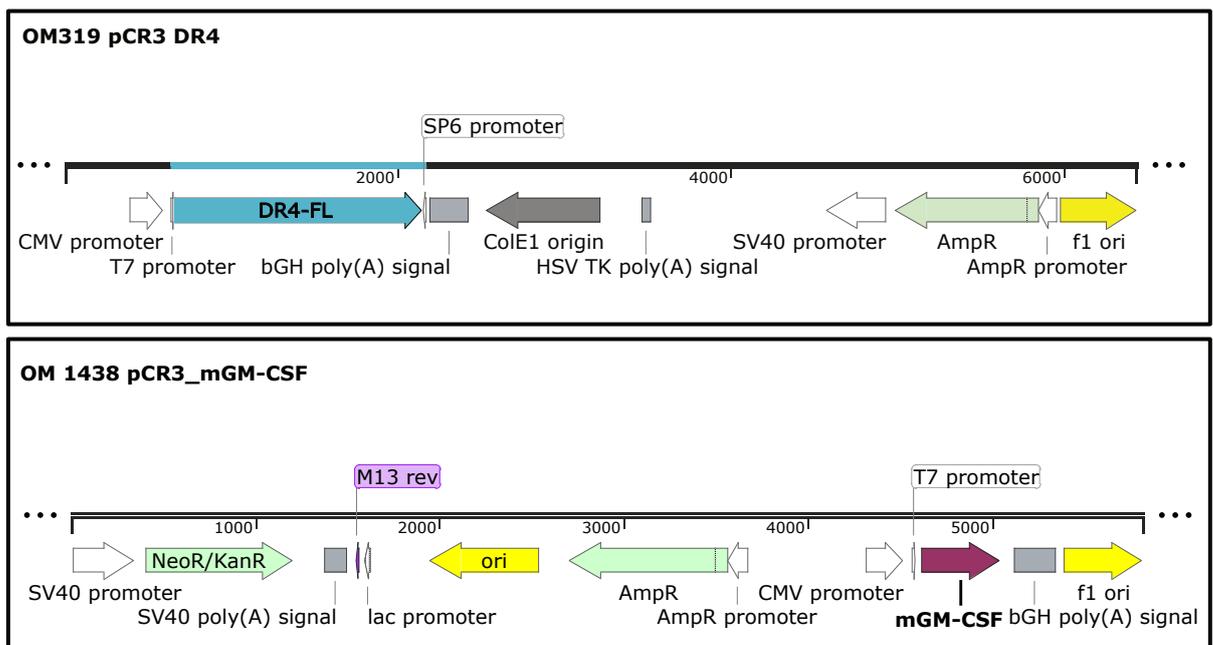


FIGURE 5.1 – Cartes des plasmides pour les immunisations ADN du protocole DR4-pCR3 : DR4-pCR3 (OM319) et GMCSF-pCR3 (OM1438).

Les trois autres vecteurs, contenant le promoteur CAG et la séquence WPRE ont été construits au cours de ma thèse, suivant la méthode Gibson décrite dans les matériels et méthodes. Ces derniers contiennent la séquence entière DR5, le facteur de stimulation des colonies de macrophages granulocytaires (GM-CSF) et le ligand tyrosine kinase 3 de type fms murin (mFLT3). Ces plasmides seront nommés respectivement DR5-pCAGGS (OM680), mFLT3-pCAGGS (OM1461) et GMCSF-pCAGGS (OM1463) par la suite. Les trois plasmides sont présentés sur la figure 5.2. GMCSF-pCAGGS et mFLT3-pCAGGS sont utilisés comme adjuvants immunomodulateurs activant les cellules dendritiques, permettant ainsi de moduler la réponse immunitaire contre l'antigène [Encke et al., 2006].

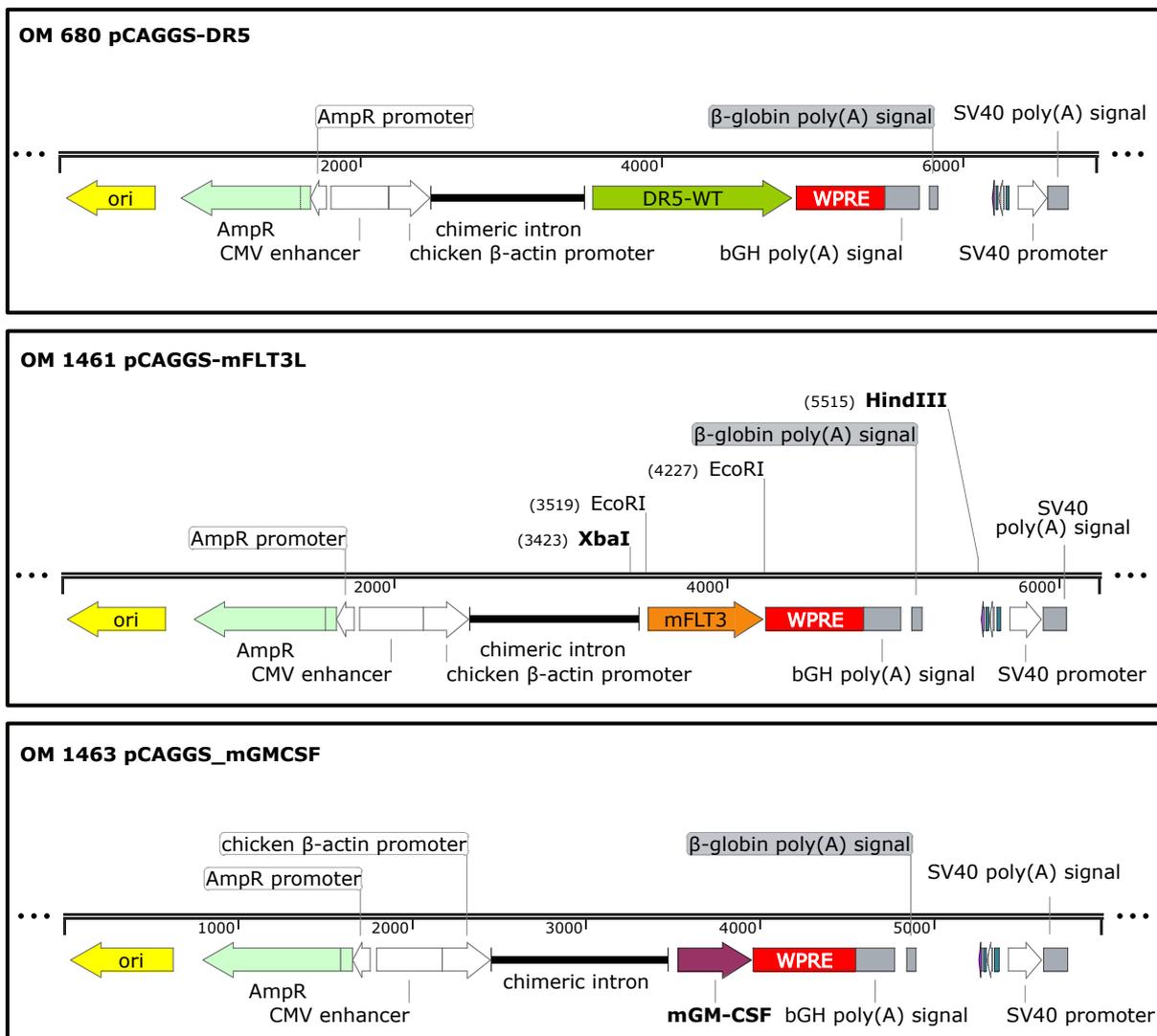


FIGURE 5.2 – Cartes des plasmides pour les immunisations ADN DR5-pCAGGS : pCAGGS-DR5 (OM680), pCAGGS-mFLT3L (OM1461) et pCAGGS-GMCSF (OM1463).

Le plasmide mFLT3-pCAGGS (OM1461) a été construit en premier. La stratégie de clonage est présentée dans les matériels et méthodes ainsi que dans l'annexe B. OM1461 provient du fragment WPRE contenu dans le vecteur OM567, inséré dans le vecteur

OM1460, un plasmide construit au laboratoire lors du stage de Mlle Nathalie Le. Les fragments d'intérêt ont été efficacement amplifiés et assemblés, donnant des clones OM1461 corrects. La figure 5.3 présente les résultats de production de ce plasmide.

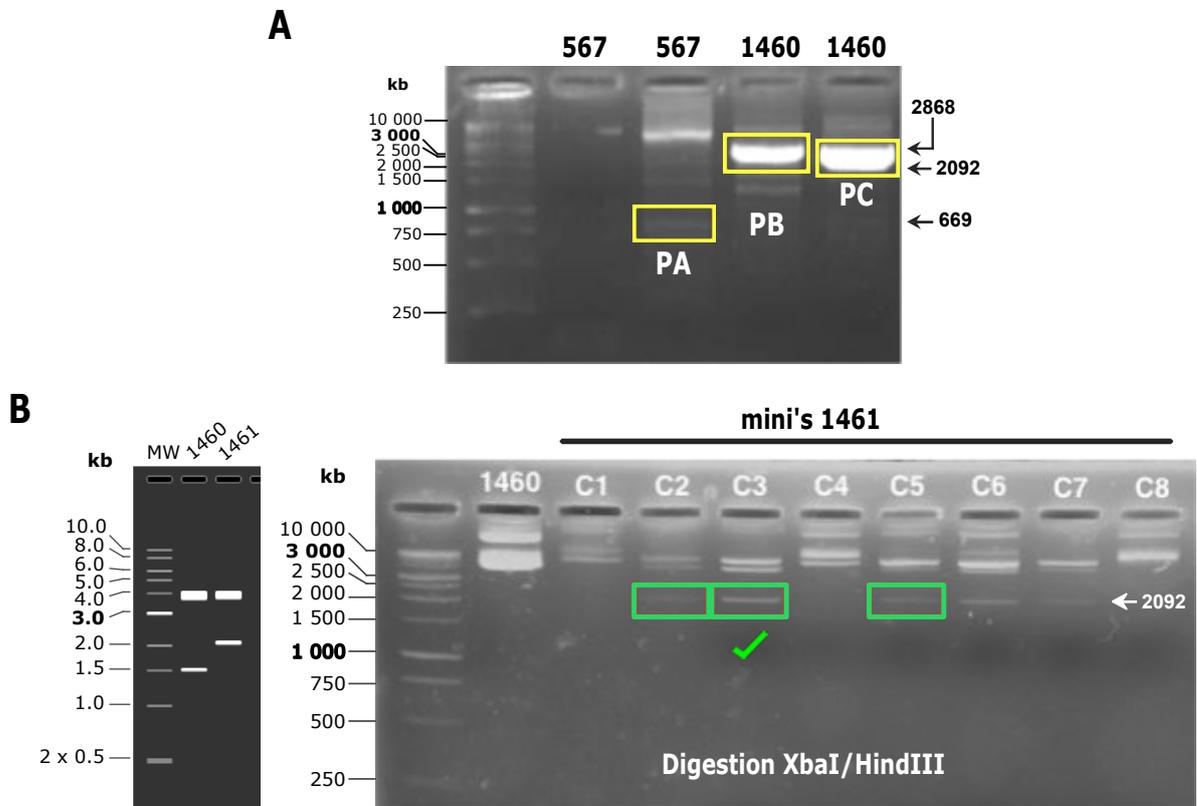


FIGURE 5.3 – Construction du plasmide OM1461 mFLT3-pCAGGS. **A.** Gels de révélation des produits d'amplification PCR de OM567 et OM1460 (encadrés en jaune). Les poids moléculaires recherchés sont indiqués sur la droite **B.** Résultats de la digestion enzymatique par XbaI/HindIII des MINIprep des vecteurs OM1461 préalablement transformés dans des bactéries puis amplifiés. Les clones positifs sont encadrés en vert.

Les plasmides GMCSF-pCAGGS (OM1463) et DR5-pCAGGS (OM680) ont ensuite été construits à partir du plasmide OM1461. Les stratégies de clonage sont également présentées dans les matériels et méthodes ainsi que dans l'annexe B. La figure 5.4 présente les résultats de production des plasmides OM1463 et OM680. Le plasmide OM1461 a été digéré par l'enzyme de restriction EcoRI, pour enlever le fragment mFLT3. Ce fragment est ensuite remplacé soit par le fragment GM-CSF provenant du plasmide OM1438 pour la construction de OM1463, soit par le fragment DR5 provenant du plasmide OM309 pour le plasmide OM680. Les fragments d'intérêt amplifiés par PCR et les produits de digestion enzymatique sont présentés encadrés en jaune et en rouge, respectivement. L'assemblage des fragments d'intérêt par la méthode Gibson a permis d'obtenir les plasmides OM1463 et OM680 (encadrés en vert). L'ensemble de ces clones a été séquencé. La figure 5.5 présente un exemple de séquençage.

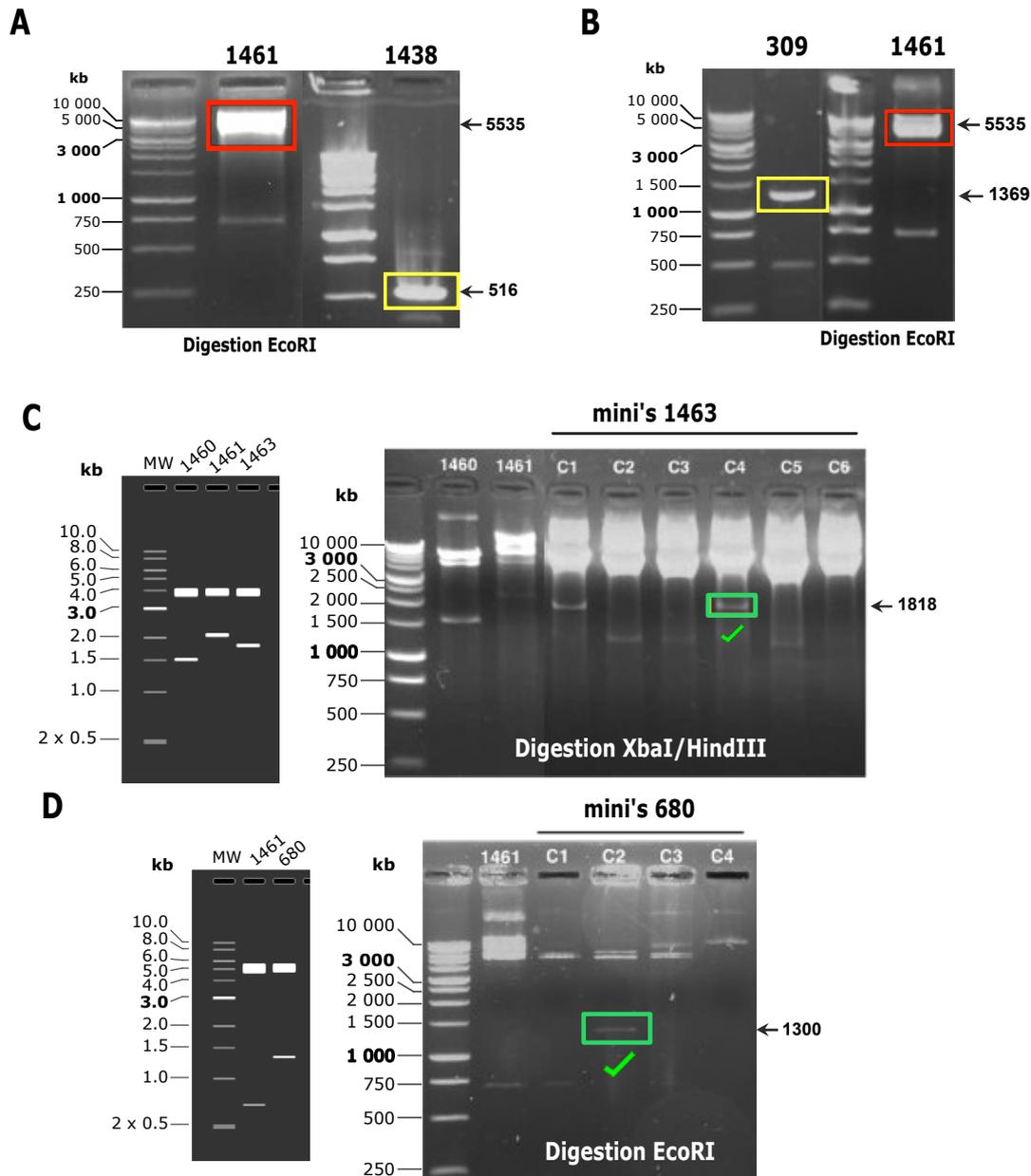


FIGURE 5.4 – Construction du plasmide OM1463 GMCSF-pCAGGS. Gels de révélation des produits de digestion enzymatique de OM1461 par EcoRI (rouge) et **A.** des produits d'amplification PCR de OM1438 (jaune) et **B.** des produits d'amplification PCR de OM309 (jaune). Résultats de la digestion enzymatique par **C.** XbaI/HindIII des MINIprep des vecteurs OM1463 et par **D.** EcoRI des MINIprep des vecteurs OM680. Les clones sélectionnés sont encadrés en vert.

Ces vecteurs sont voués à être injectés *in-vivo*, et leur production se fait dans des bactéries compétentes produisant des lipopolysaccarides (LPS). Or, les LPS sont des endotoxines toxiques pour la souris, il est donc indispensable de les éliminer. Pour ce faire, deux méthodes ont été utilisées : l'extraction isotherme au Triton X-114 [Ma et al., 2012] ou l'utilisation d'un kit de MAXI préparation éliminant directement les LPS (Macherey-Nagel, NucleoBond® Xtra Maxi EF). Cette seconde méthode étant plus rapide et plus simple, elle a été utilisée pour la majorité des plasmides produits.

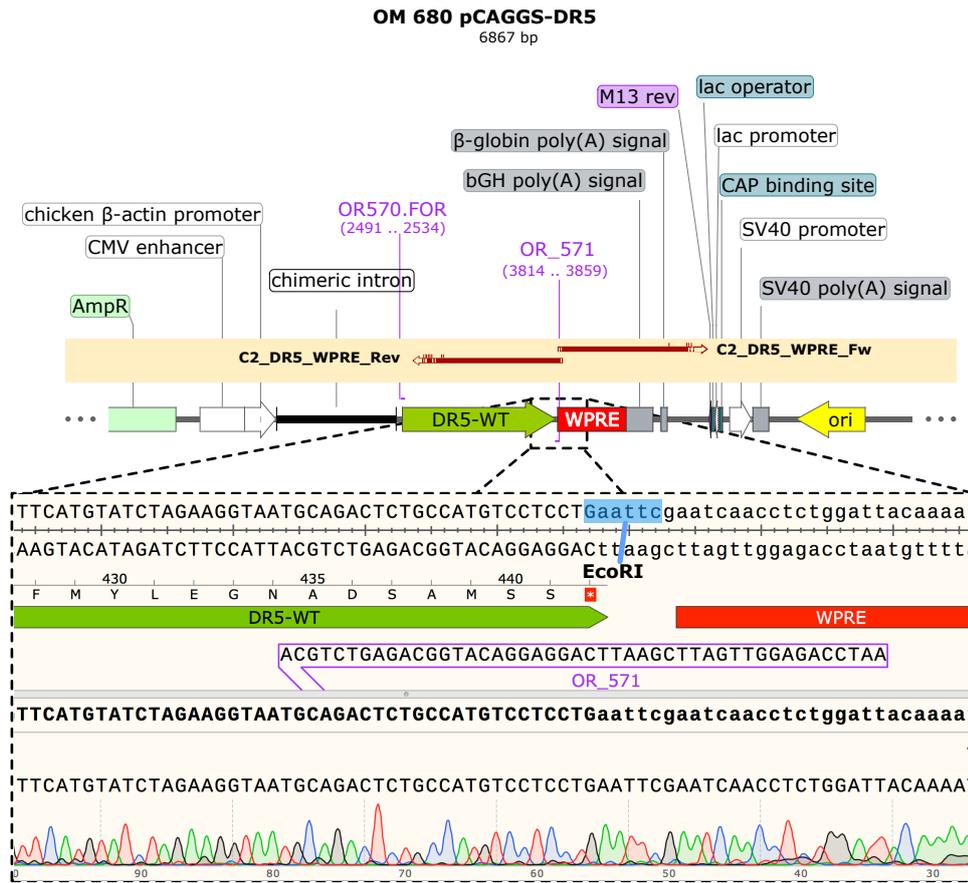


FIGURE 5.5 – Séquençage du clone C2 du plasmide OM680 (pCAGGS-DR5). Résultats du séquençage par les amorces encadrant le fragment DR5-WT et le fragment WPRE.

5.1.2 Production des récepteurs DR4-Fc et DR5-Fc recombinants

Afin de mener à bien toutes les expériences, notamment pour les rappels des immunisations ADN, les tests ELISA, ou encore les analyses d'affinité, une quantité considérable de récepteurs recombinants a été nécessaire. Une production stable des versions recombinantes solubles de DR4 ou DR5 fusionnées à la fraction constante de γ -immunoglobuline humaine, respectivement DR4-Fc et DR5-Fc, a donc dû être mise en place. Pour ce faire, le gène de résistance à la néomycine de plasmides encodants DR4-Fc ou DR5-Fc, déjà présents au laboratoire, a été remplacé par le gène de résistance à la puromycine par une approche de PCR et de clonage. La stratégie de construction de ces plasmides DR4-Fc-pCR3 (OM1450) et DR5-Fc-pCR3 (OM1449) est décrite dans les matériels et méthodes et illustrée dans l'annexe B.

La figure 5.6 présente les résultats de la construction du plasmide DR4-Fc-pCR3 (OM1450). La séquence du gène de résistance à la puromycine a été amplifiée par PCR (en jaune) à partir du plasmide OM565, pour remplacer le gène de résistance de la néomycine contenu dans un vecteur DR4-pCR3 (OM646), amplifié par PCR (en jaune). Les plasmides résultants, amplifiés et analysés par MINIpip, m'ont permis de valider un clone OM1450 (encadré en vert).

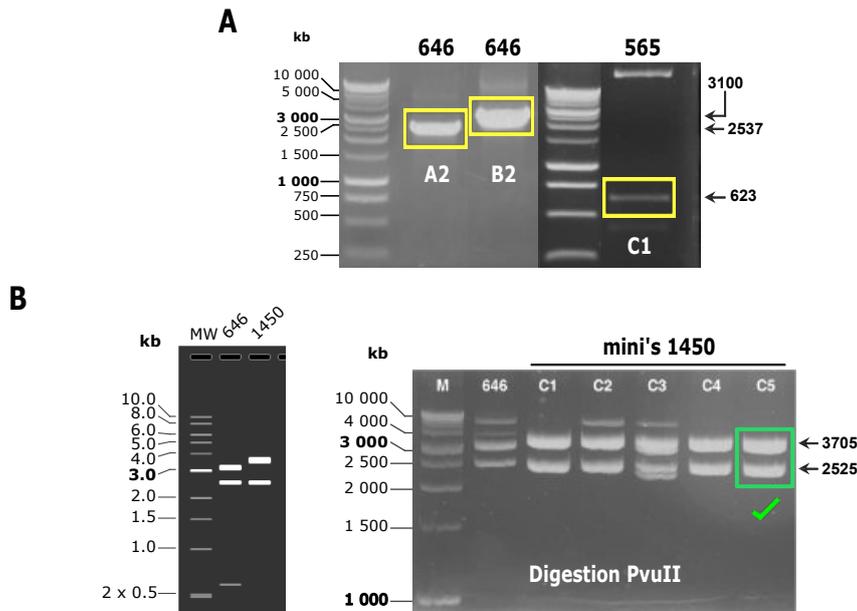


FIGURE 5.6 – Construction du plasmide OM1450 DR4-Fc. **A.** Gels de révélation des produits d'amplification PCR. Les poids moléculaires recherchés sont indiqués sur la droite et les produits d'amplification de PCR extraits sont encadrés en jaune. A2 provient de l'amplification par OR436/435 et B2 par OR437/438 **B.** Résultats de la digestion enzymatique par PvuII des MINIpép des vecteurs OM 1450 préalablement transformés dans des bactéries puis amplifiés. Le clone sélectionné est encadré en vert.

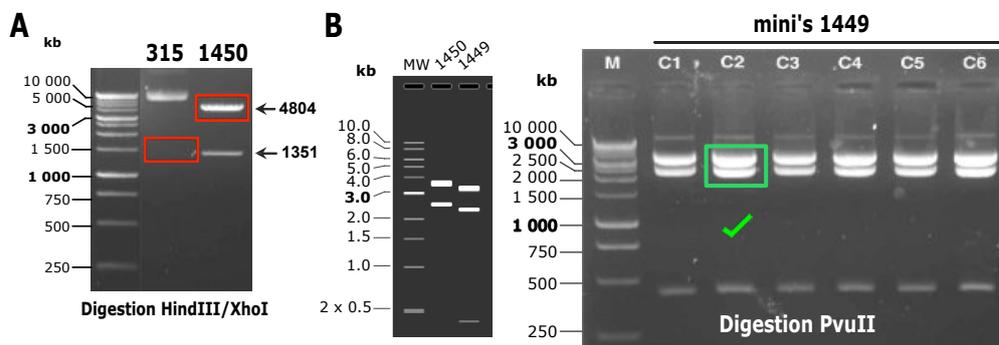


FIGURE 5.7 – Construction du plasmide OM1449 DR5-Fc. **A.** Produits de digestion par les enzymes HindIII/XhoI. Les poids moléculaires recherchés sont indiqués sur la droite et les produits de digestion extraits sont encadrés en rouges. **B.** Résultats de la digestion enzymatique par PvuII des MINIpép des vecteurs OM1449 préalablement transformés dans des bactéries puis amplifiés. Le clone sélectionné est encadré en vert.

Le plasmide DR5-Fc-pCR3 (OM1449) a été construit à partir du plasmide OM1450 et de la séquence du DR5 (OM315) (figure 5.7). Ici, une digestion enzymatique par les enzymes de restrictions HindIII/XhoI a permis d'isoler les fragments d'intérêt (présentés en rouge). Une ligation classique par l'enzyme T4 DNA Ligase a ensuite permis d'assembler les produits de digestions afin d'obtenir des clones OM1449 positifs (encadrés en vert).

Les cartes des plasmides résultants DR4-Fc-pCR3 (OM1450) et DR5-Fc-pCR3 (OM1449) sont présentées sur la figure 5.8.

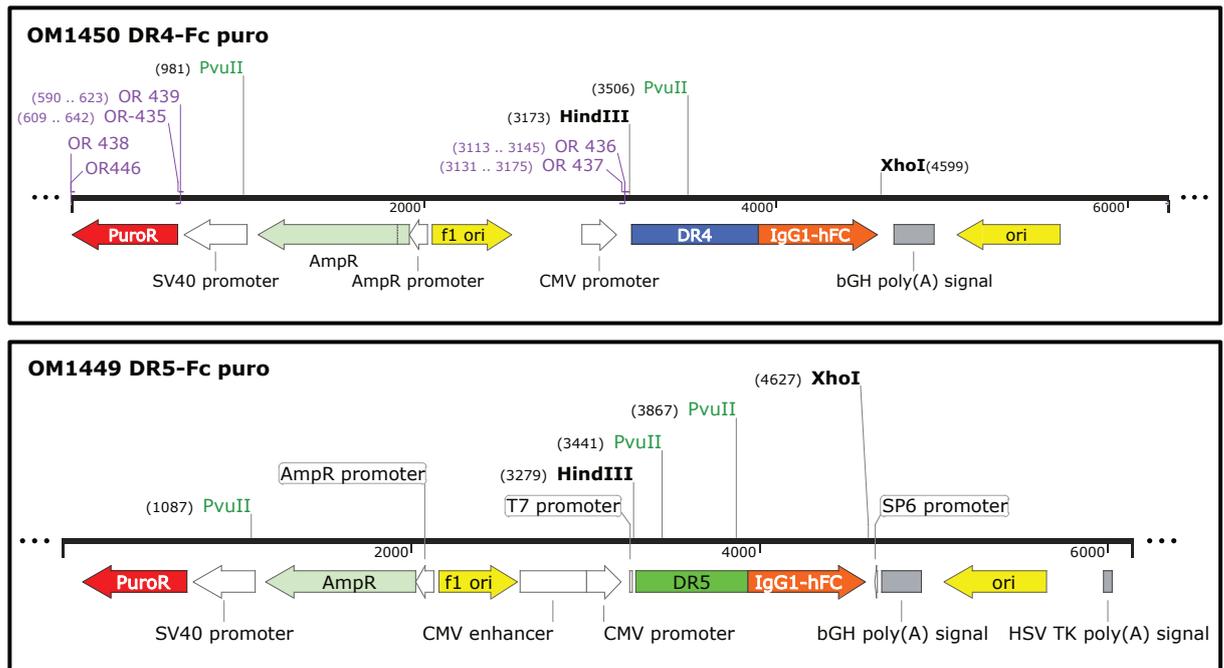


FIGURE 5.8 – Cartes des plasmides OM1450 et OM1449 codants pour le récepteur de fusion DR4-Fc et DR5-Fc, respectivement

Ces récepteurs ont été produits sous forme de protéines de fusion, composés du domaine extra-cellulaire des DRs fusionnés à la partie constante d'une immunoglobuline (fragment Fc), dans un souci de meilleure production et purification. En effet, le fragment Fc permet à la fois un meilleur adressage extracellulaire, mais également une purification plus aisée car il peut être retenu spécifiquement par des billes enrobées de protéines A/G. Les récepteurs de fusions sont ainsi efficacement excrétés dans le milieu extra-cellulaire, soit ici le surnageant, et peuvent être facilement purifiés sur des colonnes contenant des billes de protéines A/G [Huang, 2009][Czajkowsky et al., 2012]. De même, la plupart des fusions-Fc sont exprimées en homodimères, ce qui augmente leur avidité [Czajkowsky et al., 2012]. Le fragment Fc pourrait donc permettre de se rapprocher de la conformation native tridimensionnelle des récepteurs DR4 et DR5.

Production stable et purification des récepteurs

Les plasmides pCR3-DR4-Fc et pCR3-DR5-Fc ainsi obtenus ont ensuite été transfectés dans des cellules eucaryotes HEK293T, en utilisant la technologie des nanoparticules lipidiques permettant une transfection performante et des résultats reproductibles (Lipofectamine 3000, ThermoFisher Scientific). La lignée cellulaire HEK293T est un dérivé hautement transfectable de la lignée HEK293 dans laquelle le gène sensible à la température pour l'antigène T SV40 a été inséré [ATCC]. Cette lignée eucaryote humaine a été utilisée afin d'obtenir les modifications post-traductionnelles les plus proches de la forme native des récepteurs. Un traitement à la puromycine a permis de sélectionner les populations cellulaires résistantes, ayant donc bien intégré le plasmide. Après sélection,

les cellules sont entretenues dans un milieu exempt de puromycine. Après une expansion cellulaire, le milieu de culture est remplacé par un milieu synthétique sans sérum (optiMEM) pendant 5 jours. Ce milieu synthétique permet d'optimiser la production de récepteurs recombinants et l'absence de sérum permet d'éviter la présence de protéines contaminantes.

Les surnageants de culture sont ensuite récoltés et purifiés sur colonne de protéine A, avec une pompe péristaltique. Pour un volume initial de 300 mL, la quantité de récepteurs recombinants obtenue est d'environ 1 mg. L'efficacité de la production et de la purification du DR4-Fc et du DR5-Fc a été vérifiée par western blot (figure 5.9). On peut voir sur cette figure un exemple de bonne production et purification. Un aliquot de chacune des étapes de la purification est prélevé, et la présence du fragment Fc humain (anti-hIg-HRP) ou du domaine extracellulaire des récepteurs (DR4 ou DR5) est analysée. On retrouve dans l'échantillon de départ (Ech.), correspondant au surnageant de culture, du DR5-Fc et du DR4-Fc en quantité un peu plus faible. Cette différence peut s'expliquer par une production plus efficace du DR5-Fc par rapport au DR4-Fc. Dans les deux cas, aucun récepteur ne se retrouve dans l'aliquot prélevé après le passage sur la colonne (FT) ou lors des étapes de lavages (Lv), indiquant que la totalité des récepteurs de fusion produits est retenue sur la colonne. On retrouve bien la présence de récepteurs de fusion DRs-Fc, uniquement à l'étape d'élution (El), où l'on voit clairement la présence de DR4-Fc et DR5-Fc, aux poids moléculaires respectifs d'environ 43 kDa et environ 55 kDa, encore plus visible après l'étape de concentration par Centricon. De plus, le western blot révèle bien que le fragment Fc et le domaine extracellulaire des DRs se trouvent au même poids moléculaire, démontrant que ces deux fragments sont encore liés et que le processus de production et de purification n'a pas altéré les récepteurs de fusions DR4-Fc et DR5-Fc.

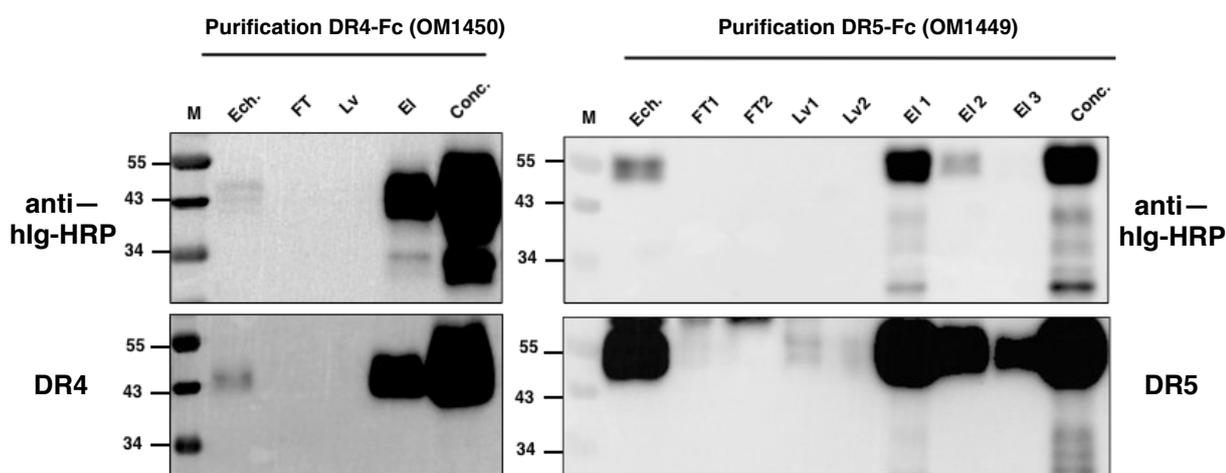


FIGURE 5.9 – Production et purification des récepteurs recombinants DR4-Fc et DR5-Fc. Ech (échantillon), FT (échantillon après le passage sur la colonne), Lv (lavage), El (élution), Conc (échantillon concentré par Centricon).

Clivage du fragment Fc des récepteurs recombinants

La partie constante (Fc) d'une immunoglobuline humaine est très immunogène chez la souris. Afin de ne pas produire d'anticorps anti-Fc, non-spécifiques de nos protéines d'intérêt, les rappels protéiques ont été effectués uniquement avec des protéines clivées, sans la majorité de la partie Fc. Pour cela, nous avons utilisé l'enzyme IdeZ (Promega), qui clive au niveau du motif GG au début de la séquence Fc (figure 5.10).

A

DR4-Fc **site de clivage d'IdeZ**

MAPPPARVHLGAFLAVTPNPGSAASGTEAAAATPSKVVWGSSAGRIEPRGGGRGALPTSMGQHGPS
ARARAGRAPGPRPAREASPRLRVHKTFFVVGVLQVVPSSAATIKLHDQSIGTQQWEHSPLGE
LCPGSHRSERPACNRCTEGVGNASNNLFACLPCTACKSDEEERSPCTTTRNTACQCKPGTFRN
DNSAEMCRKCTGCPRGMVKVDCTPWSIDIECVHKESGNGHNVDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

B

DR5-Fc **site de clivage de IdeZ**

EQRQONAPAASGARKRHGPGPREARGARPLRVPKTLVLVVAVLLVLSAESALITQQDLAPQQR
VAPQQKRSSPEGLCPPGHISEDGRDCISCKYQDYSTHWNDLLFCLRCTRCDSEVELSPCTT
TRNTVCQCEEGTFREEDSPEMCRKCRGTGCPRGMVKGVDCTPWSIDIECVHKESGTHKSGEAPAVE
ETVTSSPGTPASPCSLSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURE 5.10 – Site de clivage du fragment Fc des récepteurs de fusions DRs-Fc **A**. Séquence d'acide aminé du DR4-Fc, avec la partie correspondant au fragment Fc (surligné en marron) et le site de clivage de l'enzyme IdeZ (surligné en jaune) **B**. Séquence d'acide aminé du DR5-Fc, avec la partie correspondant au fragment Fc (surligné en marron) et le site de clivage de l'enzyme IdeZ (surligné en jaune)

Initialement destinée à cliver une immunoglobuline entre sa partie Fab et sa partie Fc, nous l'utilisons ici pour enlever la majeure partie du fragment Fc de nos protéines de fusion. Pour ce faire, les DRs-Fc sont fixés sur des billes A/G par leur partie Fc puis l'IdeZ est utilisée pour libérer le récepteur dans le surnageant. Les billes sont ensuite centrifugées et le surnageant récupéré contient le DR clivé (DR4c ou DR5c). Ici encore, un aliquot est prélevé à chaque étape et le clivage est vérifié par western blot. La figure 5.11 présente un exemple de clivage à partir d'un échantillon DR4-Fc et DR5-Fc.

La présence du domaine extracellulaire du DR4 ou du DR5 et du fragment Fc (anti-hFc-HRP) est retrouvée dans les échantillons DR4-Fc et DR5-Fc initiaux, avec un poids moléculaire de 40-55 kDa et de 55-60 kDa pour DR4 et DR5 respectivement. Après clivage, le surnageant des billes ne contient bien que DR4 clivé (environ 20 kDa) ou DR5 clivé (environ 30 kDa). Le fragment Fc, dont le poids moléculaire avoisine 30 kDa, reste accroché aux billes. Ce clivage permet donc d'obtenir efficacement un surnageant ne contenant plus que de la protéine clivée d'intérêt, sans partie Fc.

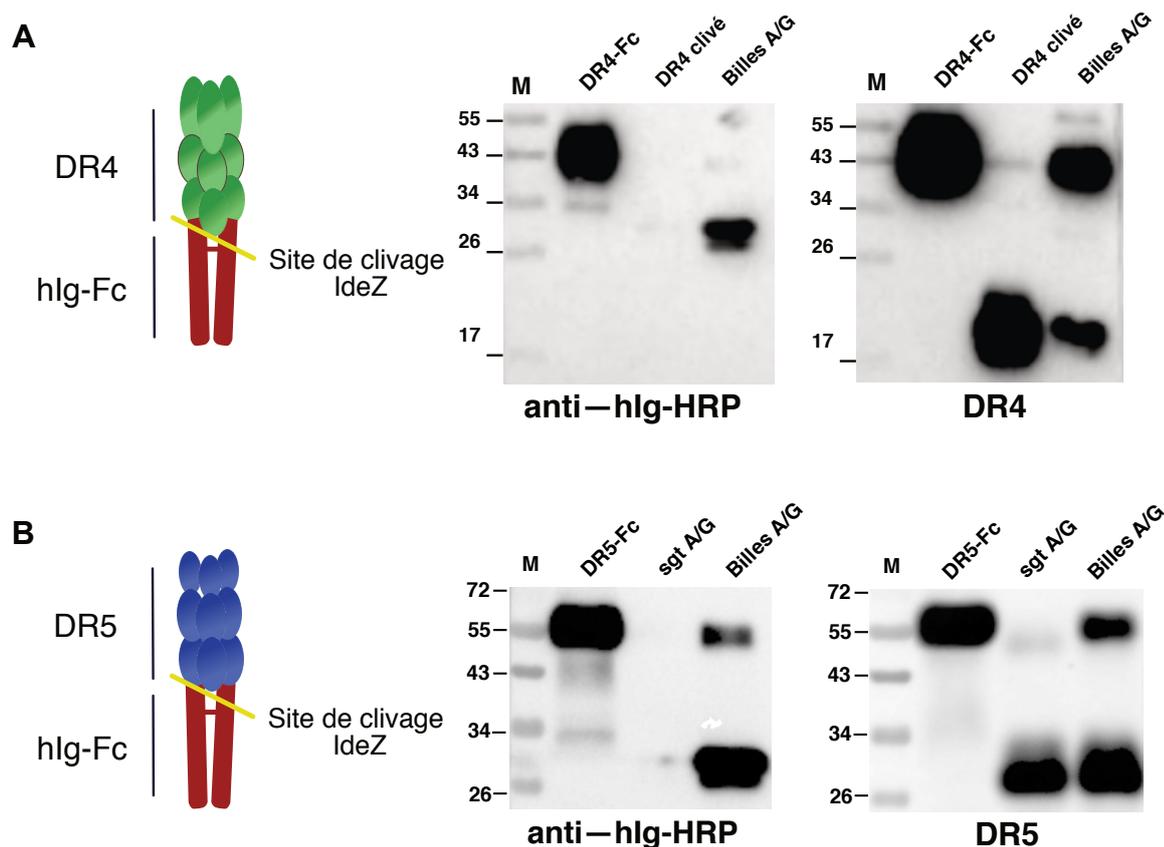


FIGURE 5.11 – Clivage du fragment Fc des récepteurs de fusions DRs-Fc **A.** Représentation schématique du site de clivage de l'enzyme IdeZ et résultats du western blot après clivage du DR4-Fc avec un anticorps secondaire reconnaissant la partie Fc (anti-hIg-HRP) et un anticorps reconnaissant la partie extracellulaire du DR4. **B.** Représentation schématique du site de clivage de l'enzyme IdeZ et résultats du western blot après clivage du DR5-Fc avec un anticorps secondaire reconnaissant la partie Fc (anti-hIg-HRP) et un anticorps reconnaissant la partie extracellulaire du DR5.

Validation des récepteurs recombinants

La capacité des récepteurs produits à se lier au ligand TRAIL humain (His-TRAIL), et donc leur fonction inhibitrice, a été testée *in-vitro* par un test de viabilité cellulaire. Ce ligand His-hTRAIL, produit au laboratoire, est fusionné à un fragment histidine pour le maintenir sous sa forme hexamérique fonctionnelle. La combinaison des récepteurs fusionnés (DRs-Fc) ou des récepteurs clivés (DRc) avec His-hTRAIL est évaluée par un test au bleu de méthylène sur la lignée colorectale HCT116, sensible au ligand soluble (figure 5.12). L'induction de l'apoptose par le ligand TRAIL dans les cellules HCT116 est bloquée par l'addition des récepteurs solubles. Tout d'abord, concernant les DR-Fc (figure 5.12(a)), la combinaison du ligand His-hTRAIL avec DR4-Fc ou DR5-Fc rétablit la viabilité cellulaire à 100 % jusqu'aux concentrations intermédiaires de 1 µg/mL. Pour les DRc (figure 5.12(b)), DR4c inhibe l'effet du His-hTRAIL, même à faible concentration (100 ng/mL). L'ajout de DR5c soluble, quant à lui, semble moins efficace mais permet tout de même de diminuer considérablement la mort des cellules cancéreuses aux concentrations les plus

fortes. Ces résultats pourraient s'expliquer par la trop forte concentration de TRAIL utilisée. Il aurait peut être été préférable d'utiliser une concentration plus faible de TRAIL pour tester le potentiel inhibiteur du récepteur DR5 soluble produit, comme par exemple 250 ng/mL, la concentration utilisée pour tester les récepteurs solubles chimériques fusionnés au Fc. Une autre explication possible peut être la sensibilité des cellules HCT116 à l'apoptose induite via DR4 ou DR5. Comme énoncé plus tôt, l'équipe a démontré que DR4 induit une apoptose plus forte que DR5 sur les HCT116 [Dufour et al., 2017a]. Dans cette expérience, DR5 n'a peut être pas lié tout le TRAIL disponible. Une quantité résiduelle a donc pu se fixer au DR4 membranaire des cellules HCT116, induisant leur mort cellulaire. On peut aussi imaginer que le système étant dynamique, TRAIL peut aller se fixer à la fois sur DR5-Fc ou DR5c puis se fixer sur les récepteurs membranaires et induire la cytotoxicité observée. Une autre explication pourrait résider dans la conformation finale du DR5c. L'affinité du DR5c avec le ligand peut être diminuée, entraînant une interaction entre les deux moins stable. Il faut noter que cette expérience n'a été effectuée qu'une seule fois, il faudrait donc la réitérer au moins deux fois afin de valider ces résultats. Néanmoins, l'effet dose des récepteurs est assez clair. L'ajout de ces récepteurs impacte l'action de TRAIL sur les cellules HCT116. Les récepteurs recombinants produits ont donc bien la capacité de fixer his-hTRAIL soluble et de l'empêcher de se fixer aux récepteurs endogènes présents sur les cellules HCT116, neutralisant son action sur ces cellules. En fixant le TRAIL soluble, les récepteurs se rapprochent donc de leur conformation native et peuvent être utilisés comme rappels lors des immunisations ADN.

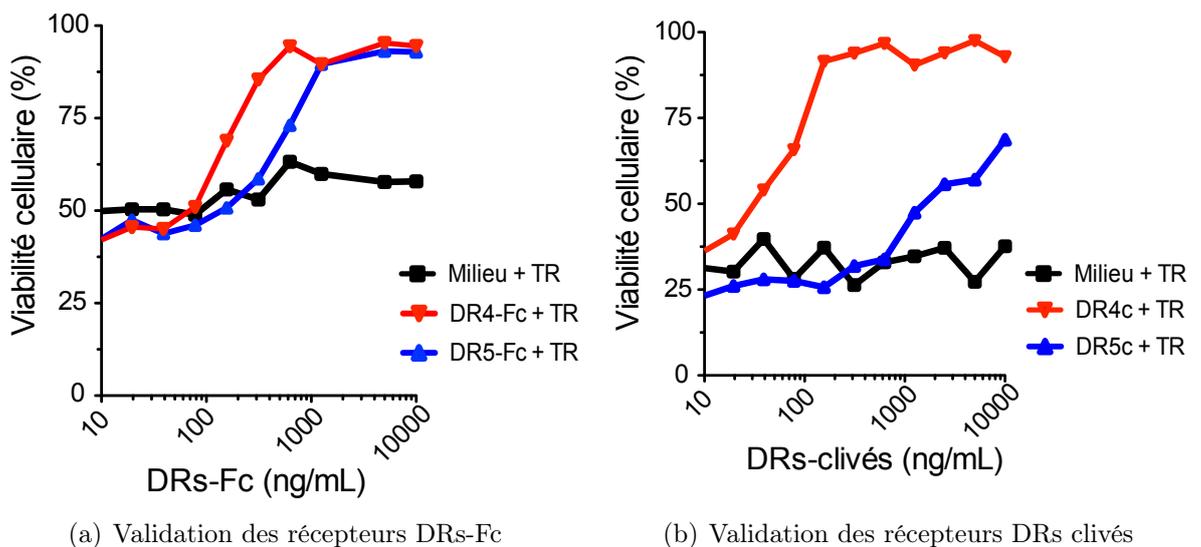
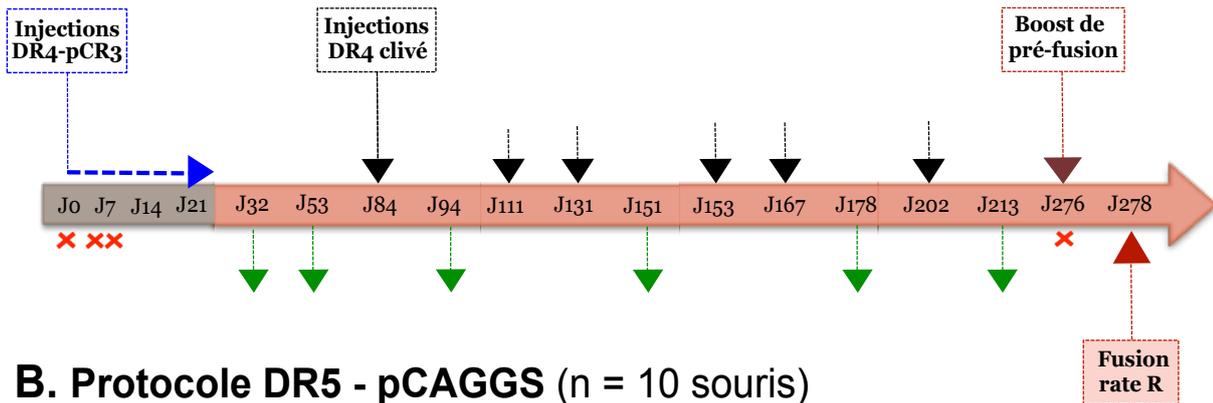


FIGURE 5.12 – Test au bleu de méthylène sur la lignée colorectale HCT116-WT. Les récepteurs DRs-Fc sont testés en combinaison avec une concentration stable de TRAIL à 250ng/mL. Les récepteurs DRs clivés sont testés en combinaison avec une concentration stable de TRAIL à 500ng/mL.

5.2 Protocoles expérimentaux

Dans le but d'obtenir des anticorps dirigés contre la forme native de DR4 et DR5, des souris Balb/c ont été immunisées par ADN. Les immunisations ADN de souris Balb/c ont été effectuées grâce aux savoir-faire de l'entreprise CovalAb et sur la base de la publication de Hazen *et al*, à savoir au moins 4 injections d'ADN de 50 µg d'ADN d'intérêt et 2,5 µg d'un vecteur contenant le GMCSF. Pour rappel, les plasmides sont mélangés avec du sérum physiologique stérile, dans un volume final correspondant à 10% du poids de la souris. L'injection dans la veine caudale en moins de 8 secondes et la dynamique de fluide permettent un passage à la veine cave puis au foie, pour une intégration de l'ADN dans les cellules hépatiques et donc une expression native des récepteurs. Ceci permettrait d'obtenir des anticorps reconnaissant la forme native et endogène des récepteurs DR4 et DR5. Les injections ont été effectuées en collaboration avec CovalAb, selon les protocoles schématisés dans la figure 5.13.

A. Protocole DR4 - pCR3 (n = 5 souris)



B. Protocole DR5 - pCAGGS (n = 10 souris)

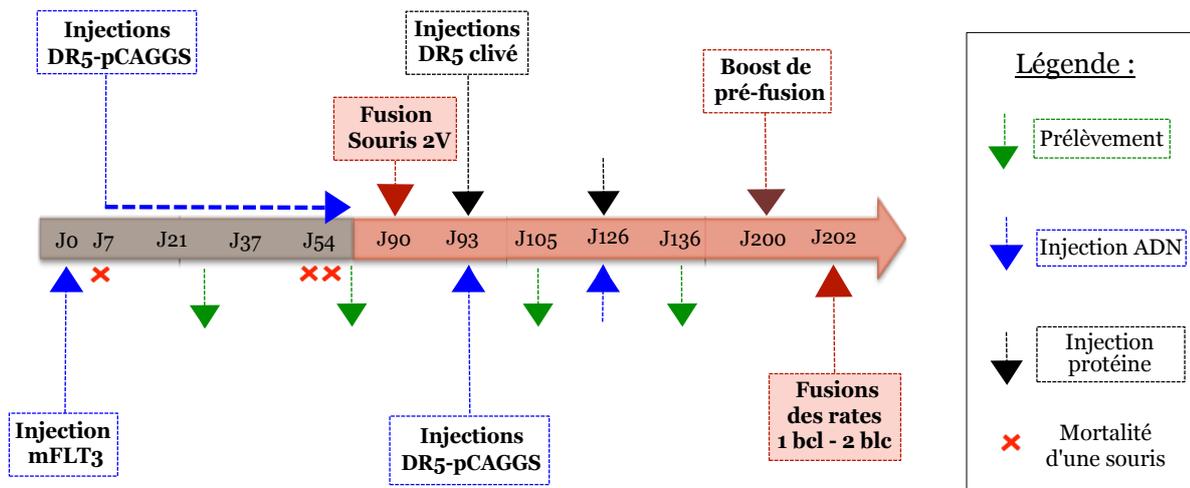


FIGURE 5.13 – Schémas des immunisations ADN **A.** Protocole des immunisations par DR4-pCR3 sans injection préalable de mFLT3 **B.** Protocole des immunisations par DR5-pCAGGS avec injection préalable de mFLT3.

5.2.1 Schémas d'immunisations ADN

Pour les **immunisations DR4**, 4 injections de 50 µg de DR4-pCR3 (OM319) et de 2.5 µg de GMCSF-pCR3 (OM1438) ont été effectuées en i.v. tous les 7 jours pendant 1 mois (partie grisée de la frise figure 5.13 A). J0 représentant la première injection, les souris ont été immunisées par DR4-pCR3 à J0, J7, J14 et J21. À la suite de ces injections ADN, les souris ont reçu 6 rappels protéiques classiques de 20 µg de DR4 clivé en sous-cutané, environ 1 fois par mois, selon un protocole précis propre à la société CovalAb (partie orange). L'immunisation ADN a été d'abord mise en place avec l'immunisation DR4. Le procédé n'était pas encore optimisé et nous avons observé une mortalité importante des souris. Ainsi pour ce protocole DR4-pCR3, alors que nous avions 5 souris au départ, trois sont mortes avant les 4 injections d'ADN (souris V, N et Blc) et une est morte le jour du rappel de pré-fusion (souris B). Nous ne pouvons pas expliquer la mort soudaine de la souris B. Elle a reçu les mêmes rappels protéiques que la souris R et a été manipulée de la même façon. Le procédé l'a peut être plus sensibilisée que la souris R. À la fin de ce protocole, la souris R reste donc la seule survivante (table 5.1).

TABLE 5.1 – **Tableau récapitulatif des injections par souris lors des immunisations DR4-pCR3.** + : la souris a été injectée, / : la souris ne devait pas être injectée, **oui** : la rate correspondante a été fusionnée, **c** : les splénocytes de la rate correspondante ont été congelés, cellule grise : la souris est morte.

		Immunisation DR4				
Souris		R	V	B	N	Blc
mFLT3 ADN		/	/	/	/	/
Injections DR4 ADN (+GMCSF)	n°1	+	+	+	+	+
	n°2	+	+	+	+	
	n°3	+		+		
	n°4	+		+		
Rappels ADN		/		/		
Rappels protéiques		+		+		
Rappel pré-fusion		+		+		
Fusion		oui				

Pour les **immunisations DR5**, le protocole d'immunisation a été optimisé en développant les plasmides pCAGGS, qui permettent d'effectuer des injections plus espacées dans le temps (toutes les deux semaines au lieu de toutes les semaines pour l'utilisation de plasmides pCR3). Pour ce protocole, une primo-immunisation de 10 µg de mFLT3-pCAGGS a été effectuée à J0 afin de stimuler le système immunitaire des souris.

À la suite de quoi, 4 injections de 50 µg de DR5-pCAGGS et de 2.5 µg de GMCSF-pCAGGS ont été réalisées (partie grisée de la frise figure 5.13 B). Ici encore, les injections ont été effectuées en i.v., mais cette fois-ci tous les 14 jours, pendant 2 mois. Les souris ont ainsi été immunisées par DR5-pCAGGS à J7, J21, J37 et J54. Pour ce protocole DR5-pCAGGS, la perte a été minimisée avec la pratique puisque seulement trois souris sur 10 (souris 1N, 2R et 2N) n'ont pas survécu aux 4 injections DR5 ADN (table 5.2). À ce stade la souris répondant le mieux (souris 2V) a été sélectionnée pour une première fusion (voir partie 5.2.2). Les 6 souris restantes ont ensuite été séparées en 2 groupes de trois souris randomisées : un premier groupe recevant deux rappels géniques de 50 µg de DR5-pCAGGS et 2.5 µg de GMCSF-pCAGGS à J93 et J126 (souris 1V, 1B et 1Bc), et le second recevant deux rappels protéiques de 20 µg de DR5 clivé également à J93 et J126 (souris 1R, 2B et 2Bc) (partie orange de la frise).

TABLE 5.2 – **Tableau récapitulatif des injections par souris lors des immunisations DR5-pCAGGS.** + : la souris a été injectée, - : la souris devait être injectée mais ne l'a pas été, / : la souris ne devait pas être injectée, **oui** : la rate correspondante a été fusionnée, **c** : les splénocytes de la rate correspondante ont été congelés, cellule grise : la souris est morte.

		Immunisation DR5									
Souris		1R	1V	1B	1N	1Bc	2R	2V	2B	2N	2Bc
mFLT3 ADN		+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Injections DR5 ADN (+GMCSF)	n°1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	n°2	+	+	+	+	+		+	+	+	+
	n°3	+	+	+	+	+		+	+	+	+
	n°4	+	+	+	+	+		+	+	+	+
Rappels ADN		/	+	+		+		/	/		/
Rappels protéiques		+	/	/		/		/	+		+
Rappel pré-fusion		+	+	+		+		+	+		+
Fusion		c	c	c		oui		oui	c		oui

5.2.2 Suivi de la réponse immunitaire et fusions

L'évolution de la réponse humorale anti-DR4 et anti-DR5 a été surveillée tout au long des immunisations par prélèvements sanguins effectués 10 jours après injection.

Suivi de la réponse immunitaire

L'efficacité de l'immunisation est évaluée par un test ELISA sur les sérums des souris (figure 5.14). Concernant l'immunisation DR4, l'efficacité a été évaluée après la dernière

injection d'ADN, à J32 et à J53, puis tout au long de l'immunisation protéique DR4 clivé. Pour l'immunisation DR5, l'efficacité a été évaluée après la 2ème injection d'ADN (J31), après les 4 injections d'ADN (J64), puis après chaque rappel. La figure 5.14 présente l'évolution des titres du sérum de la seule souris survivante R, pour le protocole DR4-pCR3, et l'évolution moyenne des titres des sérums des 6 souris ayant suivi l'intégralité du protocole d'immunisation DR5-pCAGGS (à savoir 1R, 1V, 1B, 1Blc, 2B et 2Blc).

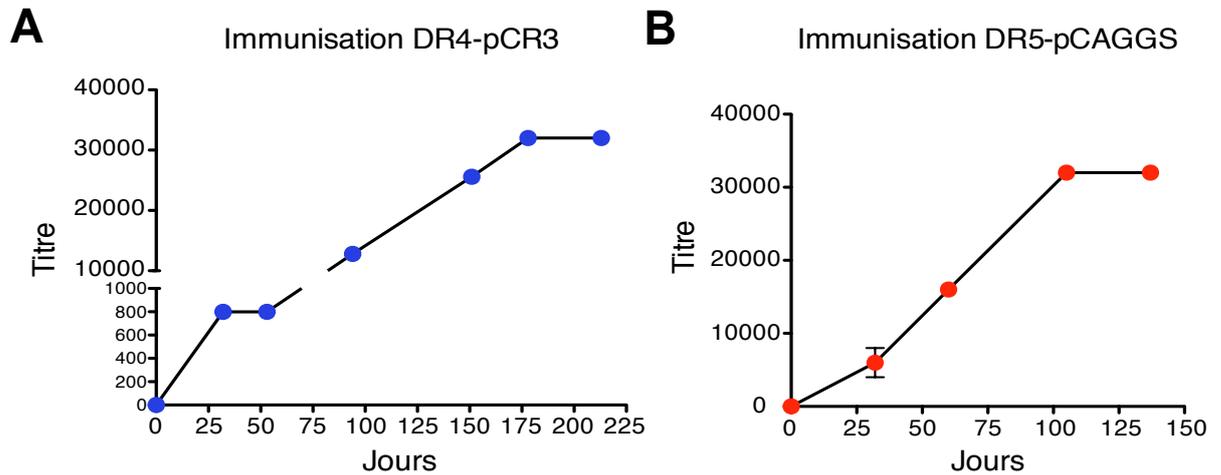


FIGURE 5.14 – Suivi de la réponse humorale au cours des immunisations **A.** Évolution du titre au cours de l'immunisation par DR4-pCR3 de la seule souris survivante R **B.** Évolution du titre au cours de l'immunisation DR5-pCAGGS. Moyenne sur les 6 souris d'intérêt ayant suivi l'intégralité du protocole d'immunisation DR5-pCAGGS : 1R, 1V, 1B, 1Blc, 2B, 2Blc.

L'évaluation de l'immunoréactivité se faisant généralement comme suit, on peut considérer avoir obtenu une bonne immunoréactivité lorsque le titre est supérieur à 800 :

- Titre < 200 : absence d'immunoréactivité
- 200 < Titre < 800 : faible immunoréactivité
- 800 < Titre < 3200 : bonne immunoréactivité
- 3200 < Titre : très bonne immunoréactivité

Les titres obtenus après seulement 4 injections d'ADN, quel que soit le schéma d'immunisations, sont très encourageants avec des titres représentant une bonne immunoréactivité pour l'immunisation DR4 (titre de 800) et une excellente immunoréactivité pour l'immunisation DR5 (titre de 8000) (figure 5.14 A et B). On observe également que le titre de l'immunisation DR4 est significativement augmenté lors des rappels protéiques, atteignant même un titre de 32000 à la fin de l'immunisation. Le titre pour les souris immunisées par DR5-pCAGGS augmente également, indépendamment du type de rappel utilisé. A la fin des immunisations, tous les titres atteignent environ 32 000.

Bien que l'analyse des titres après les 4 immunisations ADN montre un titre plus fort pour les sérums des souris immunisées avec DR5-pCAGGS, les deux schémas d'immunisation permettent d'obtenir des titres finaux d'excellente immunoréactivité. Néanmoins,

les schémas d'immunisations et les récepteurs utilisés étant différents, il n'est pas possible de déterminer quelle est la meilleure immunisation. Nous pouvons toutefois confirmer que ces immunisations ADN ont permis l'expression des récepteurs à la surface des cellules murines et l'induction efficace d'une production d'anticorps spécifiques du DR4 et du DR5.

Sélection des souris et fusions

Pour l'immunisation DR4, la souris R étant la seule survivante, il n'y a eu qu'une rate DR4-pCR3 fusionnée. Concernant le protocole DR5-pCAGGS, les sérums des 7 souris survivantes ont été testés par Dot Blot et cytométrie en flux (figure 5.15).

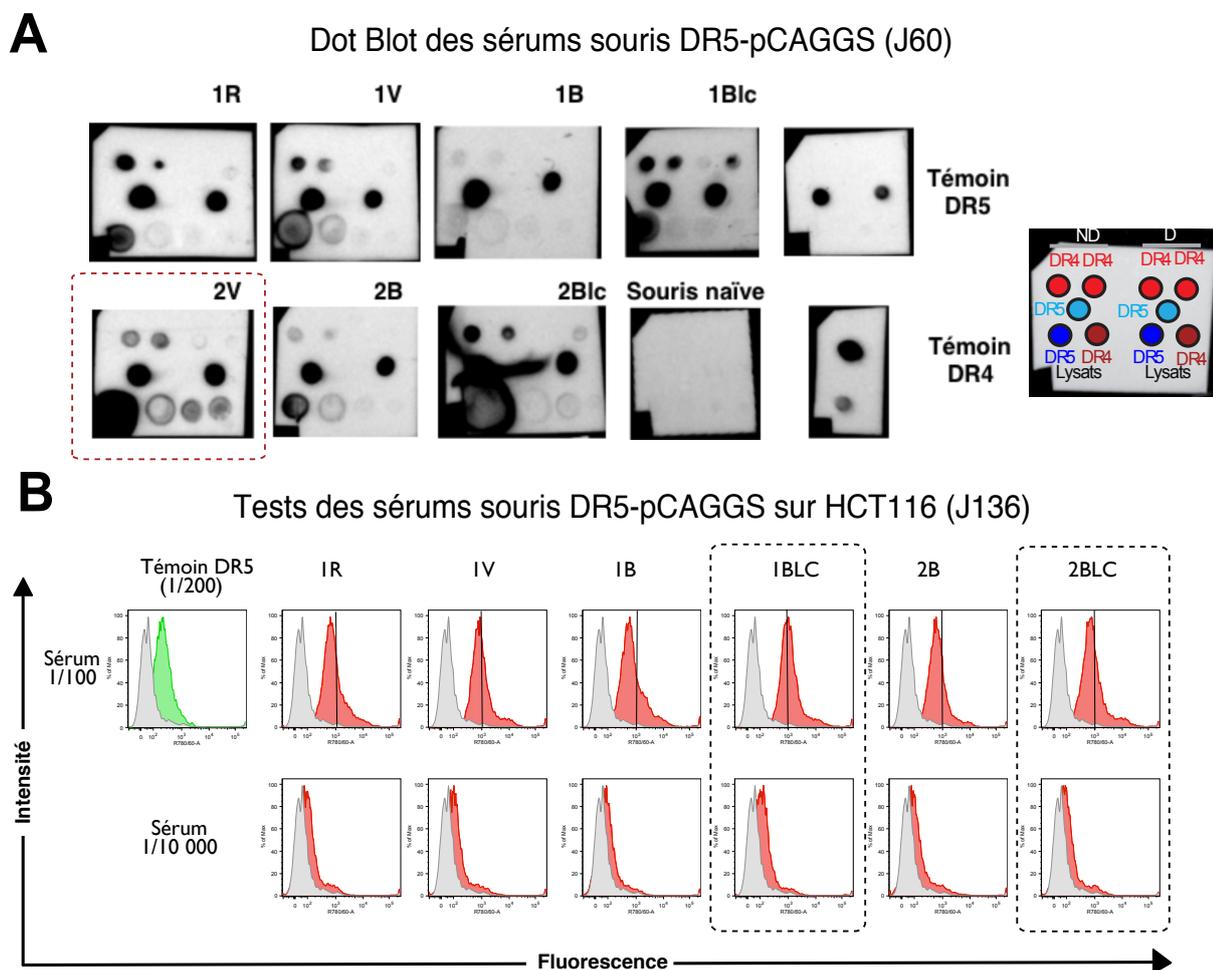


FIGURE 5.15 – Sélection des souris en vue d'une fusion de rate post-immunisation DR5-pCAGGS **A**. Résultats de l'analyse Dot Blot des sérums des souris immunisées par le DR5-pCAGGS dilués au 1/1000 et sélection de la souris 2V. La révélation se fait via un anticorps secondaire anti-souris IgG (H + L) - HRP. ND : non dénaturé, D : dénaturé **B**. Analyse par cytométrie en flux des sérums de souris et sélection de deux souris d'intérêt 1Blc et 2Blc.

Le sérum des 7 souris survivantes aux 4 injections ADN DR5-pCAGGS (J60) a été testé par Dot Blot. Les résultats sont présentés sur la figure 5.15 A. Les contrôles po-

sitifs (témoin DR5 et DR4) ainsi que négatif (souris naïve non immunisée) ont permis de confirmer la spécificité du marquage. Ici, la souris 2V a présenté la réponse la plus forte, c'est-à-dire celle qui est capable de reconnaître DR5 clivé et DR5 présents dans les lysats cellulaires, en ne reconnaissant que faiblement DR4 clivé. La souris 2V a donc été sélectionnée pour l'étape de fusion après les 4 injections ADN DR5-pCAGGS. À l'issue de tous les rappels (J136), les sérums des 6 souris restantes ont été analysés par cytométrie en flux. Les résultats de l'analyse des sérums et la sélection des souris d'intérêt à la fin du protocole DR5 sont présentés dans la figure 5.14 B. Les souris présentant le marquage le plus positif, c'est-à-dire l'histogramme le plus décalé sur la droite par rapport à l'histogramme contrôle (en gris), ont été choisies. Ainsi, une souris de chaque groupe de rappels (souris 1blc et 2blc) a été sélectionnée pour l'étape de fusion.

En conclusion, à la fin de ces deux protocoles d'immunisations, une rate provenant de l'immunisation DR4-pCR3 et trois rates correspondantes aux trois souris de l'immunisation DR5-pCAGGS sélectionnées ont été prélevées pour l'étape de fusion : une rate à l'issue des 4 injections de pCAGGS-DR5 et deux rates provenant de souris immunisées par DR5-pCAGGS ayant reçu soit des rappels protéiques, soit des rappel ADN.

5.3 Criblage des hybridomes obtenus par ELISA, Dot Blot et FACS

Les fusions, le maintien des hybridomes et les tests ELISA ont été effectués en collaboration avec CovalAb.

Après trois semaines de culture, les surnageants des hybridomes contenant des anticorps ont été criblés afin de tester leur capacité à se lier spécifiquement à leur cible recombinante et endogène. Les surnageants des puits contenant des hybridomes visibles à l'œil nu ont d'abord été testés par ELISA. Les clones capables de reconnaître leur cible respective ont ensuite été transférés dans des plaques de 24 puits. Après une à deux semaines, le surnageant des hybridomes a été retesté par ELISA afin d'éliminer les clones ayant perdu leur sécrétion. Le surnageant des clones positifs a été récolté et testé par Dot Blot et cytométrie en flux (ou FACS) pour leur capacité à reconnaître spécifiquement la cible conformationnelle endogène.

5.3.1 Criblage des clones anti-DR4 et anti-DR5 par tests ELISA

Pour ces tests, le marquage est considéré positif lorsque la densité optique (DO) observée sur DR-Fc et DRc ciblé (DR4-Fc et DR4c pour les hybridomes DR4 ; et DR5-Fc et DR5c pour les hybridomes DR5) est supérieure à 0,3. Un exemple des résultats des tests ELISA obtenus après chaque fusion est présenté dans l'annexe C.

Hybridomes DR4

Pour les surnageants d'hybridomes DR4 issus de la fusion de la souris R, plus d'une centaine de puits d'hybridomes a été testée par ELISA. Parmi eux, plus de la moitié a montré une DO supérieure à 0,3 sur DR4-Fc et DR4c. Finalement, seulement une trentaine a gardé sa capacité à sécréter des anticorps. Parmi eux, 17 clones se sont avérés positifs par cytométrie en flux (voir 5.3.2). La figure 5.16, présente les résultats ELISA de ces 17 hybridomes (barres bleues).

Hybridomes DR5

Les trois fusions des souris DR5 ont généré moins de clones positifs. La figure 5.16, présente les résultats des 4 surnageants d'hybridomes sélectionnés (barres rouges) après criblage par ELISA, FACS et Dot Blot (voir 5.3.2). La première fusion (souris 2V) a permis d'isoler une trentaine d'hybridomes par ELISA. Mais seulement 4 ont pu être testés par FACS, parmi lesquels un clone (C#21) s'est avéré être positif par FACS. La fusion à partir de la souris ayant reçue des rappels ADN (souris 1Blc) n'a généré qu'une dizaine de clones positifs, mais cette fois-ci très peu ont perdu leur sécrétion. Parmi eux, 3 surnageants d'hybridomes ont démontré leur capacité à reconnaître le récepteur endogène (C#22, C#23, C#24). Enfin, la fusion de la souris aux rappels protéiques (souris 2Blc) est celle qui a donné le moins de résultats : une dizaine clones transférés en 24 puits mais aucun clone n'a été finalement sélectionné.

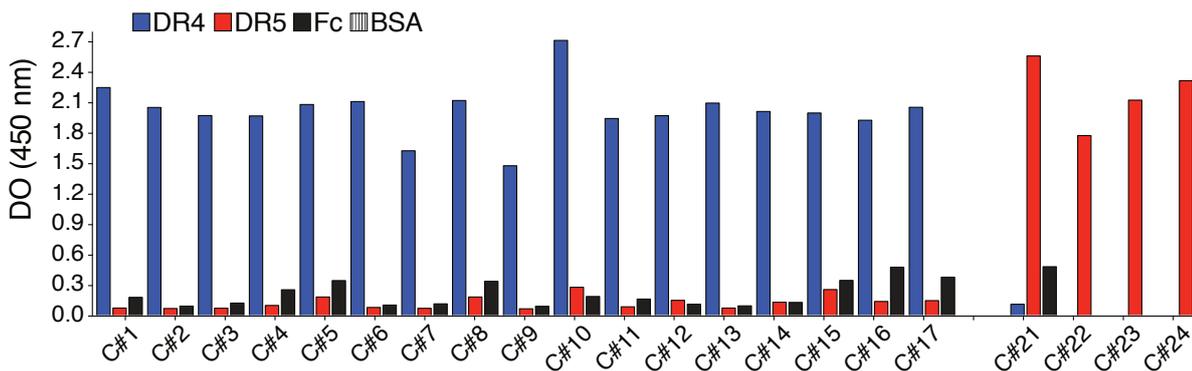


FIGURE 5.16 – Résultats ELISA des surnageant d'hybridomes sélectionnés anti-DR4 et anti-DR5. Les hybridomes DR4 ont été obtenus après fusion de la rate R, et les hybridomes DR5 proviennent de l'ensemble des trois rates fusionnées. Le surnageant des hybridomes a été dilué de moitié et testé sur DR4-Fc, DR4c, DR5c, Fc et BSA. Les échantillons sont considérés comme positifs lorsque la densité optique est supérieure à 0,3. L'AcM-C#21 provient de la fusion de la rate 2V, les AcM-C#22, -C#23 et -C#24 proviennent de la fusion de la rate 1Blc et aucun hybridome de la fusion 2Blc n'a été sélectionné.

5.3.2 Reconnaissance des DR4 et DR5 conformationnels

L'ensemble des surnageants d'hybridomes sélectionnés par ELISA a ensuite été testé pour leur capacité à reconnaître et fixer les récepteurs endogènes présentés sous leur forme native conformationnelle.

Hybridomes DR4

Pour les surnageants d'hybridomes DR4, le test par cytométrie en flux a permis de sélectionner 17 clones positifs. Les résultats de l'analyse par cytométrie en flux sont présentés sur la figure 5.17 A. Sur cette figure les surnageants anti-DR4 sélectionnés (histogramme rouge) sont comparés à l'isotype témoin (histogramme gris). Le décalage entre le pic témoin et le pic des hybridomes démontre la capacité des surnageants sélectionnés à reconnaître le récepteur présent à la surface des cellules. La reconnaissance avec les différents récepteurs recombinants, dénaturés ou non, a été déterminée par Dot Blot. Cette méthode consiste à adsorber les protéines recombinantes d'intérêt sur une membrane de nitrocellulose. Après saturation, les surnageants ont été incubés puis révélés avec un anticorps secondaire anti-mouse IgG(H+L)-HRP. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 5.17 B. Ici encore nous pouvons voir que les surnageants ont fixé DR4 non dénaturé et que la majorité d'entre eux n'a pas fixé DR4 dénaturé ou DR5. Ces hybridomes semblent donc être spécifiques de DR4 présenté sous une forme proche de sa conformation native.

Hybridomes DR5

Dans un souci de gain de temps, les surnageants d'hybridomes DR5 ont été testés directement par cytométrie en flux. Le même protocole a été utilisé, à la différence que les cellules utilisées sont les MDA-MB-231 dépourvues des deux récepteurs agonistes de TRAIL (MDA DKO) et les MDA-MB-231 isogéniques DKO reconstituées avec DR5 (DKO-DR5^{rec}) [Dufour et al., 2017a]. Les résultats des hybridomes sélectionnés sont présentés dans la figure 5.18. Les surnageants d'hybridomes ne présentent pas de marquage sur les cellules MDA-MB-231 DKO mais uniquement sur les cellules MDA-MB-231 DKO-DR5^{rec}. Sur ces cellules, on peut voir un décalage entre l'isotype témoin (histogramme gris) et les surnageants anti-DR5 (histogramme rouge). Les 4 clones sélectionnés ont donc démontré leur capacité à reconnaître et à se lier spécifiquement au DR5 natif exprimé à la surface des cellules MDA-MB-231 DKO-DR5^{rec}.

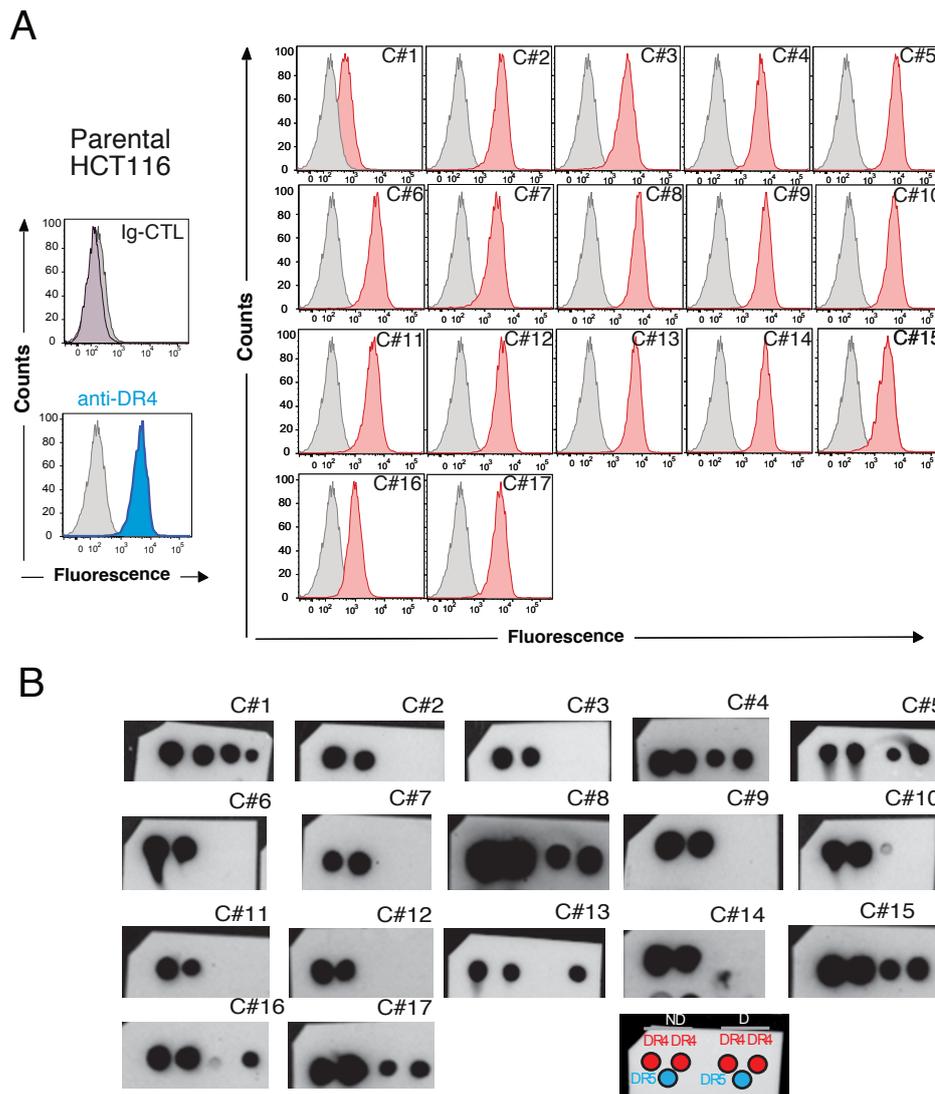


FIGURE 5.17 – Criblage des surnageants d'hybridomes anti-DR4 et anti-DR5 **A.** Analyse par cytométrie en flux des surnageants des anti-DR4 sélectionnés (courbe rouge) comparés à l'isotype témoin (courbe grise). Les surnageants d'hybridomes sont détectés en utilisant un anticorps secondaire anti-souris IgG (H + L) conjugué au fluorochrome AF488 **B.** Résultats de l'analyse Dot Blot des surnageants anti-DR4. La révélation se fait via un anticorps secondaire anti-souris IgG (H + L) - HRP. ND : non dénaturé, D : dénaturé.

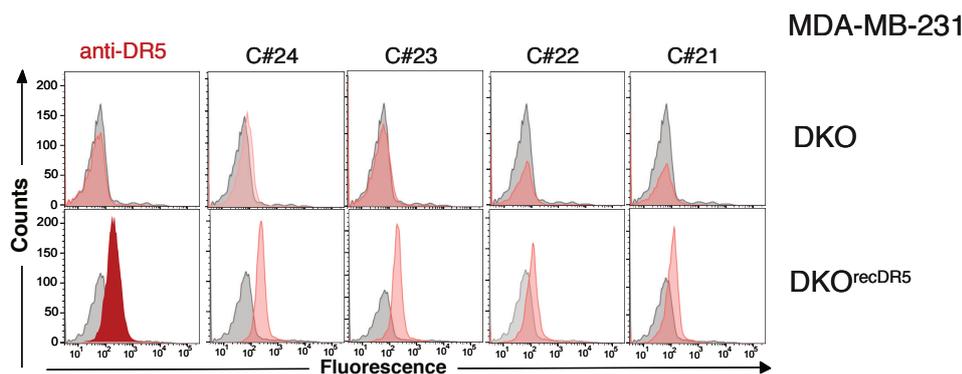


FIGURE 5.18 – Criblage des surnageants d’hybridomes anti-DR5. Analyse par FACS des surnageants anti-DR5 sélectionnés (courbe rouge) comparés à l’isotype témoin (courbe grise) sur les cellules MDA-MB-231 DKO et MDA-MB-231 DKO-DR5^{rec}. Les surnageants d’hybridomes sont détectés par un anticorps secondaire anti-souris IgG (H + L) - AF488.

Synthèse

Encore une fois, il n’est pas possible de comparer les résultats des immunisations DR4-pCR3 et DR5-pCAGGS, les schémas d’immunisations et les plasmides n’étant pas les mêmes. Concernant le choix des rappels protéiques ou ADN pour l’immunisation DR5, il semblerait qu’avec le schéma d’immunisation utilisé ici, les rappels ADN permettent d’obtenir davantage de clones reconnaissant la forme native du DR5. Cependant, le nombre limité de souris dans l’étude ne permet pas de démontrer l’efficacité d’un schéma par rapport à un autre. Il faudrait réitérer l’expérience avec un nombre plus important de souris, et plusieurs fois, afin de pouvoir établir une conclusion définitive.

5.3.3 Production des 21 anticorps d’intérêt

Le criblage des hybridomes issus des 4 fusions a ainsi permis d’isoler 17 hybridomes anti-DR4 et 4 hybridomes anti-DR5 présentant des caractéristiques de liaison intéressantes avec leur récepteur natif. Ces clones ont tous démontré la capacité de reconnaître leur cible sous forme recombinante non-dénaturée et endogène. Ils pourraient donc tous présenter des caractéristiques fonctionnelles intéressantes.

Afin de pouvoir tester et caractériser ces clones, il a été nécessaire de produire et de purifier les 21 anticorps monoclonaux correspondants. Ces étapes ont été effectuées en collaboration avec CovalAb, selon une méthodologie propre à la société CovalAb.

Chapitre 6

Caractérisation des anticorps monoclonaux ciblant DR4 et DR5

Après la sélection des hybridomes d'intérêt, 21 anticorps monoclonaux ont été obtenus sous forme purifiée, de concentration connue. Le chapitre ci-dessous présente les tests caractéristiques et fonctionnels de ces anticorps.

6.1 Caractérisation des anticorps purifiés

En premier lieu, il a fallu étudier les profils de liaison des 21 anticorps anti-DR4 et anti-DR5 produits. Le titre de chaque anticorps a été évalué par test ELISA et la reconnaissance des récepteurs recombinants dénaturés ou non a été déterminée par Dot Blot. La capacité des anticorps à reconnaître les récepteurs endogènes et leur sélectivité vis-à-vis des autres récepteurs a été analysée par cytométrie en flux.

6.1.1 Reconnaissance des récepteurs non dénaturés

De la même façon que la reconnaissance du DR4 et du DR5 a été vérifiée tout au long du processus de criblage des hybridomes, la première étape de la caractérisation des anti-DR4 et anti-DR5 produits a consisté à étudier leur spécificité de liaison pour le récepteur recombinant non dénaturé.

Le test ELISA permet non seulement de confirmer la liaison des anticorps à leur cible respective, mais permet également de déterminer leur titre. Le titre d'un anticorps représente généralement sa concentration. Ici, il est utilisé afin de déterminer la concentration minimum permettant d'obtenir un résultat positif (une DO > 1). Pour ce faire, une série de dilutions de l'anticorps a été testée sur une concentration fixe de DR4 et DR5 recombinant. Une bonne réactivité immunitaire est obtenue lorsque l'anticorps titre à une concentration ≤ 100 ng/ μ L. Comme démontré par ELISA, 19 des 21 hybridomes ont produit des anticorps présentant une réactivité immunitaire bonne à excellente avec des titres

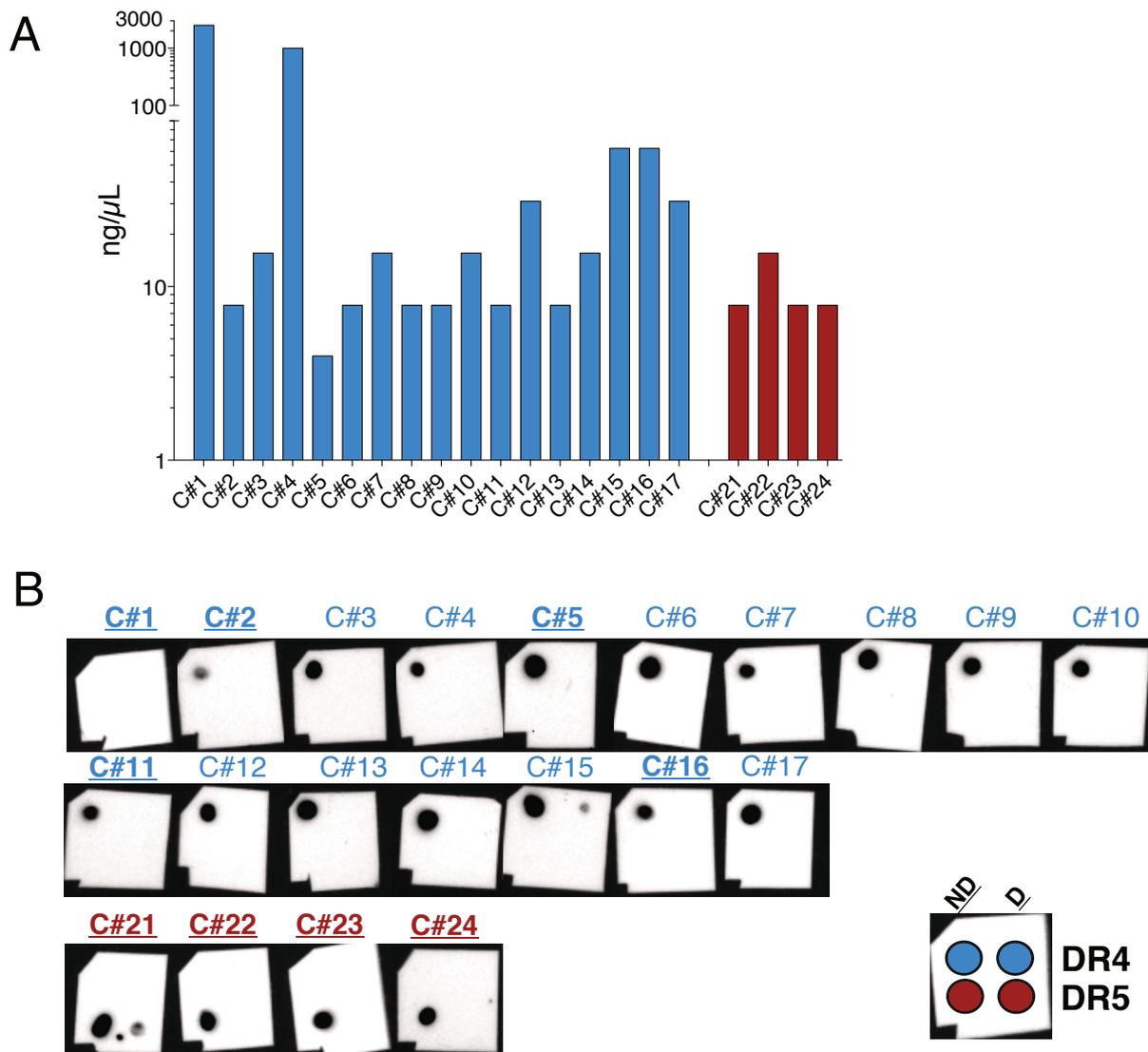


FIGURE 6.1 – Résultats ELISA et Dot Blot des anticorps anti-DR4 et anti-DR5 produits
A. ELISA des anticorps anti-DR4 (barre bleue) et anti-DR5 (barre rouge) produits. Les anticorps purifiés ont été dilués en cascade à partir de 500 ng/mL et testés sur DR4 ou DR5. Le titre correspond à la dernière dilution avec un DO ≥ 1 . La concentration la plus faible représente donc le meilleur titre. **B.** Reconnaissance des anticorps de la forme non dénaturée (ND, à gauche) et dénaturée (D, à droite) de cDR4 (au-dessus) et de cDR5 (au-dessous) recombinants a été évaluée par Dot Blot. 150 ng/ μ L de cDR4 et de cDR5 ont été dénaturés en utilisant 10% de DTT 1M (dithiothréitol) et chauffés à 95 °C pendant 5 min. 1 μ L de protéines recombinantes non-dénaturées et dénaturées ont été adsorbée à une membrane de nitrocellulose. Après blocage avec du lait, 1 μ g/mL d'anticorps purifié a été ajouté et, après une liaison secondaire par un IgG (H + L) - HRP (1/10 000) anti-souris, la reconnaissance a été évaluée par chimioluminescence.

allant de 4 à 80 ng/ μ L (figure 6.1 A). Aucun des anticorps ne s'est fixé sur le fragment Fc seul ou sur la BSA (titres > 1 μ g/ μ L).

Le Dot Blot présente quant à lui la liaison des anticorps envers DR4 et DR5 recombinants dénaturés ou non avec le DTT (dithiothréitol). Les résultats présentés sur la figure 6.1 B indiquent que tous les anticorps générés par l'approche ADN, à part C#1, ont re-

connu spécifiquement la forme native de la cible protéique. En outre, les anticorps n'ont reconnu que leur cible respective, sans croiser sur l'autre DR (les anti-DR4 ne reconnaissent pas DR5 et les anticorps anti-DR5 ne reconnaissant pas DR4). Cette expérience a montré que la plupart des anticorps produits sont spécifiques du récepteur recombinant ciblé non dénaturé, donc très probablement de sa forme native endogène.

6.1.2 Spécificité des anticorps

Afin de confirmer la spécificité des anticorps produits, la reconnaissance envers les récepteurs endogènes a été évaluée par cytométrie en flux. Les anticorps ont tous été analysés sur quatre lignées cellulaires différentes : les MDA-MB-231 parentales (WT), les MDA-MB-231 DKO (DKO), déficientes pour les deux récepteurs DR4 et DR5, ainsi que les cellules isogéniques DKO reconstituées avec DR4 (DKO-DR4^{rec}), n'exprimant que DR4, ou DR5 (DKO-DR5^{rec}) exprimant uniquement DR5. Une immunoglobuline contrôle a été utilisée et n'a pas démontré de marquage sur les quatre lignées (figure 6.2). Comme le montre la figure, les 17 anticorps anti-DR4 et les 4 anticorps anti-DR5 présentent tous un marquage positif sur les cellules MDA-MB-231 WT et la liaison détectée à la surface des cellules MDA-MB-231 DKO est nulle. Le marquage sur les cellules isogéniques DKO-DR4^{rec} et DKO-DR5^{rec} permet de mieux caractériser la liaison des anticorps envers chacun des récepteurs DR4 et DR5. La spécificité des anticorps a donc été évaluée par rapport aux marquages sur les cellules isogéniques DKO-DR4^{rec} et DKO-DR5^{rec}.

La figure 6.2 A présente les marquages des 17 anticorps anti-DR4. L'ensemble des anticorps anti-DR4 produits reconnaissent le DR4 exprimé à la surface des cellules DKO-DR4^{rec} et le marquage sur les cellules DKO-DR5^{rec} est quasiment nul. La figure 6.2 B expose les marquages des 4 anticorps anti-DR5. Tous les anticorps anti-DR5 présentent un marquage positif sur les DKO-DR5^{rec} et quasiment nul sur les cellules DKO-DR4^{rec}. Ces anticorps monoclonaux sont donc hautement spécifiques de leur cible correspondante, à savoir DR4 (figure 6.2 A) ou DR5 (figure 6.2 B).

Par conséquent, ces résultats mettent en évidence la spécificité de l'ensemble des anticorps produits vis à vis du DR4 ou DR5 conformationnels et endogènes. Ces anticorps monoclonaux sont donc des anticorps **conformationnels**, se liant spécifiquement à leur cible correspondante avec une grande spécificité. Ces données valident également la méthode d'immunisation et le test de criblage en ELISA qui ont été utilisés pour générer et sélectionner les anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement la conformation native de cibles membranaires comme les récepteurs de mort.

La spécificité des anticorps étant un élément indispensable pour induire une activité thérapeutique, il a ensuite été nécessaire de tester la fonction des 21 anticorps produits.

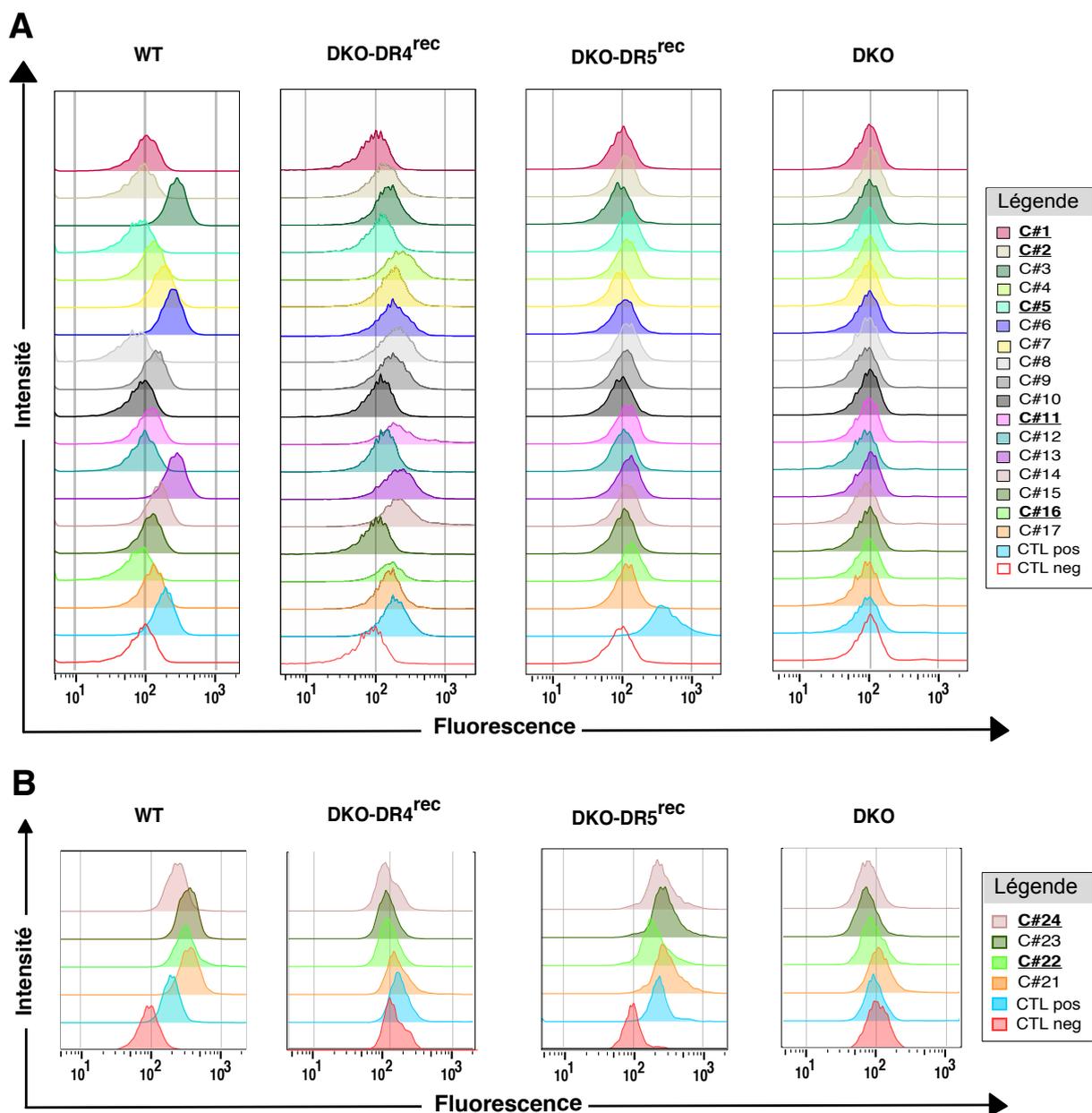


FIGURE 6.2 – Reconnaissance des récepteurs à la surface cellulaire par les anticorps anti-DR4 et anti-DR5 produits. Les cellules MDA-MB-231 WT, MDA-MB-231 DKO reconstituées avec DR4 ou DR5 et MDA-MB-231 DKO ont été marquées avec des anticorps anti-DR4 (A.) ou des anticorps anti-DR5 (B.). Les anticorps primaires ont ensuite été détectés en utilisant un anticorps secondaire IgG (H + L) - AF488 spécifique de la souris puis analysés par cytométrie en flux.

6.2 Activité agoniste des anticorps anti-DR4 et anti-DR5 produits

Pour étudier les effets fonctionnels des anticorps générés, des tests de viabilité cellulaire et d'apoptose ont été réalisés. Le premier objectif du travail a été d'évaluer la capacité des anticorps produits à induire, seuls, l'apoptose des cellules cancéreuses.

6.2.1 Tests fonctionnels, sélection de 2 anticorps d'intérêt

Tests de viabilité cellulaire au bleu de méthylène

La cytotoxicité est évaluée par des tests au bleu de méthylène sur les lignées cellulaires de cancer colorectal (HCT116) et de cancer du sein (MDA-MB-231), exprimant à la fois DR4 et DR5. Ces deux lignées répondent différemment à TRAIL. Les HCT116 sont sensibles à TRAIL alors que les MDA-MB-231 sont relativement résistantes.

Pour ce premier test, les cellules ont été traitées par une concentration croissante d'anticorps. Les traitements ont permis de mettre en évidence que deux des anticorps produits induisent de manière dose dépendente la mort cellulaire des cellules cibles, les clones C#16 et C#22 ciblant DR4 et DR5, respectivement. La figure 6.3 présente les résultats obtenus avec quelques anticorps anti-DR4 (C#1, C#2, C#5, C#11, C#16), et les 4 anticorps anti-DR5. Des résultats détaillés sont présentés dans l'annexe D. Sur les cellules HCT116, les anticorps C#16 et C#22 réduisent la viabilité cellulaire jusqu'à 50% et 35% respectivement. Cependant, aucun d'entre eux n'a semblé inhiber la viabilité cellulaire des MDA-MB-231, bien que les plus fortes concentrations de C#16 et C#22 aient tendance à réduire la viabilité cellulaire d'environ 10% (figure 6.3). Les résultats sont plus apparents avec les cellules HCT116 qu'avec les MDA-MB-231, principalement en raison de la résistance acquise de la lignée cellulaire MDA-MB-231.

Les deux résultats obtenus à partir de ce panel d'anticorps plutôt limité, sont très intéressants pour un tel criblage. L'anticorps monoclonal ciblant DR4, C#16 et l'anticorps anti-DR5, C#22 ont été capables d'inhiber seul, de manière dose dépendante, la viabilité cellulaire de la lignée sensible de cancer colorectal HCT116. Cette constatation est particulièrement remarquable car les anticorps monoclonaux agonistes développés jusqu'à présent contre DR4 et majoritairement contre DR5, à quelques exceptions près [Sung et al., 2009] [Morizot et al., 2011] nécessitent souvent des agents de réticulation [Motoki et al., 2005] [Kang et al., 2011] [Piechocki et al., 2012] [Graves et al., 2014] [Huet, 2014] ou des chimiothérapies sensibilisantes, tels que l'inhibiteur du protéasome bortezomib [Nagane et al., 2010], pour révéler leur potentiel pro-apoptotique.

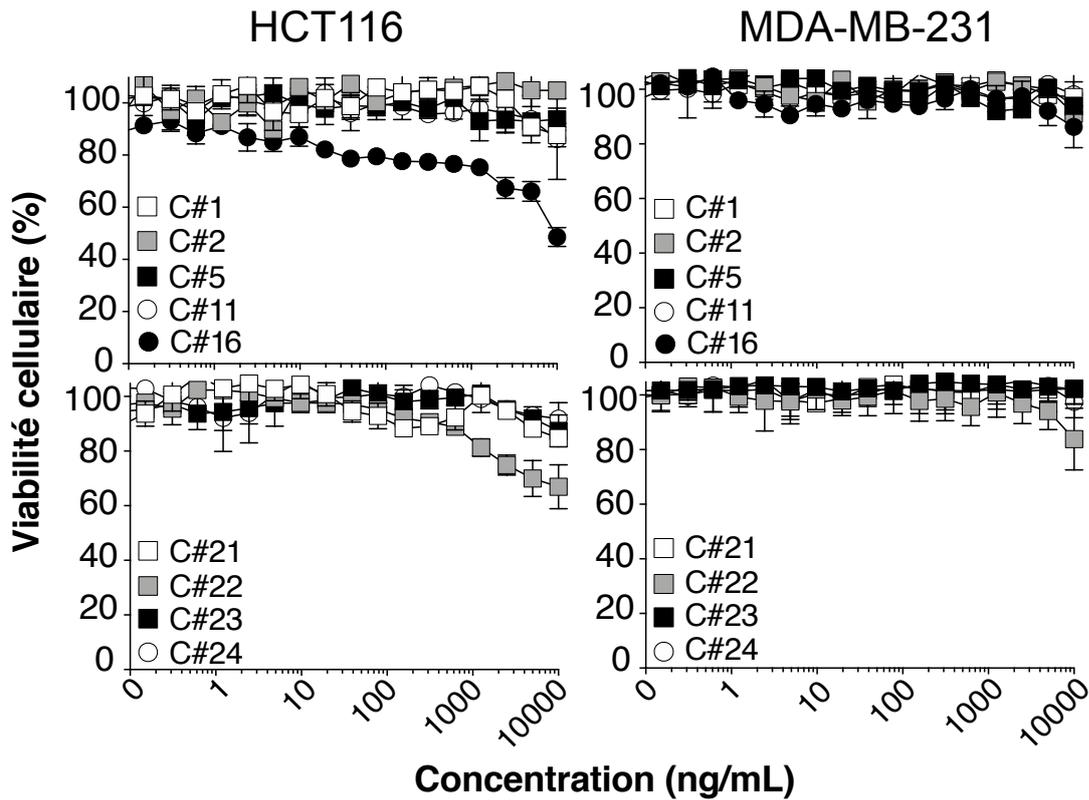
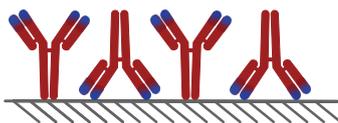


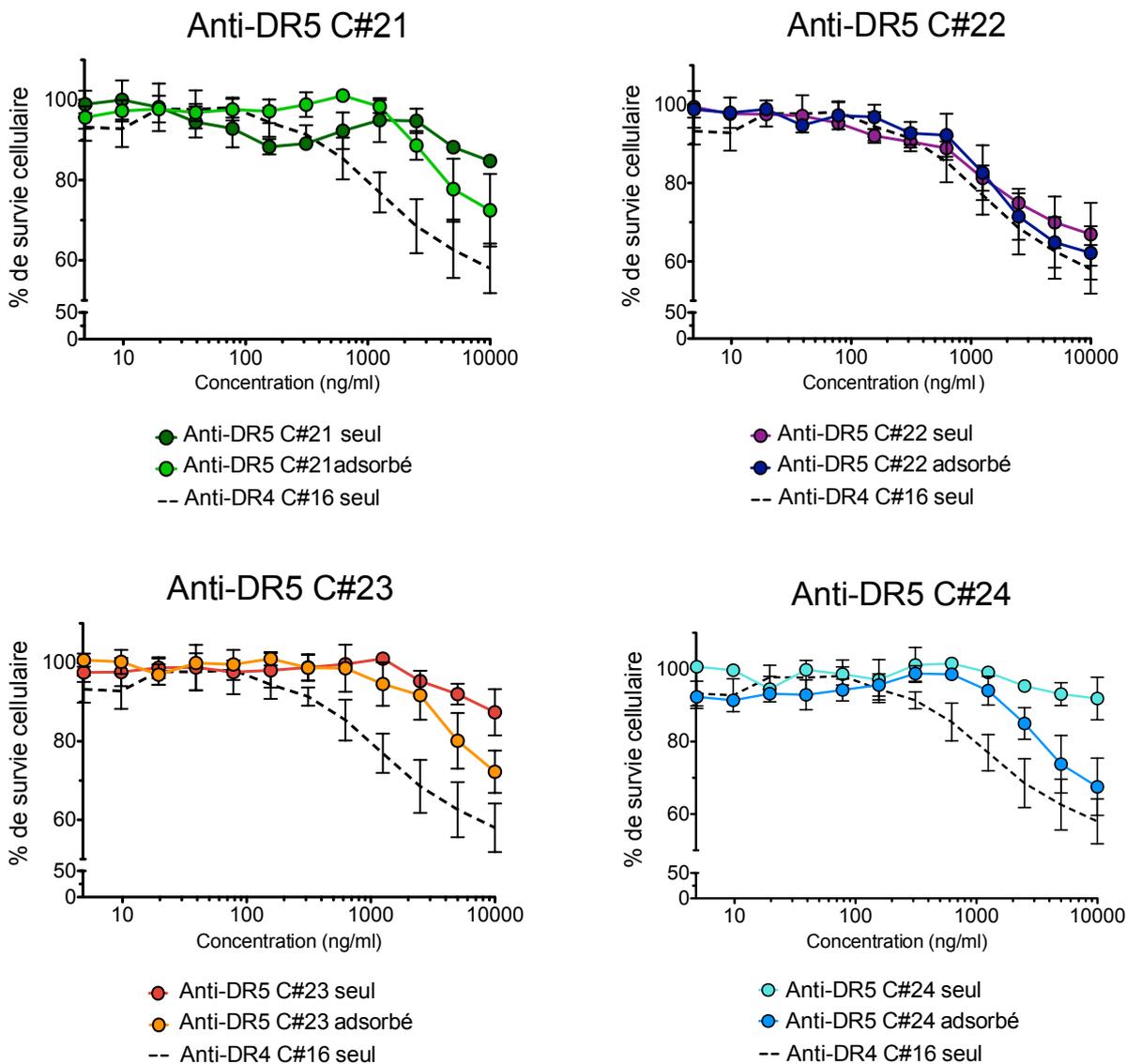
FIGURE 6.3 – Évaluation de la cytotoxicité des anticorps par bleu de méthylène. La viabilité cellulaire de HCT-116 et MDA-MB-231 a été déterminée en utilisant du bleu de méthylène après un traitement de 16h avec des concentrations croissantes d’anti-DR4 (AcMs C#1, C#2, C#5, C#11 et C#16) ou d’anti-DR5 (AcMs C#21, C#22, C#23 et C#24). Les valeurs présentées sont la moyenne \pm SD de trois expériences indépendantes ($n = 3$).

Évaluation des anti-DR5 réticulés

Afin d’évaluer le potentiel des quatre anticorps anti-DR5 développés à induire une cytotoxicité lorsqu’ils sont réticulés, ces anticorps ont été adsorbés sur une plaque de culture (figure 6.4(a)). L’effet cytotoxique a été comparé à l’anticorps soluble seul et à l’AcM-C#16, anti-DR4 soluble présentant une forte cytotoxicité. Les résultats sont présentés sur la figure 6.4. On peut voir ici que l’adsorption a permis d’augmenter le potentiel cytotoxique des anticorps C#21, C#23 et C#24, sans pour autant atteindre l’effet cytotoxique des anticorps anti-DR4 AcM-C#16 et anti-DR5 AcM-C#22 solubles. Concernant l’AcM-C#22, qui permet de diminuer la viabilité cellulaire des HCT116 lorsqu’il est utilisé en soluble, la réticulation n’a pas augmenté son potentiel cytotoxique. Dans cette expérience, la réticulation des anticorps n’a pas permis de diminuer de manière très significative la viabilité des cellules après traitement. Il faut cependant noter que ces anticorps peuvent être adsorbés dans toutes les directions, ce qui limite peut être leur activité cytotoxique après réticulation (6.4(a)). Il serait donc intéressant de multimériser les anticorps avec d’autres agents de réticulation afin de confirmer ou d’infirmer ces résultats.



(a) Représentation schématique des anticorps adsorbés



(b) Tests au bleu de méthylène des anticorps anti-DR5 adsorbés ou non

FIGURE 6.4 – Évaluation de la cytotoxicité des anticorps adsorbés sur plaques ELISA par bleu de méthylène. La viabilité cellulaire de HCT-116 a été déterminée en utilisant du bleu de méthylène après un traitement de 16h avec des concentrations croissantes d'anti-DR4 (AcM C#16) ou d'anti-DR5 préalablement adsorbés ou non sur une plaque de culture de 96 puits (AcMs C#21, C#22, C#23 et C#24). Les valeurs présentées sont la moyenne \pm SD de trois expériences indépendantes ($n = 3$).

Capacité des anticorps agonistes à induire l'apoptose

Les tests au bleu de méthylène sont utilisés pour mesurer de manière indirecte une perte de viabilité cellulaire. Ils ne permettent en aucun cas de déterminer les raisons de cette réduction de viabilité cellulaire. Il a donc fallu examiner si la mort cellulaire observée est bien induite par apoptose. Pour étudier ce phénomène, les cellules traitées sont marquées à l'annexine V et au 7-aminoactinomycine D (7-AAD) puis analysées par cytométrie en flux. Au début de l'apoptose, la phosphatidylsérine est externalisée à la surface cellulaire. L'annexine V a une affinité élevée pour cette dernière, ainsi des cellules présentant les premiers stades d'apoptose peuvent être identifiées via la liaison de l'Annexine V. La distinction entre les cellules vivantes, mortes, ou les cellules au stade précoce ou tardif de l'apoptose peut être faite grâce au 7-AAD, un agent de liaison à l'ADN fluorescent qui s'intercale entre la cytosine et la guanine. La combinaison de ces deux réactifs constitue un puissant outil de détection de l'apoptose [Elmore, 2007].

Les tests au bleu de méthylène permettent également de déterminer les conditions de criblage des anticorps sur un ensemble de lignées cellulaires, plus ou moins sensibles à TRAIL. Pour débiter le criblage, les anticorps anti-DR4 ont été testés à une concentration fixe de 10 µg/mL d'anticorps et, comme témoin, une concentration fixe de 1 µg/mL de TRAIL, sur une dizaine de lignées cellulaires cancéreuses humaines différentes :

- MDA-MB-231 : sein, résistantes à TRAIL
- MiaPaca-2 : pancréas, résistantes à TRAIL
- DU145 : prostate, résistantes à TRAIL
- SW480 : colon, moyennement sensibles à TRAIL
- Jurkat : lymphome, moyennement sensibles à TRAIL
- RL : lymphomes B, moyennement sensibles à TRAIL
- BL2 : lymphome de Burkitt, moyennement sensibles à TRAIL
- HCT116 : colon, sensibles à TRAIL
- A549 : poumon, sensibles à TRAIL
- H1703 : poumon, sensibles à TRAIL

Parmi les anticorps anti-DR4 testés, l'AcM-C#16 est celui qui a donné les résultats les plus probants. La figure 6.5 permet de résumer l'ensemble des résultats obtenus, et le détail de l'effet de l'AcM-C#16 et de l'AcM-C#11 sur l'ensemble des 10 lignées cancéreuses est présenté dans l'annexe E. L'AcM-C#11 présente une faible activité agoniste, l'AcM-C#16 est un anticorps agoniste efficace et enfin, l'AcM-C#15 n'a aucune activité, il sert donc de témoin négatif. Ici, les résultats sont présentés sur **4 des 10 lignées cancéreuses** : les cellules A549, BL2, HCT116 et SW480. Les pourcentages d'apoptose induits par les traitements sont indiqués dans les quartiles de droite. Le pourcentage de cellules positives à l'annexine V (quartile en bas à droite) représente la quantité de cellules au stade d'apoptose précoce, et le pourcentage de cellules double-positives annexine V/7AAD (quartile en haut à droite) présente la quantité de cellules au stade

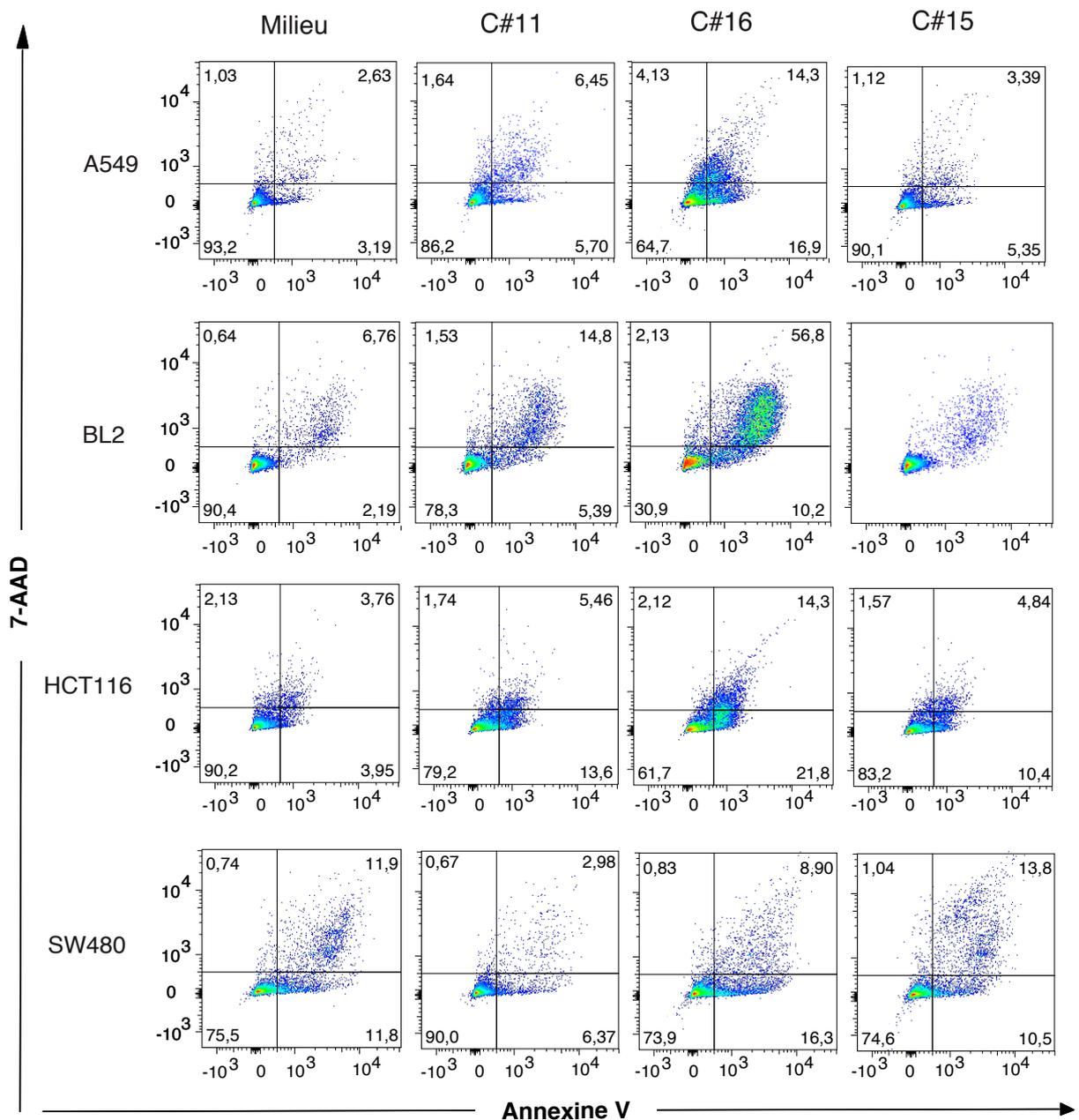


FIGURE 6.5 – Effet agoniste de l’anticorps AcM-C#16 sur un panel de 10 lignées cancéreuses humaines. Les cellules ont été traitées par une combinaison de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d’AcM et 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TRAIL, et comme témoin, une concentration fixe de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TRAIL (T). Les résultats ont été analysés par un marquage AnV/7AAD par cytométrie en flux ($n = 1$). Ici sont représentés les histogrammes biparamétriques ou dotplot obtenus avec le milieu seul (Milieu) ou après un traitement de l’AcM-C#11 (C#11), l’AcM-C#16 (C#16) et l’AcM-C#15 (C#15) sur les cellules A549, BL2, HCT116 et SW480. Toutes ces cellules sont sensibles à TRAIL, à part les cellules SW480 qui y sont résistantes.

d’apoptose tardif. Il est important de noter ici que les cellules SW480 apparaissent résistantes à TRAIL, ce qui n’est normalement pas le cas. Toutefois, l’expérience n’a été effectuée qu’une fois et le clone décongelé a peut être subi des variations génétiques lors de la culture cellulaire, comme beaucoup de lignées cancéreuses [Ben-David et al., 2018].

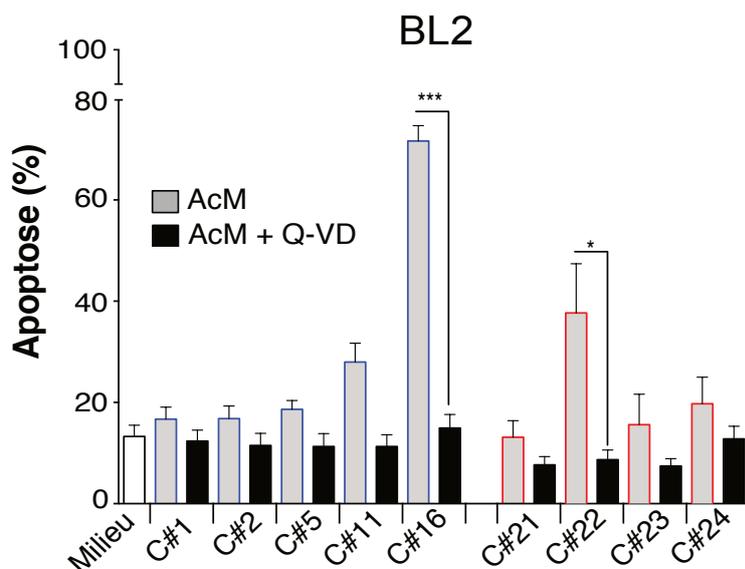


FIGURE 6.6 – Apoptose induite par les anticorps anti-DR4 et anti-DR5 agonistes. La lignée cellulaire de lymphome de Burkitt BL2 a été pré-incubée, ou non, pendant 30 min à 37°C avec 10 μ M de Q-VD-Oph puis traitée pendant 20 h avec 10 μ g/mL d’AcM. Les cellules ont ensuite été marquées à l’Annexine V - 7AAD et l’apoptose a été quantifiée par cytométrie en flux. Un test t de student non apparié a été effectué avec les valeurs moyennes \pm SD (n = 3).

Bien que ces expériences n’aient été faites qu’une seule fois, l’effet pro-apoptotique de l’AcM-C#16 a été confirmé sur l’ensemble des lignées cellulaires sensibles à TRAIL. Toutefois, il est intéressant de noter que le traitement par l’anticorps n’induit pas les mêmes réponses qu’avec TRAIL. Dans cette expérience, les lignées A549 et H1703 se sont montrées les plus sensibles au TRAIL alors que la lignée BL2 a incontestablement mieux répondu aux traitements par l’anticorps, avec une apoptose observée 7 fois supérieure au milieu seul. Nous avons donc utilisé la lignée cellulaire de lymphome de Burkitt BL2 pour les autres criblages d’anticorps.

Dans un deuxième test, nous avons examiné si la mort cellulaire observée dans les tests au bleu de méthylène était due à l’apoptose en ajoutant un inhibiteur de caspases, le Q-VD-Oph. Les effets des différents anticorps sur les cellules BL2 ont été déterminés par marquage à l’annexine V/7AAD et analysés par cytométrie en flux. Les résultats de l’apoptose induite par les cinq anticorps anti-DR4 (C#1, C#2, C#5, C#11, C#16), et les quatre anticorps anti-DR5 sont présentés sur la figure 6.6. L’activité agoniste des anticorps est clairement pro-apoptotique, puisque l’inhibition des caspases par la pancaspase Q-VD-Oph a inhibé la mort cellulaire. Conformément aux résultats obtenus dans les cellules HCT116, C#16 et C#22 ont été capables d’induire, seuls et sans réticulation ni activateur, plus de 75% et 35%, respectivement, d’apoptose dans les cellules BL2. Comme prévu, la mort cellulaire induite par ces deux anticorps dans les cellules BL2 a été inhibée de manière sélective et significative par l’inhibiteur Q-VD-Oph (figure 6.6).

Ces résultats confirment ainsi l’activité pro-apoptotique agoniste des deux anticorps.

6.3 Synergie des anticorps avec le ligand TRAIL

Des résultats préliminaires de l'équipe, effectués sur le système murin, ont permis de mettre en évidence qu'il est possible d'envisager de combiner des anticorps potentialisateurs à TRAIL. **Une des hypothèses de cette thèse était que ce phénomène pourrait être également observable sur le système humain.** De plus, et notamment au cours de ma thèse, des études de plus en plus nombreuses ont suggéré que la combinaison de TRAIL avec des anticorps ciblant DR4 et/ou DR5 permettrait d'induire une apoptose plus efficace encore [Graves et al., 2014] [Tuthill et al., 2015] [Hao et al., 2016]. Plusieurs équipes ont mis en avant un effet potentialisateur des anticorps anti-DR5 (AMG 655) et anti-DR4 (TR1-419) envers le ligand TRAIL.

Nous nous sommes donc attachés, dans un deuxième objectif, à vérifier si les anticorps que nous avons développé présentaient ou non un tel effet potentialisateur.

6.3.1 Tests fonctionnels, sélection de 4 anticorps potentialisateurs

La cytotoxicité de la combinaison ainsi que son potentiel pro-apoptotique ont été évalués, comme démontré précédemment, par un test au bleu de méthylène, par marquage à l'AnV/7AAD et par western blot.

Tests cytotoxiques au bleu de méthylène

En premier lieu, la cytotoxicité de la combinaison du panel d'anticorps anti-DR4 et anti-DR5 avec TRAIL a été testée sur les cellules HCT116, sensibles à TRAIL, et sur les cellules MDA-MB-231, résistantes à TRAIL. Ici, les cellules ont été stimulées avec une concentration variable (dilutions en cascade à partir d'une concentration de 10 µg/mL) de TRAIL seul ou en combinaison avec un AcM pendant 16h. La viabilité cellulaire a été mesurée par test au bleu de méthylène (figure 6.7). Ce criblage a permis d'isoler plusieurs anticorps en mesure d'inhiber de manière synergique la viabilité des lignées cellulaires tumorales. Quatre anticorps, 2 anti-DR4 (AcM-C#2 et AcM-C#11) et 2 anti-DR5 (AcM-C#22 et AcM-C#24), ont potentialisé l'effet de TRAIL de manière dose-dépendante. Sur les cellules HCT116, TRAIL (en rouge) a induit une cytotoxicité maximale d'environ 60%. La combinaison de TRAIL avec des concentrations fortes d'anticorps AcM-C#11 (en blanc) a permis d'augmenter la cytotoxicité de TRAIL jusqu'à plus de 90%. Sur les cellules MDA-MB-231, en revanche, TRAIL seul (en rouge) a bien induit la mort cellulaire d'une manière dose-dépendante, mais à un maximum d'environ 30% de mort cellulaire. Sur ces cellules, l'effet potentialisateur des AcM C#2, C#11, C#22 et C#24 s'est montré encore plus visible car l'ajout de ces anticorps a permis d'abaisser la viabilité cellulaire à environ 23%, 25%, 45% et 40% respectivement.

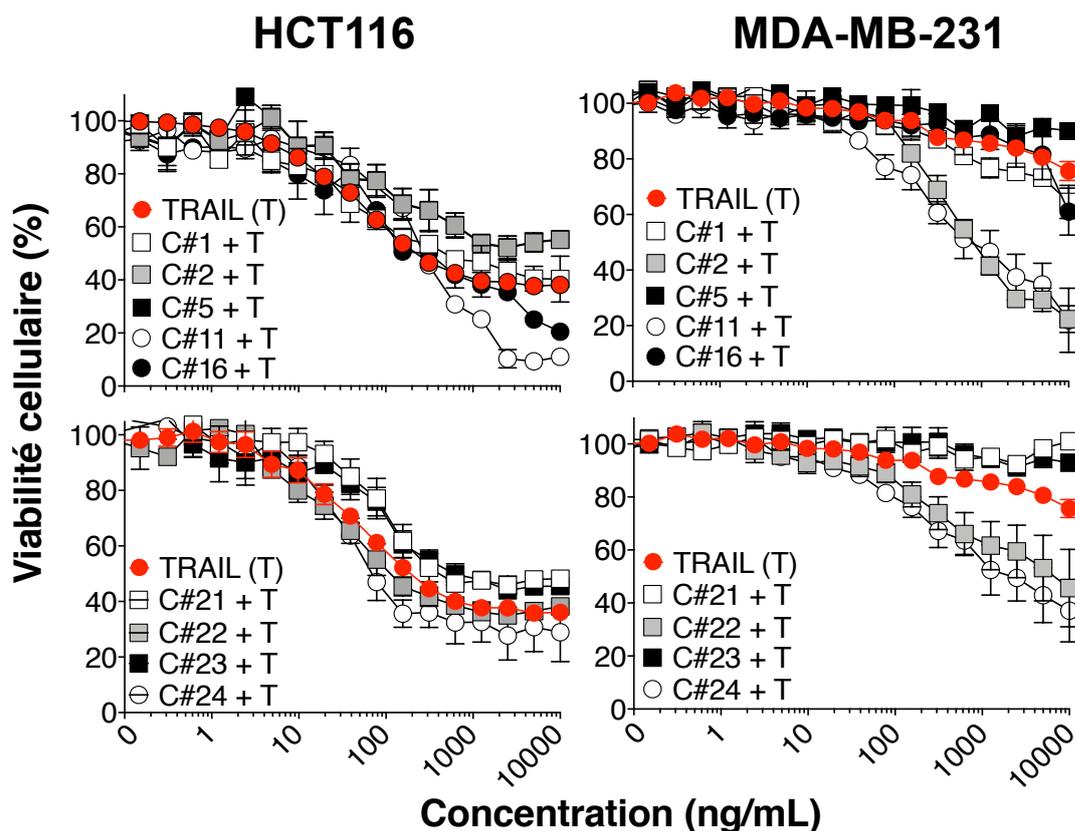


FIGURE 6.7 – Évaluation de la cytotoxicité de la combinaison des AcMs avec TRAIL. La viabilité cellulaire de HCT116 (à gauche) et MDA-MB-231 (à droite) a été déterminée en utilisant des tests au bleu de méthylène. Les lignées cellulaires ont été traitées pendant 16 heures avec la concentration indiquée de d'AcM-DR4 (ci-dessus) ou d'AcM-DR5 (ci-dessous) en combinaison avec TRAIL soluble. Les valeurs représentent les valeurs moyennes \pm SD (n = 3).

Cependant, le potentiel synergique des anticorps, à l'exception de l'AcM-C#11 a été plus apparent dans les cellules MDA-MB-231 que dans les HCT116. Ceci peut s'expliquer en partie par le fait que les HCT116 étant très sensibles, il est difficile de voir une différence ici, à part pour le traitement avec l'AcM-C#11, qui semble être très efficace dans l'induction de la mort cellulaire en combinaison avec TRAIL. En revanche, lorsque les cellules MDA-MB-231 sont traitées par la combinaison TRAIL et AcMs, l'induction maximale de la mort cellulaire atteint environ 80% pour les AcMs anti-DR4 et environ 60% pour les AcMs anti-DR5.

Ici encore, les résultats obtenus sont particulièrement intéressants : les quatre anticorps dirigés contre DR4 et DR5 ont présenté de manière dose dépendante un fort pouvoir synergique, et plus encore, ils ont sensibilisé des cellules initialement résistantes au TRAIL, ce qui tendrait à démontrer leur fort potentiel thérapeutique.

Après avoir évalué l'effet de synergie sur la viabilité cellulaire, nous avons vérifié que la mort cellulaire induite soit bien due à l'apoptose.

Caractérisation de la mort cellulaire induite

Pour vérifier l'effet apoptotique du traitement combinant TRAIL et les AcMs, l'apoptose et la potentialisation ont été confirmées par des tests de cytométrie en flux et par western blot.

En premier lieu, l'effet combinatoire de l'AcM-C#11 avec TRAIL a été testé sur les 10 lignées cancéreuses utilisées pour l'AcM-C#16. L'ensemble des lignées cellulaires ont été traitées par une combinaison de 10 µg/mL d'AcM et de 1 µg/mL de TRAIL, et comme témoin, une concentration fixe de 1 µg/mL de TRAIL. L'ensemble des résultats de l'AcM-C#11 est présenté dans l'annexe E. Les résultats du traitement des AcM-C#11, C#16 et C#15 en combinaison avec TRAIL sont présentés sur la figure 6.8, et ce sur 4 des 10 lignées cancéreuses. La figure 6.8 peut être comparée aux résultats de la figure 6.5 et s'analyse de la même façon : les quartiles droits de chaque histogramme représentent le pourcentage d'apoptose du traitement. L'AcM-C#11 est un anticorps potentialisateur, l'AcM-C#16 est un anticorps agoniste et l'AcM-C#15 ne présente pas de potentiel synergique avec TRAIL, il peut être considéré comme un témoin négatif. Ce panel est donc représentatif des résultats obtenus avec l'ensemble des anticorps, sur les 10 lignées cancéreuses. On peut voir sur la figure 6.8 que le potentiel synergique de l'AcM-C#11 a été confirmé sur plus de la moitié des lignées, indépendamment de leur sensibilité à TRAIL, avec encore une fois une réponse plus importante sur les cellules BL2. Il faut noter ici que l'expérience n'a été effectuée qu'une seule fois. De même, le fait que la concentration de TRAIL soit différente de celle utilisée pour le test au bleu de méthylène (10 fois plus faible), ceci peut expliquer que la potentialisation ne soit pas aussi visible sur les cellules HCT116.

Dans un deuxième temps, le potentiel synergique des AcMs a été évalué par cytométrie en flux après un marquage AnV/7AAD sur les cellules BL2, en présence ou non d'inhibiteur de pan-caspase Q-VD-Oph, ainsi que sur les MDA-MB-231. Les traitements par TRAIL seul et la combinaison des AcMs additionnés à TRAIL ont été évalués sur les BL2 (figure 6.9 A) et sur les MDA-MB-231 (figure 6.9 B). Les résultats de l'apoptose induite par la combinaison de TRAIL et des cinq anticorps anti-DR4 (C#1, C#2, C#5, C#11, C#16), ou des 4 anticorps anti-DR5 sur les cellules BL2 (figure 6.9 A) sont à comparer avec la figure 6.6. Ici encore, le marquage à l'AnV/7AAD a clairement mis en évidence que, pour ces deux lignées cellulaires, 4 des 9 AcMs ont été capables de potentialiser l'action de TRAIL. Cette sensibilisation a été confirmée dans les cellules MDA-MB-231. Pour les deux lignées cellulaires, TRAIL induit environ 40% de mort cellulaire, alors que la combinaison avec les AcMs potentialisateurs (C#2, C#11, C#22, C#24) a augmenté considérablement l'apoptose de 70% à 90% environ. L'ajout de Q-VD-Oph a totalement inhibé la mort cellulaire induite par ces AcM, mettant en lumière, une fois de plus, que la mort cellulaire observée a été médiée par l'apoptose. Les traitements des BL2 et des MDA-MB-231 ont été différents ici, le temps d'incubation et le lot de TRAIL ne sont pas les mêmes. Ceci pourrait expliquer le pourcentage plutôt faible de cellules apoptotiques

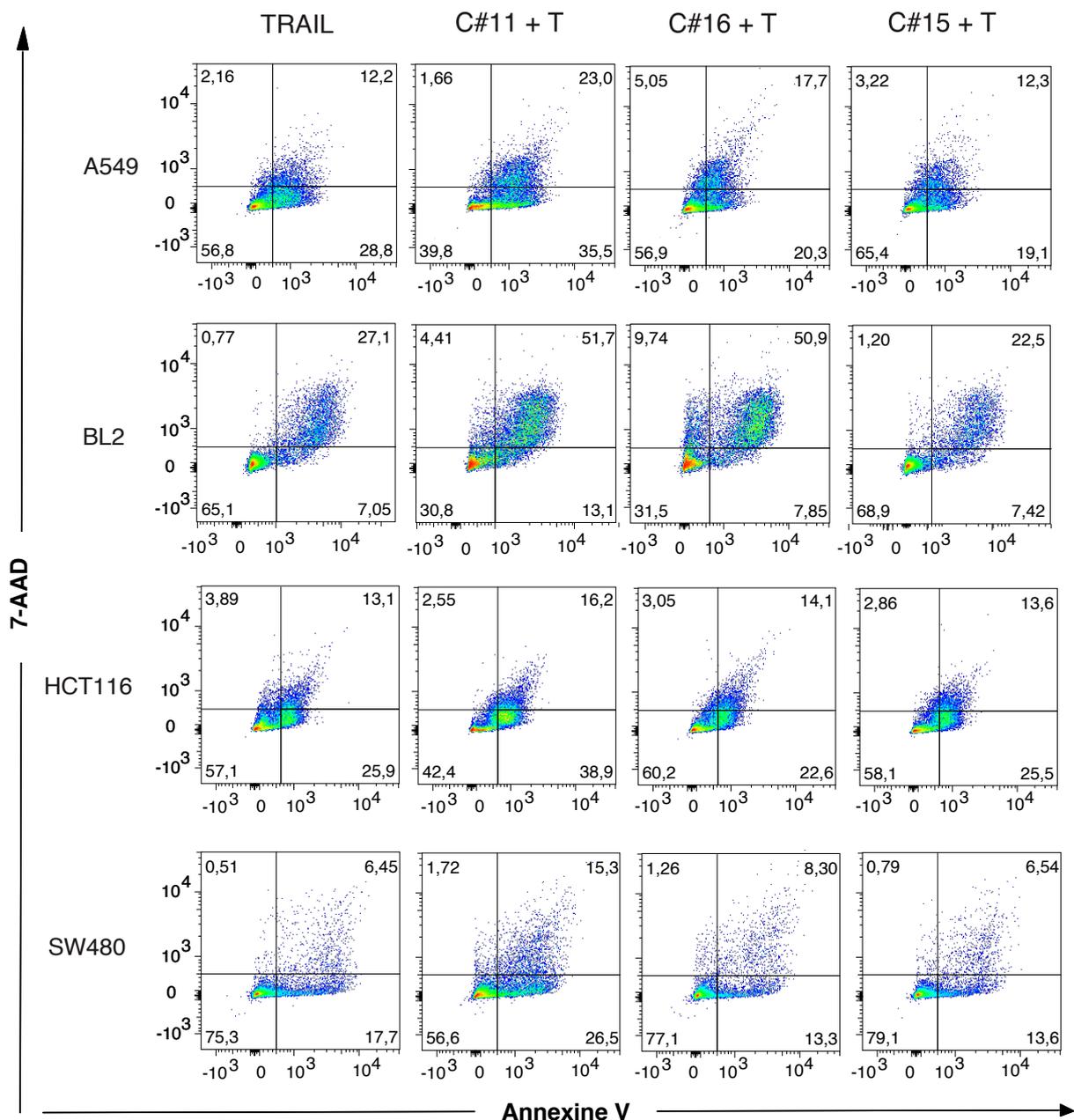


FIGURE 6.8 – Effet potentialisateur de l'anticorps AcM-C#11 sur un panel de 10 lignées cancéreuses humaines. Les cellules ont été traitées par une combinaison de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'AcM et 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TRAIL, et comme témoin, une concentration fixe de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TRAIL (T). Les résultats ont été analysés par un marquage AnV/7AAD par cytométrie en flux ($n = 1$). Ici sont représentés les histogrammes biparamétriques ou dotplot obtenus après un traitement de TRAIL seul (TRAIL), AcM-C#11 et TRAIL (C#11 + T), AcM-C#16 et TRAIL (C#16 + T) et AcM-C#15 et TRAIL (C#15 + T) sur les cellules A549, BL2, HCT116 et SW480. Toutes ces cellules sont sensibles à TRAIL, à part les cellules SW480 qui y sont résistantes.

sur les BL2 après un traitement de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TRAIL, qui est habituellement au dessus de 50% à cette concentration. L'ensemble de ces résultats démontre néanmoins que la mort cellulaire médiée par TRAIL a été significativement augmentée par les AcMs C#2, C#11, C#22 et C#24 dans diverses cellules cancéreuses, répondant différemment au TRAIL.

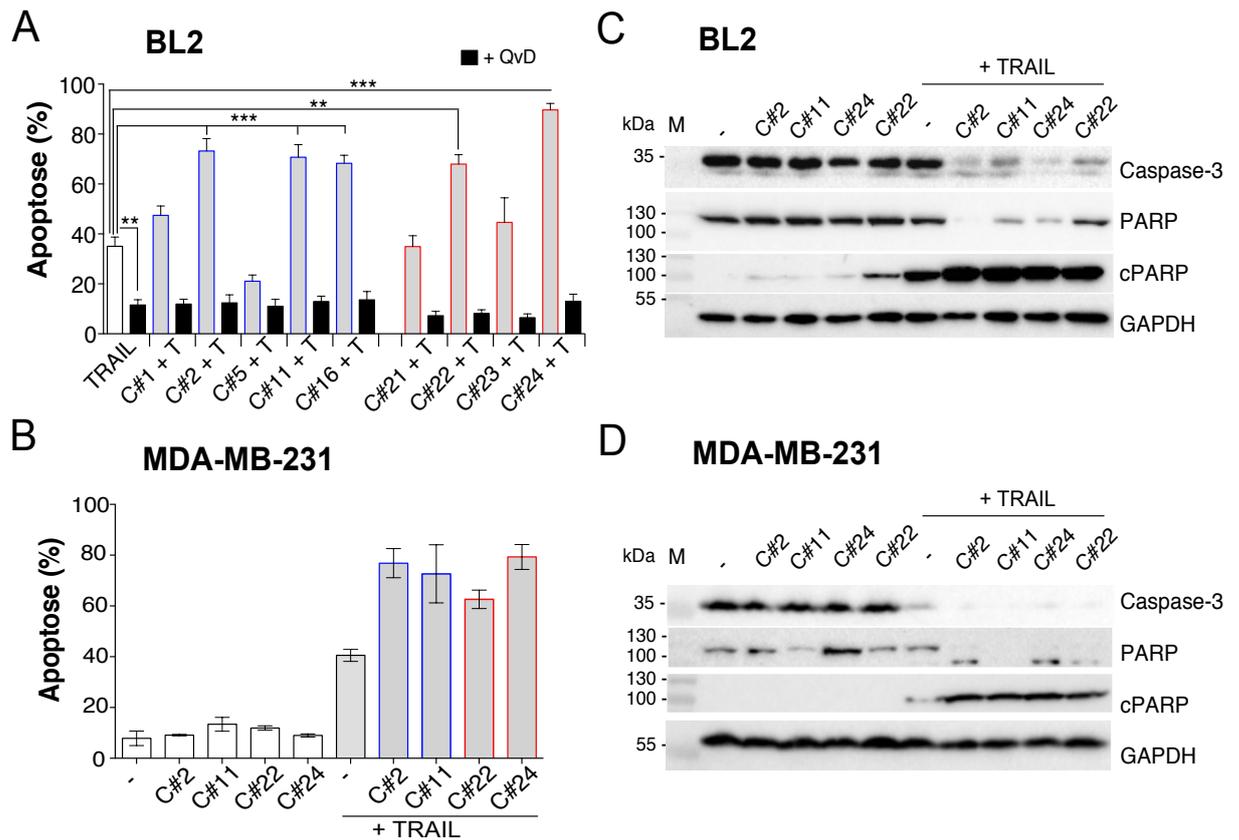


FIGURE 6.9 – Les traitements par les AcMs peuvent potentialiser l’action de TRAIL. **A.** La lignée cellulaire BL2 a été traitée dans des plaques à 24 puits pendant 20 heures avec 1 µg/mL de TRAIL (lot 34), ou une combinaison de 10 µg/mL d’AcMs et de 1 µg/mL de TRAIL (lot 34). Indiqué en noir, 10 µM de Q-VD-Oph ont été ajoutés avant traitement pendant 30 min à 37 °C. Le surnageant et les cellules ont été récoltés et l’apoptose a été détectée par marquage à l’annexine V - FITC / 7AAD par cytométrie en flux. La significativité a été évaluée par des tests ANOVA avec les valeurs moyennes ± l’écart type (n = 3) ** p<0,05, *** p<0,01. **B.** La lignée cellulaire MDA-MB-231 a été traitée pendant 8h avec 5 µg/mL d’AcM-C#2, d’AcM-C#11, d’AcM-C#22 et d’AcM-C#24, seuls, et en combinaison avec 1 µg/mL de TRAIL (lot 35). Le surnageant et les cellules ont été récoltés et l’apoptose a été détectée par liaison à l’Annexine V-FITC / 7AAD par cytométrie en flux. La significativité a été évaluée par des tests ANOVA et p>0,05. Les cellules BL2 **C.** et les cellules MDA-MB-231 **D.** ont été stimulées pendant 8 h avec 5 µg/mL d’AcM-C#2, d’AcM-C#11, d’AcM-C#22 et d’AcM-C#24, et en combinaison avec 1 µg/mL de TRAIL. Le clivage de la caspase effectrice caspase-3 et de la PARP-1 ont été analysé par western-blot à partir des lysats des cellules. La GaPDH et l’HSC-70 ont été utilisées en tant que contrôle de charge sur le gel.

Afin de mieux démontrer l’activation des caspases induites par le potentiel synergique des AcMs et de TRAIL, l’augmentation du clivage de la caspase effectrice (caspase-3) et du dernier substrat de la cascade apoptotique (PARP et cPARP) a été examinée par western-blot (figure 6.9 C et D). Les cellules BL2 et MDA-MB-231 ont été stimulées pendant 8h par 5 µg/mL d’anticorps C#2,C#11, C#22 et C#24 seuls, par 1 µg/mL de TRAIL ou par la combinaison de chacun des anticorps avec TRAIL. Le surnageant et les cellules

ont ensuite été récupérés. En accord avec les observations du marquage AnV/7AAD, le clivage de la caspase-3 effectrice, ainsi que son substrat PARP ou ses produits de clivage (cPARP) ont tous été augmentés dans les cellules stimulées par la combinaison en comparaison avec les cellules stimulées par le TRAIL seul ou les anticorps seuls. L'addition de TRAIL aux AcM-C#2, -C#11, -C#22 ou -C#24 a réduit de manière significative la quasi-totalité de la caspase-3 et de la PARP-1, par rapport aux traitements avec les AcMs seuls ou TRAIL seul. L'effet potentialisateur des combinaisons est également visible par l'accroissement des produits de clivage de la PARP.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats confirme que la mort cellulaire médiée par TRAIL peut être significativement améliorée par les deux anti-DR4 (AcM-C#2 et AcM-C#11) et les deux anti-DR5 (AcM-C#22 et AcM-C#24), dans diverses cellules cancéreuses, et plus particulièrement dans les cellules initialement résistantes à TRAIL.

6.3.2 Tests fonctionnels, sélection de 3 anticorps potentiellement inhibiteurs

Les tests de combinaisons de TRAIL et des anticorps ont également permis de déceler trois anticorps potentiellement inhibiteurs.

Dans la figure 6.9 A, TRAIL combiné à l'anticorps anti-DR4 C#5 présente une activité diminuée comparée au TRAIL seul. Alors que 1 µg/mL de TRAIL induit environ 35% d'apoptose sur les BL2, la combinaison du TRAIL avec 10 µg/mL de l'AcM-C#5 réduit le pourcentage d'apoptose à environ 20%, près de la moitié du potentiel apoptotique du TRAIL seul. Ce pourcentage est proche de celui observé lors du traitement par l'inhibiteur de pan-caspase Q-VD-Oph. On pourrait alors se demander si cet anticorps ne présente pas d'activité antagoniste. Les anticorps C#21 et C#23 semblent inhiber l'action de TRAIL sur les cellules MDA-MB-231 dans les tests au bleu de méthylène (figure 6.7). Malheureusement ces effets ne sont pas retrouvés sur les cellules BL2 après marquage à l'AnV/7AAD. Toutefois, TRAIL pouvant se fixer aux deux récepteurs, l'apoptose résiduelle observée sur les BL2 pourrait provenir de la stimulation de l'autre récepteur disponible, à savoir DR5 dans le cas du C#5 et DR4 dans le cas du C#21 et C#23.

Il serait donc intéressant de faire des tests complémentaires en utilisant des lignées cellulaires n'exprimant que DR4 ou que DR5 afin de vérifier l'antagonisme de ces trois anticorps. Dans plusieurs études les anticorps anti-DR4 ou anti-DR5 ont montré des signes d'amélioration de l'apoptose induite par TRAIL mais aucune étude n'a évalué la capacité des anticorps à inhiber son effet. Si nos résultats se confirment, ces anticorps pourraient être intéressants pour le développement d'anticorps inhibiteurs de TRAIL. La cytokine TRAIL régule la survie des lymphocytes T par DR4 et DR5 [Tschumi et al., 2018]. Ces anticorps bloquants pourraient donc être utilisés comme nouvelles stratégies de checkpoints inhibiteurs afin de renforcer l'activité des lymphocytes T.

De plus, le récepteur DR5 intervenant dans les processus de migration cellulaire, le développement d'anticorps antagonistes dirigés contre DR5 pourrait permettre la découverte d'anticorps bloquant l'activité pro-motile de ce récepteur [Somasekharan et al., 2013]. Bien que l'inhibition de l'apoptose ne soit pas directement corrélée à l'inhibition de la signalisation pro-migratoire, la découverte que C#21 et C#23 peuvent avoir des effets antagonistes est encourageante pour le développement d'anticorps bloquant la composante pro-migratoire du DR5. De tels anticorps seraient des outils intéressants pour disséquer le complexe moléculaire et étudier la signalisation pro-motile induite par TRAIL.

6.4 Relation affinité-fonction

À partir des 21 hybridomes d'intérêt, l'ensemble des tests caractéristiques et fonctionnels a permis d'isoler 5 anticorps présentant des propriétés thérapeutiques intéressantes. L'anticorps lie son antigène par des interactions non covalentes et la force d'interaction de liaison entre les deux molécules peut être mesurée par la constante d'affinité de liaison. L'affinité est généralement déterminée grâce à la constante de dissociation à l'équilibre (KD) qui évalue le rapport entre les constantes de vitesse d'association (K_{on} ou K_a) et de dissociation (K_{off} ou K_d) de liaison, soit K_{off} / K_{on} .

Afin de déterminer le KD des anticorps générés, un test d'interférométrie (ou méthode BLI, pour *Bio-Layer Interferometry*) a été réalisé en utilisant les récepteurs recombinants DR4-Fc et DR5-Fc. Ce test nous a permis de comparer les différents KD obtenus avec nos AcM, et nous a donné une indication par rapport aux anticorps testés en clinique. L'analyse des différents profils d'association et de dissociation, ainsi que le KD associé, pourrait permettre de déterminer s'il est possible de prévoir l'activité biologique des principaux anticorps anti-DR4 et anti-DR5, en se basant uniquement sur leur affinité pour leur cible et leurs caractéristiques de liaison.

Les sensogrammes de liaison et les paramètres cinétiques analysés sont représentés sur la figure 6.10. Un schéma reprenant le principe de cette méthode est fourni dans les matériels et méthodes. La cinétique d'association et de dissociation des AcM vis-à-vis de DR4-Fc et DR5-Fc a été mesurée. Les courbes expérimentales ont été ajustées avec un modèle de liaison 1 : 1 pour calculer les constantes de vitesse d'association (K_{on} ou K_a) et de dissociation (K_{off} ou K_d), ainsi que la constante de dissociation ($KD = K_{off} / K_a$). Les valeurs générées sont présentées dans le tableau 6.1.

Ces mesures nous ont permis de confirmer que tous les anticorps testés lient spécifiquement leur récepteur correspondant de façon dose-dépendante et avec une très bonne affinité. Ici encore, la sélectivité des anticorps envers leur cible propre a été vérifiée puisqu'aucun anti-DR4 ne s'accroche sur DR5-Fc, et inversement, les anticorps anti-DR5 ne répondent que très faiblement sur DR4-Fc. Indépendamment du fait qu'ils ciblent DR4 ou DR5, les constantes de dissociation (KD) varient de 20 pM à 2 nM. À part l'AcM-

C#2, tous les anticorps ont un KD subnanomolaire (tableau 6.1). Dans cette gamme de concentration, l'affinité des anticorps envers leur cible est considérée comme très forte. Les analyses indiquent ainsi que les anticorps produits ont une très bonne affinité vis-à-vis de leur récepteur correspondant.

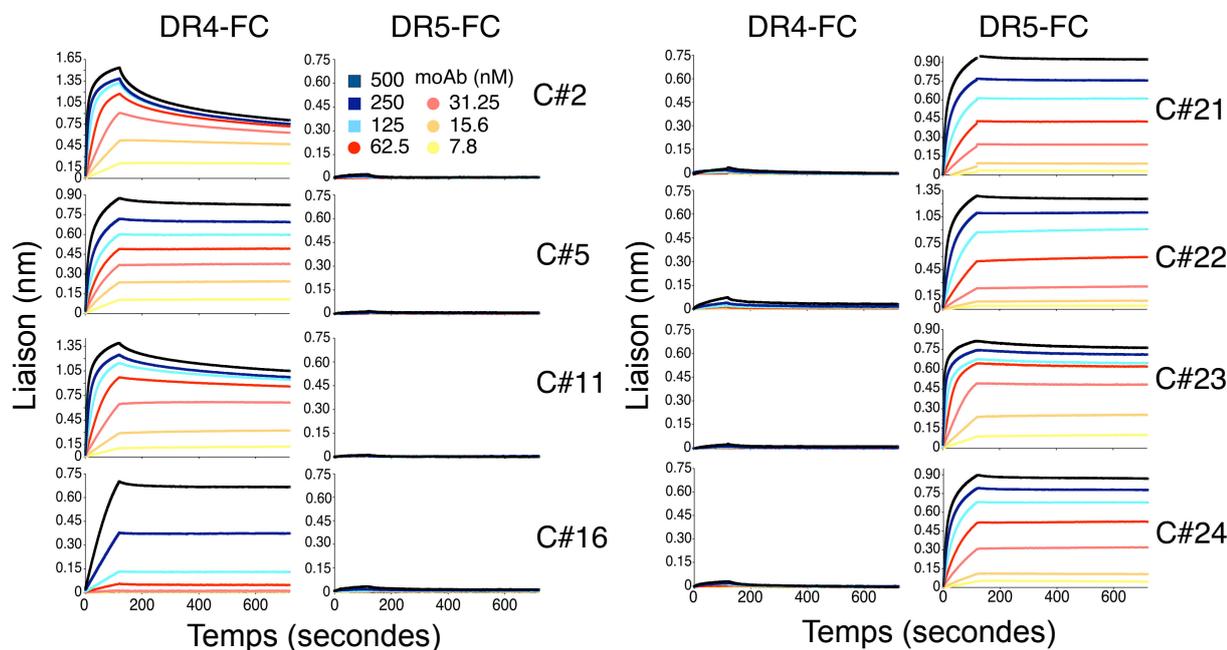


FIGURE 6.10 – Détermination de l'affinité des anticorps anti-DR4 et anti-DR5 produits. Le profil de liaison des AcMs vis-à-vis de DR4-Fc et de DR5-Fc a été déterminé par un dosage par interférométrie (BLI) en utilisant un OctetRED. Les lignes colorées représentent le signal de réponse de liaison à différentes concentrations en AcM (de 500 nM à 7,8 nM) envers DR4-Fc ou DR5-Fc. La liaison des AcMs a été contrôlée en temps réel afin d'obtenir les constantes d'association (K_a) et de dissociation (K_{off}). L'association a été mesurée pendant 120 secondes et la dissociation pendant 600 secondes. La constante d'équilibre (KD) a été calculée en utilisant le modèle stoechiométrique de liaison K_{off} / K_a (1 :1)

TABLE 6.1 – Paramètres cinétiques des anticorps DR4 et DR5 dirigés contre DR4-Fc et DR5-Fc en utilisant la méthode BLI (BioLayer Interferometry) obtenus à partir des courbes présentées en figure 6.10. La cinétique de liaison 1 : 1 a été utilisée pour l'évaluation de la liaison des anticorps agonistiques (AcM-C#16 et AcM-C#22) et les anticorps activateurs (AcM-C#2, AcM-C#11, AcM-C#22 et AcM-C#24) avec DR4-Fc et DR5-Fc

	C#2	C#5	C#11	C#16	C#21	C#22	C#23	C#24
KD	1.74E-09	1.3E-10	9.32E-10	3.8E-11	2.3E-11	1.01E-10	1.18E-10	2.05E-11
Kon	2.5E+05	2.4E+05	1.2E+05	1.9E+04	1.3E+05	1E+05	4.1E+05	1.7E+05
Koff	4.4E-04	2.2E-04	2.3E-06	7.3E-07	3E-06	1.2E-06	4.8E-05	3.5E-06
X2	1.12	0.637	0.629	0.035	0.116	0.507	0.223	0.204
R2	0.99216	0.99872	0.99644	0.99997	0.99928	0.99934	0.99896	0.99903

La carte du taux on-off, dans laquelle les paramètres cinétiques de chaque clone sont visualisés, indique que les paramètres cinétiques (K_a et K_d) diffèrent selon les clones (figure 6.11). L'activité biologique (agoniste vs potentialisateur) des anticorps n'a pas pu être prédite uniquement sur la base de leurs constantes de liaison. L'anticorps agoniste AcM-C#16 affiche les vitesses d'association et de dissociation les plus basses. À l'inverse, les anticorps anti-DR4 potentialisateurs (C#2 et C#11) semblent s'associer et se dissocier très vite. Toutefois, parmi tous les anticorps analysés dans cette étude (tableau 6.1), les constantes d'association et de dissociation, ainsi que l'affinité globale envers la cible spécifique ne peuvent être associées à une activité biologique spécifique des anticorps ciblant DR4 ou DR5. De même, les anticorps présentant une activité de synergie par rapport à TRAIL se sont avérés présenter des différences importantes d'affinité pour leur cible, allant de 20 à 1740 pM. Les propriétés biologiques de ces anticorps sont probablement dues à l'identification d'un site spécifique de la cible sous sa forme native, et non pas à son affinité. Nous ne pouvons cependant pas exclure que les caractéristiques mises à jour puissent néanmoins présenter un intérêt. Il faudrait analyser davantage d'anticorps pour conclure.

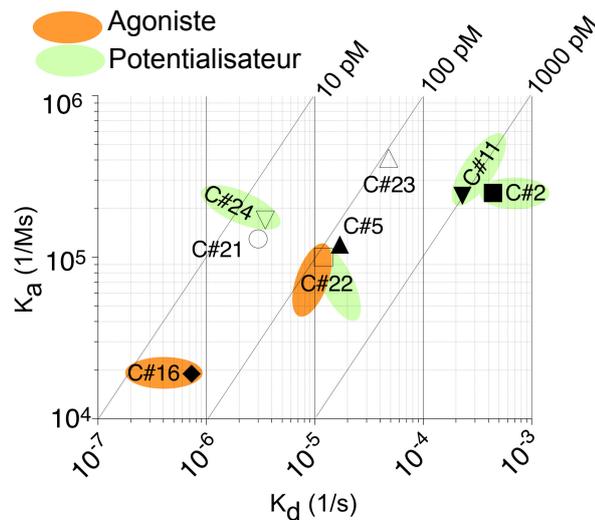


FIGURE 6.11 – Carte des taux K_a/K_{off} indiquant les paramètres de cinétique de liaison des anticorps anti-DR4 et anti-DR5. La constante de vitesse d'association (K_a) est tracée en fonction de la constante de vitesse de dissociation (K_{off}). Les lignes diagonales indiquent la constante de dissociation à l'équilibre (K_D). Les anticorps agonistes (AcM-C#16 et AcM-C#22) sont présentés en vert et les anticorps potentialisateurs (AcM-C#2, AcM-C#11, AcM-C#22 et AcMs-C#24) sont indiqués en orange.

6.5 L'anticorps C#16, agoniste de DR4, induit efficacement l'apoptose des cellules cancéreuses

6.5.1 C#16 induit l'apoptose sur différentes lignées cancéreuses

Étant donné que l'anti-DR4 C#16 est l'anticorps le plus puissant identifié dans notre criblage, ses propriétés pro-apoptotiques ont été plus amplement caractérisées dans un panel plus large de lignées cancéreuses.

La capacité de l'AcM-C#16 à induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses de lymphome (BL2), de carcinome pulmonaire (H1703), de cancer colorectal (HCT116) et enfin de cancer du sein (MDA-MB-231) a été évaluée par cytométrie en flux après un marquage à l'annexine V/7AAD (figure 6.12). Les cellules ont été traitées par des doses décroissantes de C#16, allant de 10 µg/mL à 300 ng/mL. Pour cette expérience, le pourcentage d'apoptose spontanée a été soustrait au pourcentage d'apoptose observé après traitements par C#16. La figure 6.12 A. illustre un exemple des histogrammes biparamétriques obtenus à partir des cellules BL2 et HCT116 traitées ou non par C#16 aux concentrations de 10 µg/mL, 1,5 µg/mL et 300 ng/mL. Les histogrammes en barres, correspondant à l'ensemble des traitements et des lignées cellulaires, sont présentés dans la figure 6.12 B. Il est intéressant de noter ici que l'AcM-C#16 induit une apoptose dose-dépendante dans les lignées cellulaires BL2, H1703 et HCT116, mais également, bien que dans une moindre mesure, dans les cellules MDA-MB-231. Ici encore, la lignée de lymphome de Burkitt, BL2, est la lignée la plus sensible.

La cascade d'activation des caspases a été mise en évidence par immunoblot. Pour cela, les cellules BL2, H1703 et HCT116 ont été traitées pendant 8h par TRAIL à 1 µg/mL, l'AcM-C#16 à 1 µg/mL, l'AcM-C#16 à 5 µg/mL ou l'AcM-C#1 à 5 µg/mL. Les cellules ont été récupérées, lysées puis analysées par western blot (figure 6.13). Dans ces trois lignées cellulaires, le traitement par l'AcM-C#16 induit le clivage de la procaspase initiatrice (caspase-8) et de la procaspase effectrice (caspase-3). La procaspase-9 est également clivée dans ces cellules, mais de manière moins significative sur les HCT116. Tout le processus apoptotique est engagé puisque même PARP, un des derniers substrat de la cascade, est clivé et ses produits finaux sont retrouvés (cPARP). En accord avec les résultats de cytométrie en flux, l'analyse par immunoblot démontre clairement que C#16, en se liant à DR4, est capable d'induire l'activation de la voie extrinsèque canonique. De même, la disparition de la proforme de la caspase-8, ainsi que l'apparition de produits clivés de la PARP se produisent dans les cellules BL2, H1703 ou HCT116, aussi efficacement que les cellules stimulées avec TRAIL. L'anticorps monoclonal anti-DR4 C#1 est utilisé ici comme contrôle négatif, car même à la concentration la plus élevée, et contrairement à C#16, C#1 n'induit pas la cascade de caspases ni le clivage de produits finaux tels que PARP.

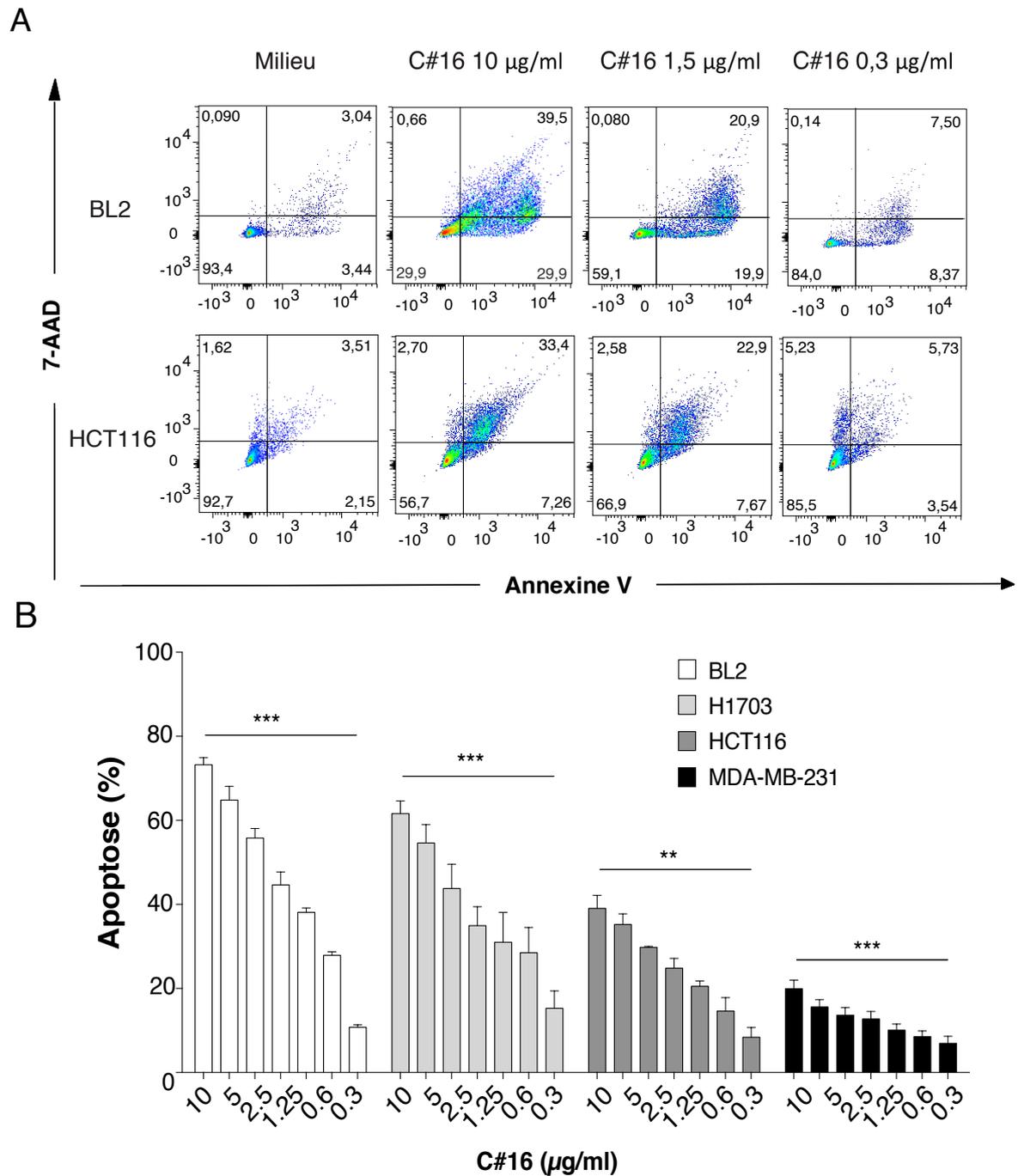


FIGURE 6.12 – Apoptose induite par l'AcM-C#16, présentation des résultats en cytométrie en flux. Les lignées cellulaires BL2, H1703, HCT116 et MDA-MB-231 ont été traitées avec des concentrations croissantes d'AcM-C#16, et l'apoptose a été quantifiée par marquage à l'annexine V - 7AAD et analysée par cytométrie en flux. Les effets ont été évalués par des tests statistiques ANOVA. ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ ($n = 3$). **A.** Histogrammes biparamétriques ou dotplot obtenus pour les traitements de l'AcM-C#16 à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur les cellules BL2 et HCT116. **B.** Histogrammes bâtons correspondant à tous les traitements.

De plus,, une petite quantité de Mapatumumab étant disponible au laboratoire, il a été possible d'étudier par cytométrie en flux sur des BL2 l'effet d'une concentration croissante de C#16 par rapport au Mapatumumab (figure 6.13 B). L'AcM-C#16 est au moins aussi efficace que le Mapatumumab pour induire l'apoptose dans les cellules BL2.

Au vu des résultats *in-vitro* encourageants, la capacité de cet anticorps à inhiber la croissance tumorale *in-vivo* a été évaluée.

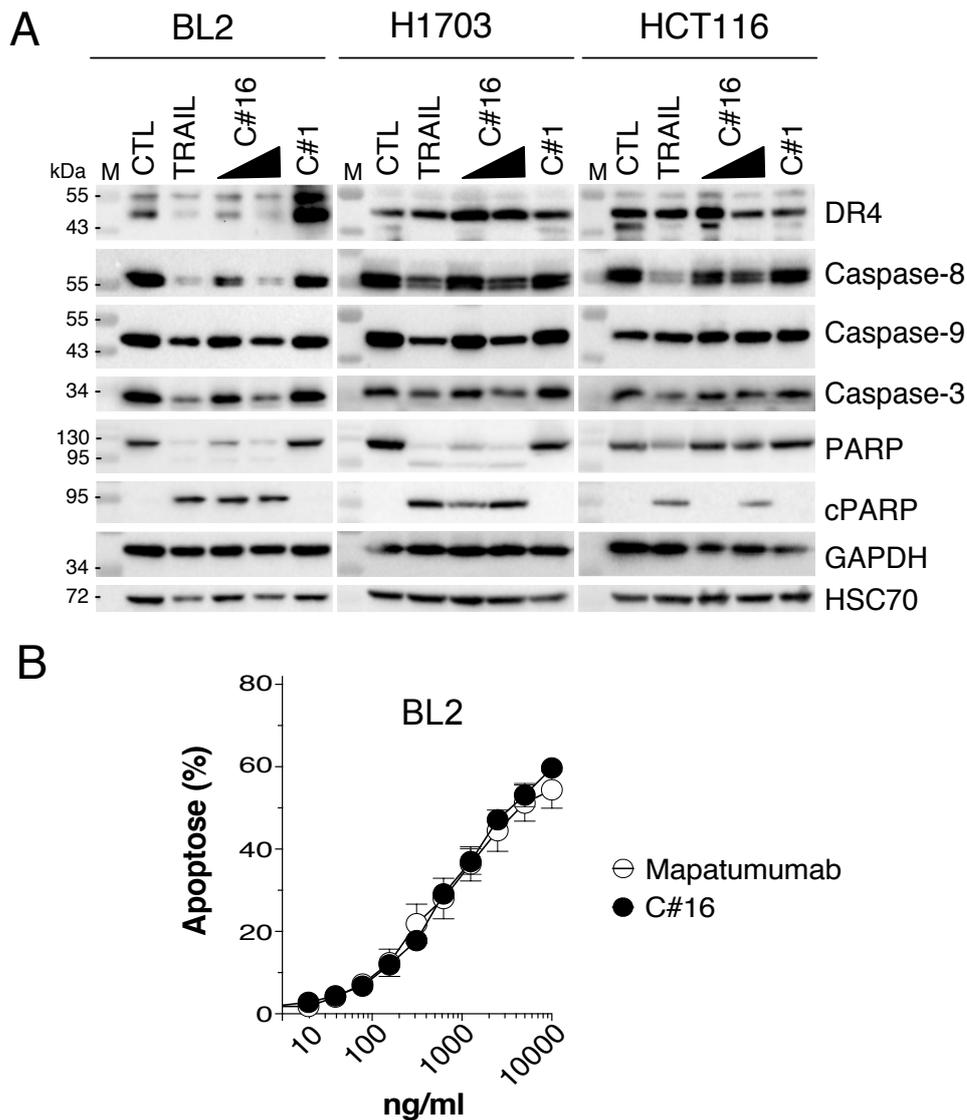


FIGURE 6.13 – Apoptose induite par l'AcM-C#16, présentation des résultats en western blot. **A.** Les cellules BL2, H1703 et HCT116 ont été stimulées avec 1 µg /mL de TRAIL, 1 µg /mL d'AcM-C#16, 5 µg /mL d'AcM-C#16 ou 5 µg /mL d'AcM-C#1 pendant 8 h. Les extraits cellulaires correspondants ont été analysés par immunoblot. **B.** La lignée cellulaire de lymphome BL2 a été traitée avec une concentration croissante d'AcM-C#16 ou de Mapatumumab, et l'apoptose a été quantifiée avec un marquage à l'annexine V - 7AAD par cytométrie en flux. Toutes les expériences ont été réalisées au moins trois fois.

6.5.2 L'AcM-C#16 (anti-DR4) ralentit la pousse tumorale

Les résultats *in-vitro* démontrant une forte capacité d'induction de l'apoptose de l'AcM-C#16 sur les cellules BL2, nous avons décidé d'évaluer son activité thérapeutique *in-vivo* par des xénogreffes sur des souris NUDE. Deux expériences différentes ont été réalisées : une première dite « pré-établie », dont les traitements ont commencé lorsque la tumeur a atteint environ 100 mm³, et une seconde appelée *de novo* où les injections ont commencé 4 jours après les implantations tumorales.

Dans la première expérience, lorsque les tumeurs ont atteint un volume d'environ 100 mm³, les souris ont été traitées par des injections en intrapéritonéal (i.p.) par 10 mg/kg de l'AcM-C#16, ou par une solution saline tous les 4 jours (figure 6.14). Par conséquent, les traitements ont commencé au jour 16 et 5 injections ont été effectuées (flèches rouges sur la figure 6.14 A). Dans la figure 6.14 A, on peut voir l'effet antitumoral de l'AcM-C#16 sur la croissance des tumeurs BL2 pré-établies. Au jour 34, soit deux jours après la dernière injection, nous avons obtenu une activité antitumorale significative, entraînant une perte de croissance tumorale d'environ 30%. Afin de vérifier l'efficacité de l'injection par voie i.p., la présence d'anticorps dans la circulation sanguine des souris a été testée par ELISA. Un prélèvement sanguin a été effectué 24h après la deuxième injection (J21). Le sérum des souris a ensuite été récolté puis testé par ELISA sur DR4-Fc. Les valeurs ont été relevées à partir d'une D.O. > 0.7. Les résultats présentés sur la figure 6.14 B montrent bien un titre sur DR4-Fc à partir des sérums de souris traitées par l'AcM-C#16. Aucune reconnaissance n'a été observée à partir de sérum de souris traitées par la solution saline. Grâce à ce test, nous pouvons donc affirmer que l'AcM-C#16 se retrouve bien dans la circulation sanguine, au moins 24h après une injection en i.p. De manière surprenante, le poids des tumeurs à la fin de l'expérience n'a pas démontré de différence significative entre les souris traitées avec l'AcM-C#16 (d'une moyenne de 0,6 mg) et les souris non traitées (d'une moyenne de 0,8 mg), mais une tendance est toutefois observable (figure 6.14 D).

Dans un second temps, nous avons étudié le potentiel de l'AcM-C#16 à inhiber la croissance tumorale *de novo*. Pour cette expérience, les traitements avec l'AcM-C#16 ou la solution saline (témoin) injectés en i.p. ont commencé au jour 4 après l'inoculation de la tumeur. Ainsi 6 injections ont été effectuées tous les 4 jours (flèches rouges, figure 6.15 A). L'effet sur la croissance tumorale a été analysé jusqu'au jour 34. Comme exposé sur la figure 6.15 A, le traitement de l'AcM-C#16 inhibe efficacement la croissance des cellules BL2 *de novo*. Une inhibition significative de la croissance tumorale a été observée à partir du jour 26, deux jours après la dernière injection de l'AcM-C#16. Une forte activité antitumorale avec une réduction drastique du volume tumoral d'environ 50% a pu être observée au jour 28, et allant jusqu'à 75% au jour 34. Les tumeurs du groupe non traité (en haut) et du groupe traité par l'AcM-C#16 (en bas) extraites au jour 34 sont présentées à droite de la figure 6.15 A. En accord avec ces résultats, le poids des tumeurs

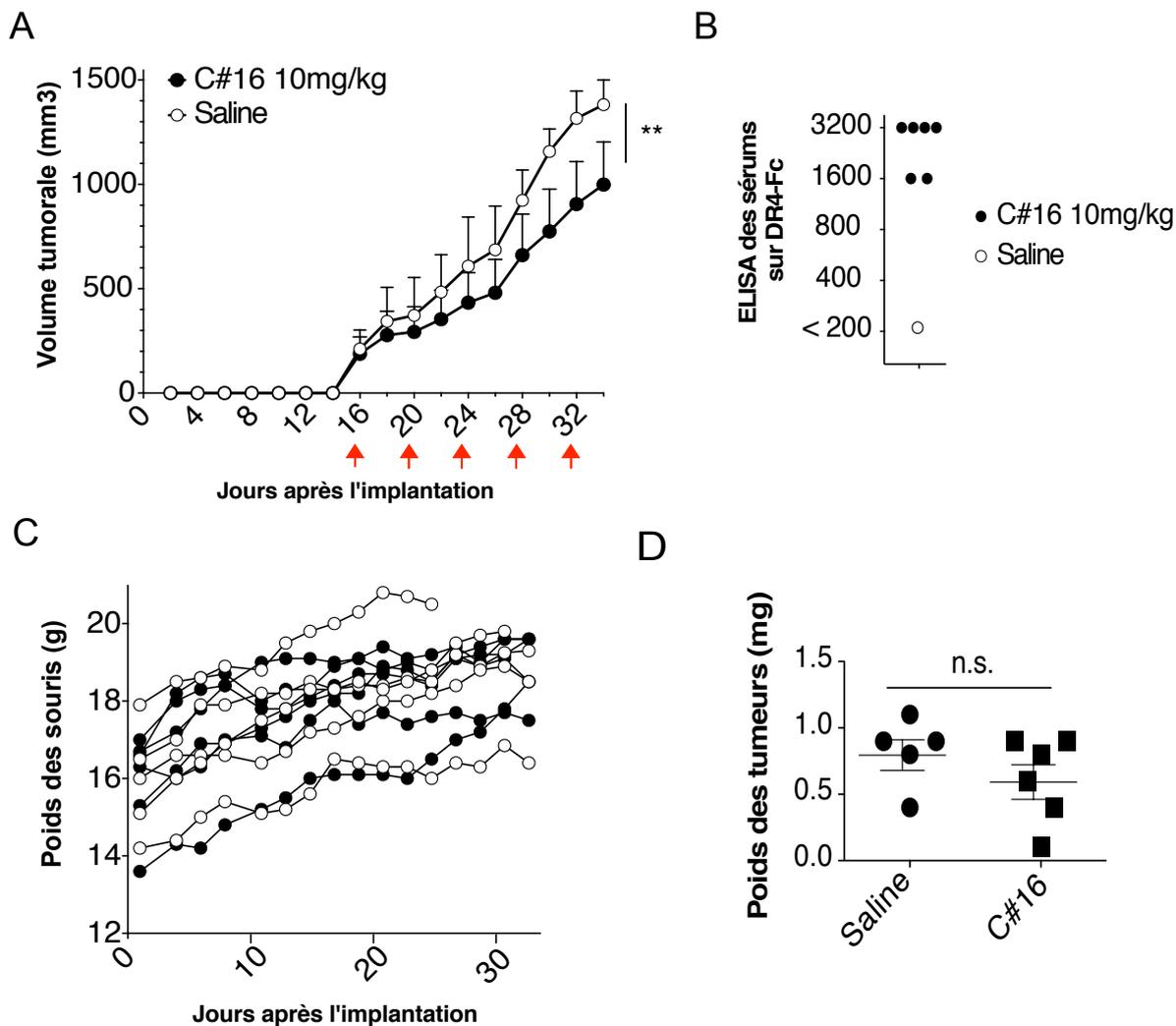


FIGURE 6.14 – L’AcM-C#16 réduit la croissance tumorale dans les modèles de xénogreffes pré-établies. Les cellules BL2 mélangées avec du matrigel ont été inoculées en s.c. dans le flanc droit des souris au jour 0. Les souris ont ensuite été randomisées en groupes de cinq à six souris et ont reçu une injection i.p. avec l’AcM-C#16 (10 mg /kg) ou véhicule témoin (PBS) aux temps indiqués (flèches rouges). Chaque point représente la valeur moyenne (\pm s.e.m.) des tailles de tumeurs au jour de la mesure. Les animaux ont été sacrifiés 34 jours après l’inoculation. **A.** Croissance tumorale de xénogreffes pré-établies. La significativité a été évaluée par des tests ANOVA. ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$. **B.** Test ELISA à partir de sérums de souris des tumeurs pré-établies, prélevés à J21. Les sérums ont été dilués et testés sur DR4-Fc. Les résultats présentent la dilution obtenue pour une D.O. $> 0,7$. **C.** Poids corporels des souris **D.** Comparaison des poids des tumeurs après sacrifice des souris ayant reçu une injection de solution saline (saline) et celles ayant reçues un injection d’AcM-C#16 à 10 mg /kg (C#16). La significativité a été testée en utilisant le test t de Student non apparié.

extraites chez les souris traitées avec l’AcM-C#16 a été fortement et significativement réduit par rapport aux tumeurs extraites des souris témoins traitées au PBS (figure 6.15 C).

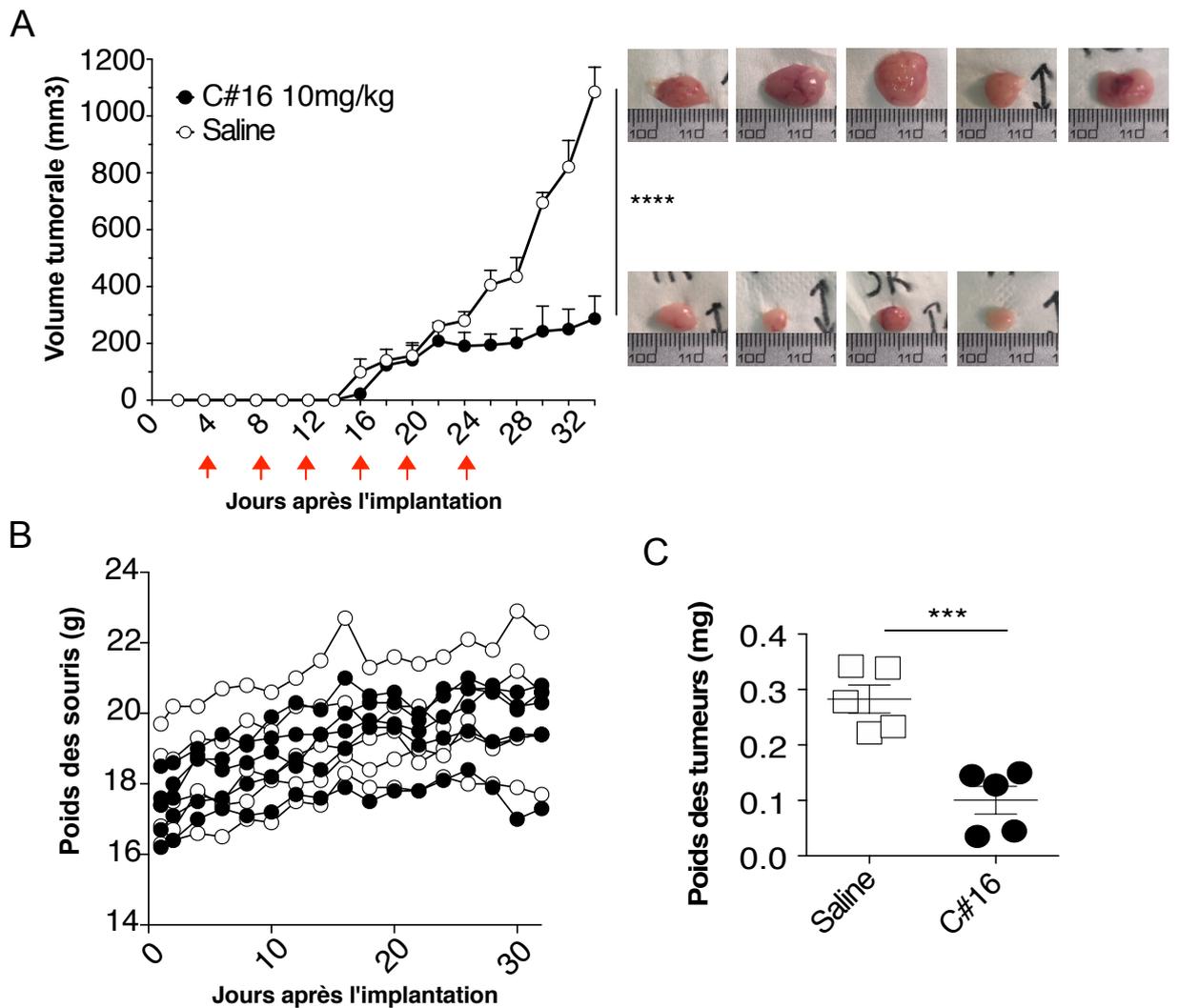


FIGURE 6.15 – L'AcM-C#16 réduit la croissance tumorale dans les modèles de xénogreffes *de novo*. Les cellules BL2 mélangées avec du matrigel ont été inoculées en s.c. dans le flanc droit des souris au jour 0. Les souris ont ensuite été randomisées en groupes de cinq à six souris et ont reçu une injection i.p. avec l'AcM-C#16 (10 mg/kg) ou véhicule témoin (PBS) aux temps indiqués (flèches rouges). Chaque point représente la valeur moyenne (\pm s.e.m.) des tailles de tumeurs au jour de la mesure. Les animaux ont été sacrifiés 34 jours après l'inoculation. **A.** Croissance de la tumeur des modèles *de novo* et tumeurs correspondantes. Les effets ont été évalués par des tests statistiques ANOVA. ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$. **B.** Poids corporels des souris. **C.** Comparaison des poids des tumeurs après sacrifice des souris ayant reçu une injection de solution saline (saline) et celles ayant reçu un injection d'AcM-C#16 à 10 mg/kg (C#16). La significativité a été testée en utilisant le test t de Student non apparié.

Enfin, les courbes de poids des souris (figure 6.14 C et 6.15 B), dans chacune de ces expériences, permettent de constater que l'AcM-C#16, à cette concentration, n'a exercé aucune cytotoxicité ni d'effets secondaires. Le poids de chacune des souris a continué d'augmenter pendant les expériences, indépendamment des injections de l'AcM et l'observation macroscopique des organes des souris après sacrifice n'a décelé aucune cytotoxicité.

Les résultats du test ELISA sur les sérums des souris traitées ainsi que les exemples les plus représentatifs des tumeurs *in situ* de chacune des expériences sont présentés dans l'annexe F.

6.6 Conclusion intermédiaire

Avant d'aborder la discussion, il m'a semblé nécessaire de reprendre succinctement les résultats auxquels nous sommes parvenus. Les différentes expériences que nous avons conduites dans ce travail nous ont permis de montrer que :

- l'**immunisation génique**, en comparaison avec les approches conventionnelles, préserve mieux la forme de la protéine d'intérêt ainsi que ses modifications post-traductionnelles. Elle permet ainsi, non seulement la génération d'anticorps reconnaissant des protéines transmembranaires, mais aussi d'anticorps présentant des **propriétés pharmacologiques** ;
- les anticorps anti-DR4 et anti-DR5, générés en utilisant cette approche ADN, sont capables de lier leur cible natives avec une **forte affinité** ;
- 5 anticorps anti-DR4 et anti-DR5 présentent également des **activités thérapeutiques intéressantes**, et ce malgré le nombre plutôt limité de clones purifiés ;
- les 2 anticorps anti-DR4 (AcM-C#16) et anti-DR5 (AcM-C#22) **agonistes** permettent d'induire la voie apoptotique dépendante des caspases sur **tout un panel** de lignées cellulaires cancéreuses, sans réticulation secondaire ;
- l'anticorps agoniste anti-DR4 AcM-C#16 présente l'activité apoptotique la **plus forte** et permet de **ralentir la pousse tumorale *in-vivo*** sur des modèles de xenogreffes ;
- les 4 anticorps **potentialisateurs** anti-DR4 (AcM-C#2 et C#11) et anti-DR5 (AcM-C#22 et C#24) sont capables d'augmenter le potentiel pro-apoptotique de TRAIL sur des lignées tumorales sensibles à TRAIL ;
- ces anticorps potentialisateurs sont également capables de **restaurer la sensibilité de lignées résistantes** ;
- 3 anticorps sont potentiellement **antagonistes**, un anti-DR4 (AcM-C#5) et deux anti-DR5 (AcM-C#21 et C#23).

Quatrième partie

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Importance de la multimérisation des récepteurs pour l'induction de la voie pro-apoptotique

L'engagement des récepteurs de mort agonistes DR4 et DR5 à la surface cellulaire est la première étape pour amorcer le processus apoptotique. Il est aujourd'hui bien décrit que la multimérisation des récepteurs de mort DR4 et DR5 est un élément essentiel à l'induction robuste de l'apoptose. Les récepteurs doivent au minimum être présents sous forme de trimères afin de déclencher un signal pro-apoptotique. De plus en plus d'études montrent qu'une réticulation plus importante des récepteurs [Graves et al., 2014] [Tamada et al., 2015], ainsi que leur maintien à la surface cellulaire [Austin et al., 2006], permettent d'engager plus efficacement la voie apoptotique. On peut supposer que cette multimérisation permet l'agrégation d'un plus grand nombre de domaines de mort (DD) au niveau intracellulaire (cf. figure 1.9). Ces DD pourraient alors recruter et activer un nombre plus important de procaspase-8, amplifiant le signal pro-apoptotique. Quant à l'internalisation des complexes, elle permet de réguler le processus apoptotique. En créant une structure volumineuse, l'oligomérisation peut empêcher les complexes d'être internalisés. Le message apoptotique perdure plus longtemps à la surface cellulaire, et la procaspase-8 présente alors une plus grande probabilité d'être recrutée, résultant en un signal pro-apoptotique plus intense.

Les anticorps étant par nature dimériques, ils ne peuvent recruter que deux récepteurs au maximum. Ils sont donc, en majorité, incapables de multimériser les récepteurs. Cette caractéristique pourrait expliquer le manque d'activité des anticorps testés en clinique aujourd'hui. Pour être actifs, ces anticorps nécessitent en général une réticulation secondaire, via des agents réticulants ou via la liaison aux récepteurs Fc γ [Wajant, 2015]. Il est donc nécessaire de produire des anticorps anti-DR4 et anti-DR5 présentant des caractéristiques plus performantes, avec la capacité de reconnaître la forme tridimensionnelle des récepteurs ainsi qu'à les multimériser. Ces caractéristiques doivent être prises en compte dès le début du développement d'anticorps. Pour ce faire, l'immunisation ADN représente une solution intéressante car elle permet l'expression native et conformationnelle des protéines d'intérêt.

2. La méthode d'immunisation génique permet de générer des anticorps conformationnels

L'immunisation ADN consiste à injecter à des souris des plasmides codant pour la protéine d'intérêt. Ces plasmides intègrent les cellules murines pour une expression *in situ* de la protéine. Les modifications post-traductionnelles et le bon repliement des protéines produites *in situ* permettent d'exprimer les récepteurs sous leur conformation native. Cette technique permet non seulement la génération d'anticorps reconnaissant les protéines transmembranaires, mais également d'anticorps présentant des propriétés

pharmacologiques.

Cette immunisation peut être effectuée de différentes manières, en fonction des composants du plasmide ainsi que de la voie et du mode d'administration. L'équipe de Piechoki a démontré que l'électrovaccination intramusculaire de plasmides encodant DR5 permet d'obtenir un sérum capable d'induire la cascade apoptotique *in-vitro* et de ralentir potentiellement la croissance tumorale *in-vivo* dans une lignée de cancer du sein triple négatif [Piechocki et al., 2012]. Bien que l'objectif final de cette étude ait été une vaccination anticancéreuse et non pas une production d'anticorps, ces résultats encouragent l'utilisation de la méthode ADN pour le développement d'anticorps ciblant le système TRAIL-TRAILRs. Hazen et ses collaborateurs ont présenté l'utilisation de l'immunisation ADN hydrodynamique par la veine de la queue (méthode HTV) pour le développement d'anticorps contre une protéine multimembranaire complexe, MRP4 (multidrug resistance protein 4) [Hazen et al., 2014]. En utilisant les immunostimulants GM-CSF et le mFLT3 cette étude a démontré que l'immunisation ADN HTV permet l'expression prolongée d'une quantité importante de protéines *in situ*, majoritairement au niveau des hépatocytes murins, sans nécessiter d'électroporation.

La méthode d'immunisation ADN HTV est par conséquent particulièrement intéressante pour le développement d'anticorps ciblant DR4 et DR5. Elle pourrait ainsi permettre de générer des anticorps reconnaissant non seulement des monomères DR4 et DR5 sous leur forme native mais également les épitopes responsables de la multimérisation de ces récepteurs, s'ils existent. De manière encore plus intéressante, cette technique permet d'exprimer les récepteurs à la surface des hépatocytes murins, on peut alors supposer que ceux-ci se comportent comme lorsqu'ils sont exprimés à la surface de cellules cancéreuses. Ces récepteurs pourraient alors former des complexes pré-assemblés via leur domaine PLAD, comme il a été proposé sur les cellules cancéreuses. On peut alors imaginer que les anticorps générés avec la méthode ADN pourraient reconnaître non seulement un épitope spécifique d'un monomère DR4 ou DR5 mais également une région propre aux récepteurs pré-assemblés. Les anticorps seraient ainsi capables de réticuler plus efficacement un nombre plus important de récepteurs.

Dans ce contexte, nous nous sommes appliqués à développer un panel de nouveaux anticorps monoclonaux anti-DR4 et anti-DR5 en utilisant la méthode d'immunisation par ADN HTV. En se basant sur la méthodologie d'Hazen [Hazen et al., 2014], deux protocoles différents ont été utilisés. Le premier, pour l'immunisation DR4-pCR3, est composé de 4 injections de plasmides encodant la séquence entière du DR4 suivi de 6 rappels protéiques avec la partie extracellulaire du DR4 (DR4c). La fusion d'une rate nous a permis d'isoler 17 hybridomes d'intérêt. Le second, pour l'immunisation DR5-pCAGGS, est constitué d'une première injection de mFLT3 suivi de 4 injections de plasmides contenant la séquence du DR5 entier. Pour ce protocole, des plasmides pCAGGS ont été construits et utilisés afin d'espacer les injections sans compromettre la réponse humorale. Ici deux

types de rappels ont été utilisés : deux injections supplémentaires d'ADN DR5-pCAGGS ou deux injections protéiques contenant le domaine extracellulaire de DR5 sous forme clivé (DR5c). Trois rates ont été sélectionnées et fusionnées, une après les 4 injections de DR5-pCAGGS (2V), une seconde après les deux rappels ADN DR5-pCAGGS (1Blc) et une dernière après les deux rappels protéiques DR5c (2Blc). Pour ce protocole, un nombre plus limité de clones a été sélectionné puisque 4 hybridomes ont démontré une capacité à se lier à la forme native de DR5. La fusion issue de la première rate (2V) a généré un clone positif et la fusion 1Blc a permis d'obtenir les trois autres. La dernière fusion (2Blc) n'a pas produit de clone d'intérêt. L'ensemble de ces fusions nous a permis de générer 21 clones d'intérêt.

L'objectif n'était pas de comparer les différents protocoles mais bien **d'obtenir des anticorps spécifiques de DR4 ou DR5**. Il nous est donc difficile de conclure ici sur le protocole à utiliser, et en particulier pour les raisons suivantes :

- la protéine utilisée étant différente, il n'est pas possible de comparer le protocole DR5-pCAGGS au protocole DR4-pCR3. Même si le protocole DR5-pCAGGS inclut des rappels protéiques, les écarts observés pourraient provenir de l'immunogénicité intrinsèque de la protéine et non pas du schéma d'immunisation.
- la conformation de DR5c est peut être trop éloignée de la forme native du récepteur. Les tests de validation des récepteurs recombinants ont montré que la protéine DR5c était moins efficace pour inhiber TRAIL (figure 5.12). Par conséquent, les rappels protéiques n'ont peut-être pas permis de stimuler le système immunitaire de la souris convenablement, conduisant à des anticorps moins performants.
- l'utilisation du pCAGGS n'a peut-être pas permis une expression prolongée de la protéine d'intérêt ; toutefois, le titre sérique augmente sans qu'une nouvelle injection DR5-pCAGGS n'ait été faite, ce qui n'est pas le cas pour les injections DR4-pCR3. Nous pouvons donc supposer ici que DR5 a bien été produit de façon prolongée.

Néanmoins, il est montré ici pour la première fois que l'immunisation ADN HTV est efficace pour générer des anticorps anti-DR4 et anti-DR5 conformationnels.

Tous les anticorps produits reconnaissent spécifiquement leur cible respective, ils pourront donc être vectorisés (figure 6.16). La première approche intéressante serait de les **immunoconjuguer** en leur greffant des molécules chimiques. Ils pourraient ainsi cibler et libérer l'agent cytotoxique directement au niveau de la tumeur. De manière alternative, des options visant à « mimer » la version membranaire de TRAIL à l'aide de structures nanométriques sont en cours de développement [Belkahla et al., 2017]. **Greffer les anticorps sur des nanoparticules de fer** pourrait également se révéler une approche intéressante. Les anticorps seraient alors convenablement réticulés, et les nanoparticules de fer, associées à des traitements hyperthermiques, apporteraient un avantage thérapeutique [Morle et al., 2015] [Lin et al., 2018].

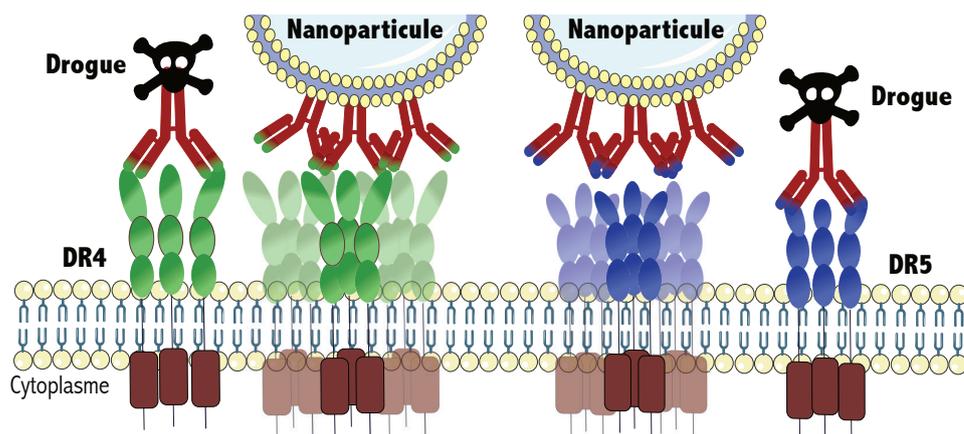


FIGURE 6.16 – Vectorisation des anticorps anti-DR4 et anti-DR5, soit par des drogues, soit à la surface de nanoparticules permettant de les multimériser.

3. Affinités et activités des cinq anticorps présentant un potentiel thérapeutique

Les 21 anticorps anti-DR4 et anti-DR5 générés se lient spécifiquement à leur propre cible, DR4 ou DR5 respectivement, et se sont avérés ne reconnaître que la forme native des récepteurs. Parmi ces 21 anticorps, 5 clones d'intérêt, capables d'induire la mort cellulaire par apoptose seuls ou en combinaison avec TRAIL, lient leur cible avec une affinité variant de 20 pM à 2 nM. Nous pouvons considérer que ces affinités sont fortes car elles sont globalement équivalentes ou supérieures à celles des anticorps anti-DR4 et anti-DR5 développés précédemment (table 6.2). Les affinités présentées dans ce tableau sont néanmoins à utiliser à titre uniquement indicatif car, même si la plupart des études ont utilisé des biocapteurs, les méthodes (ELISA, SPR, FACS, etc.) et les formats (constructions monomériques ou dimériques) utilisés ne sont pas tous identiques.

TABLE 6.2 – Affinité des différents anticorps anti-DR4 et anti-DR5 développés

Cible	Anticorps	Affinité	Références
DR4	4H6	20 pM	[Chuntharapai et al., 2001]
	4G7	5 pM	[Chuntharapai et al., 2001]
	AY4	7,1 nM	[Sung et al., 2009]
	TR1-419	210 nM	[Hao et al., 2016]
DR5	Lexatumumab	3,3 nM	[Shivange et al., 2018]
	Apomab	0,9 nM	[Adams et al., 2008]
	LBY135	8 nM	[Li et al., 2008]
	DS-8273a	0,1 nM	[Burvenich et al., 2016]

Les trois anticorps anti-DR4 (AcM-C#2, AcM-C#11 et AcM-C#16) et les deux anticorps anti-DR5 (AcM-C#22 et AcM-C#24) que nous avons développés présentent des propriétés de liaison différentes (cf. figure 6.11). Les résultats des différentes constantes d'association et de dissociation ont montré qu'ils se lient probablement à différents épitopes. La constante d'association de ces 5 clones est assez similaire, à l'exception de C#16, toutefois leurs caractéristiques de dissociation diffèrent sensiblement de 7.10^{-7} à 4.10^{-4} (s^{-1}). Alors que le clone C#16 se lie à sa cible avec moins d'avidité, son affinité globale est élevée en raison de son faible taux de dissociation. Les potentialisateurs DR4 (AcM-C#2 et AcM-C#11) sont tous deux associés et dissociés très rapidement de leur cible, tout en présentant une affinité 100 fois inférieure à celle de C#16. Les paramètres cinétiques des potentialisateurs anti-DR5, AcM-C#22 et AcM-C#24 sont, quant à eux, clairement différents. Avec un taux d'association légèrement inférieur et un taux de dissociation globalement plus faible, ces activateurs présentent une affinité de 10 à 100 fois supérieure à celle des potentialisateurs DR4. Bien qu'il reste à déterminer si l'AcM-C#2 et l'AcM-C#11 se lient au même épitope, il est peu probable que ce soit le cas pour l'AcM-C#24 et l'AcM-C#22. Leur constante d'affinité est différente et l'activité biologique de C#22 est spécifique car il affiche à la fois des propriétés agonistes et synergiques. Conformément à une étude récente montrant que l'effet antitumoral des anticorps agonistes DR4 n'est pas corrélé avec l'affinité en soi, mais plutôt avec la reconnaissance des épitopes, les paramètres cinétiques des différents anticorps produits et analysés dans notre étude ne prédisent pas leurs propriétés biologiques, suggérant qu'ils pourraient reconnaître différents épitopes [Piao et al., 2016]. Il sera cependant nécessaire d'effectuer des tests complémentaires comprenant davantage d'anticorps pour statuer sur la relation entre l'affinité et l'activité.

Les travaux présentés ici montrent que les anticorps anti-DR4 et anti-DR5 générés présentent des activités distinctes. Ces anticorps ciblent donc sûrement des épitopes différents. **L'identification des épitopes des 5 anticorps** d'intérêt est un élément important qu'il faudra déterminer par la suite. Ces informations nous donneront des indications cruciales sur les phénomènes entrant en jeu dans l'activité des anticorps. Plusieurs hypothèses concernant le mode d'action de ces anticorps peuvent être établies. Elles sont présentées dans les paragraphes suivants. Toutefois, afin d'éclaircir le mode d'action de ces 5 anticorps, il serait intéressant **d'analyser et de caractériser les différentes structures** formées entre les récepteurs et les anticorps. Pour ce faire, il serait possible d'effectuer des immunoprécipitations (IP) afin de quantifier les éléments contenus dans les DISC formés, à savoir DR4, DR5, FADD, la caspase-8 et c-FLIP. On pourrait également coupler les anticorps ou les récepteurs à des fluorochromes afin d'évaluer leur répartition, ainsi que l'internalisation des complexes. Enfin, des analyses cristallographiques nous permettraient d'obtenir les structures des complexes formés. Les 5 anticorps d'intérêt pourraient également être **testés en combinaison avec des chimiothérapies** (cisplatine, 5-FU, topotecan, etc.) afin d'augmenter leur action.

Ce travail a confirmé que le mécanisme de mort cellulaire de ces cinq anticorps était dû à une apoptose associée aux caspases. L'ensemble des données de la littérature et cliniques, ainsi que la spécificité de nos anticorps suggèrent que les traitements ciblant DR4 ou DR5 épargnent les cellules saines. Il serait toutefois nécessaire de **tester la toxicité** de ces anticorps **envers les cellules normales**.

Au-delà des tests caractéristiques, ces anticorps pourront tous par la suite être optimisés. Dans un premier temps, il sera nécessaire de **chimériser ou d'humaniser** ces anticorps et de confirmer que leurs effets sont identiques à ceux observés avec les anticorps parentaux murins. Dans un second temps, les fragments Fab et Fc de chacun des 5 anticorps prometteurs pourront être **optimisés par ingénierie des anticorps**. Au niveau de leur Fab, l'affinité des AcM envers leur épitope pourra être augmentée. Au niveau de leur fragment constant, l'affinité des anticorps envers les récepteurs des cellules immunitaires (Fc γ R) pourra être améliorée, augmentant leur capacité à être réticulés ou à induire les mécanismes dépendants du fragment constant (ADCP, ADCC et/ou CDC).

4. Activité agoniste des deux anticorps AcM-C#16 et AcM-C#22

4.1. Deux anticorps agonistes

La plupart des anticorps agonistes ciblant les récepteurs agonistes de TRAIL nécessitent une réticulation par immobilisation ou par une immunoglobuline pour révéler leur potentiel pro-apoptotique [Wajant, 2015]. Nous avons montré ici que les deux anticorps agonistes que nous avons produits, l'AcM anti-DR5 C#22 et l'AcM anti-DR4 C#16, pouvaient induire la mort cellulaire en l'absence de réticulation dans les lignées de cancer colorectal (HCT116) et de lymphome B (BL2). Ces résultats sont particulièrement encourageants compte tenu du nombre limité d'hybridomes criblés. Ces anticorps agonistes se sont avérés déclencher, sélectivement par DR4 ou DR5, l'apoptose classique dépendante des caspases, d'une manière dose-dépendante. Néanmoins, dans la lignée cellulaire de carcinome du sein MDA-MB-231, l'AcM-C#16 et l'AcM-C#22 seuls, sont moins efficaces. Toutefois, cette lignée cellulaire est naturellement résistante à l'apoptose induite par TRAIL, sûrement parce qu'elle exprime fortement l'inhibiteur intracellulaire de la caspase-8, c-FLIP [Morle et al., 2015]. Il n'est donc pas étonnant que le traitement par les AcM agonistes ne permette pas d'induire de mort cellulaire sur cette lignée. Il faut également noter que Mapatumumab, le seul anti-DR4 évalué en clinique, aussi efficace que l'AcM-C#16 dans l'induction de l'apoptose dans les cellules BL2, s'est avéré lui aussi peu efficace pour déclencher l'apoptose dans les cellules MDA-MB-231 (moins de 10% d'apoptose) [Dufour et al., 2017a]. L'ajout des AcM seul ne permet donc pas de contourner la résistance de ces cellules. Ces deux anticorps étant capables de transduire un signal apoptotique important, il serait intéressant de tester la **combinaison** de l'AcM-C#16 et de l'AcM-C#22. Si cette association présente un bénéfice dans l'induction de l'apoptose,

la construction d'**anticorps bi-spécifiques DR4-DR5** via ces deux anticorps pourrait être une perspective intéressante. Enfin, en permettant une réticulation supplémentaire des AcM, le **greffage** de ces anticorps sur des nanoparticules pourrait également être prometteur (figure 6.16).

4.2. Activités et modes d'actions de l'anticorps agoniste AcM-C#16

Dans la lignée BL2, l'AcM-C#16 (anti-DR4) induit plus fortement l'apoptose que l'AcM-C#22 (anti-DR5). Ce résultat est en accord avec d'autres études qui ont démontré que DR4 a un plus fort potentiel que DR5 pour transduire le signal apoptotique [Dufour et al., 2017a]. L'AcM-C#16 est capable d'induire l'apoptose dans un large panel de cellules cancéreuses. Mapatumumab, le seul anti-DR4 évalué en clinique, est aussi efficace que l'AcM-C#16 dans l'induction de l'apoptose dans les cellules BL2. Il a également été testé sur les lignées HCT116, H1703 et MDA-MB-231, et à la concentration de 5 µg/mL, il induit une apoptose d'environ 55%, 10% et 20%, respectivement [Dufour et al., 2017a]. Mise à part les cellules MDA-MB-231, ces résultats sont différents de ceux observés avec l'AcM-C#16. Sur les cellules HCT116, l'AcM-C#16 induit une apoptose avoisinant 35% alors que le pourcentage d'apoptose atteint plus de 50% sur la lignée H1703. Ces résultats suggèrent que ces deux anticorps ciblent des épitopes différents, il faudrait cependant les comparer dans les mêmes conditions expérimentales pour conclure définitivement.

Cette étude nous a permis de montrer que l'anti-DR4 agoniste AcM-C#16 induit une forte activité pro-apoptotique dans les cellules tumorales non-seulement *in-vitro* mais également *in-vivo*. L'AcM-C#16 peut déclencher une apoptose très efficace dépendante des caspases dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines. Il a donc été testé *in-vivo* sur la lignée cellulaire BL2. Les résultats ont montré que l'AcM-C#16 pouvait réduire la progression des tumeurs pré-établies et inhiber la croissance de la tumeur *de novo*. Il représente donc un réel potentiel thérapeutique. Pour confirmer cela, il faudrait **tester son activité tumoricide *in-vivo* sur d'autres lignées tumorales.**

Le mode d'action de l'AcM-C#16 reste à définir. Cependant, deux hypothèses peuvent être établies.

La première hypothèse est que l'AcM-C#16 se fixerait sur le même site que TRAIL, entraînant la même réponse. Dans les expériences d'apoptose par marquage annexine V/7-AAD sur la lignée BL2, on ne voit pas d'effet additif lorsque TRAIL est ajouté au traitement avec cet anticorps. Le pourcentage d'apoptose est le même, à savoir environ 70%, alors que sur ces mêmes cellules le traitement par l'AcM-C#24 atteint environ 90%. Le système n'est donc pas saturé à 70% d'apoptose. Cependant, sur les tests au bleu de méthylène, l'ajout du TRAIL à plus forte concentration ne permet d'observer qu'un faible effet additif. Il serait donc possible que l'AcM-C#16 se fixe sur un épitope

chevauchant en partie l'épitope ciblé par TRAIL. On pourrait alors imaginer que l'AcM-C#16 ait la même action que TRAIL. De par sa forme en Y, l'anticorps a deux bras ou régions (Fab) pouvant reconnaître chacun l'épitope ciblé, il est donc dimérique. Les anticorps IgG bivalents nécessitent normalement une réticulation secondaire pour induire l'oligomérisation des récepteurs et mimer les ligands naturels. Malgré cette caractéristique, l'AcM-C#16 permet de recruter suffisamment de récepteurs pour induire une activité apoptotique efficace. Trois explications sont alors possibles (figure 6.17) :

1. l'anticorps induit un changement conformationnel sur les monomères de récepteurs, leur attribuant la capacité de s'auto-trimériser et de s'activer,
2. l'anticorps reconnaît les formes dimériques pré-assemblées déjà présentes à la surface des cellules cancéreuses, les stabilise et facilite ainsi le recrutement d'un troisième monomère qui permet d'induire, comme TRAIL, la signalisation intracellulaire efficace,
3. si des multimères pré-assemblés existent à la surface des cellules tumorales, l'anticorps pourrait reconnaître directement cette forme, la stabiliser et initier la voie apoptotique.

AcM-C#16 - Hypothèse de l'agoniste

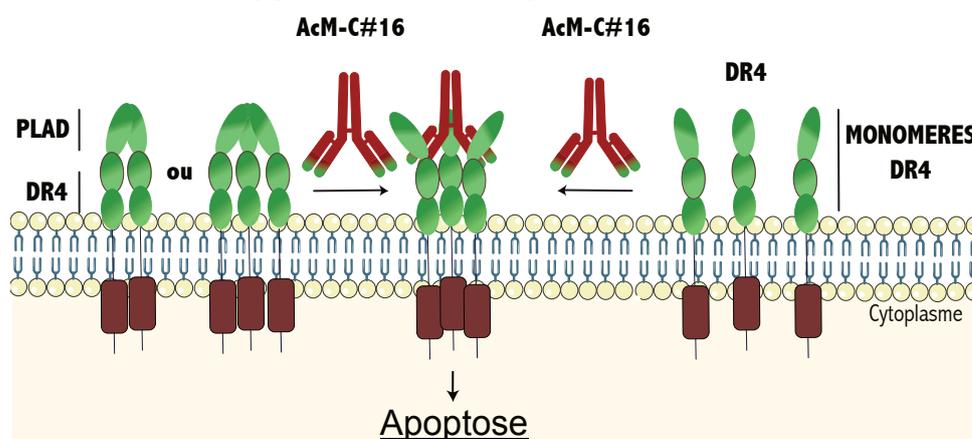


FIGURE 6.17 – Première hypothèse du mode d'action de l'anti-DR4 agoniste AcM-C#16. L'anticorps serait capable seul d'induire le changement conformationnel ainsi que l'activation des monomères, dimères ou multimères de récepteurs DR4, peut-être via leur PLAD.

La deuxième hypothèse repose sur la capacité de l'anticorps seul à réticuler plusieurs récepteurs agonistes. L'anticorps pourrait alors servir de pontage entre les différents récepteurs. Deux raisonnements sont alors possibles (figure 6.18) :

1. chacun des Fab reconnaît les formes pré-assemblées et les active ; l'anticorps est ainsi capable de s'accrocher à deux formes dimériques ou trimériques entraînant un recrutement et une multimérisation de 4, 5 ou 6 récepteurs avec 1 seul anticorps,

- comme il a été démontré avec l'anticorps KMTR2, l'anticorps pourrait être capable de s'auto-dimériser lorsqu'il est fixé à un récepteur et former une super-oligomérisation des récepteurs. Cependant, le récepteur étant différent, le phénomène de super-oligomérisation via l'anticorps lui-même n'est peut-être pas possible avec DR4.

Dans tous les cas, le pontage présenté dans la deuxième hypothèse pourrait permettre de former un DISC plus robuste et plus puissant à la surface cellulaire, mais également d'empêcher l'internalisation des récepteurs. En maintenant les complexes de récepteurs formés plus longtemps à la surface, l'induction de l'apoptose peut être amplifiée, comme il a été décrit dans les travaux de Austin [Austin et al., 2006].

AcM-C#16 - Hypothèse de la réticulation

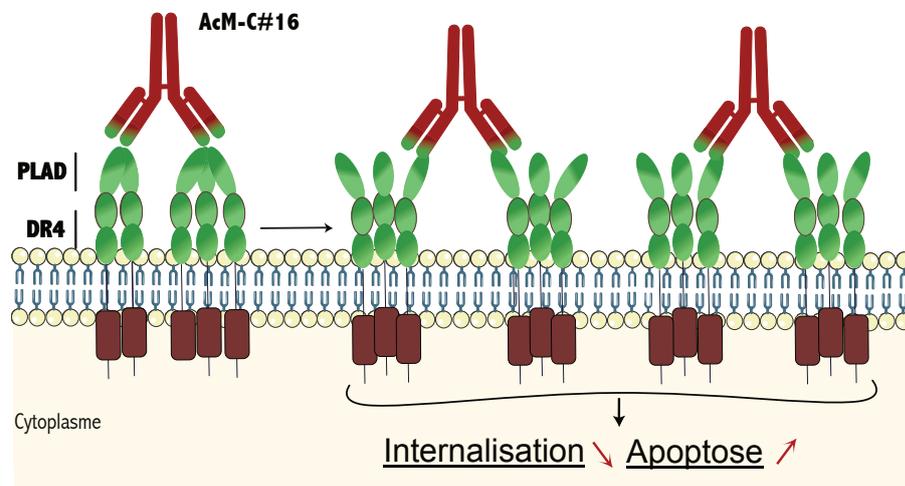


FIGURE 6.18 – Deuxième hypothèse du mode d'action de l'anti-DR4 agoniste AcM-C#16. L'anticorps serait capable seul de réticuler un nombre important de récepteurs DR4, peut-être via leur PLAD.

4.3. Activités et modes d'actions de l'agoniste AcM-C#22

En ce qui concerne l'AcM-C#22, son mode d'action doit être différent puisqu'il présente une double fonction agoniste et potentialisateur. De par sa fonction synergique, cet anticorps est non-compétitif du TRAIL. Il cible donc très certainement un épitope différent. De ce fait, la première hypothèse présentée pour l'AcM-C#16 est moins susceptible de se produire avec l'AcM-C#22. La seconde en revanche, proposant l'anticorps comme pontage pour multimériser les récepteurs est plus probable (figure 6.19). Comme cet anticorps cible DR5, on peut plus aisément émettre l'hypothèse qu'il puisse agir comme KMTR2, d'autant que dans l'étude effectuée avec KMTR2, il a été démontré que DR5 était pré-assemblé, et ce, majoritairement sous forme d'homodimères. Toutefois, l'effet apoptotique (de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{mL}$) étant inférieur à celui observé avec KMTR2 (de l'ordre du ng/mL), l'oligomérisation doit être moins importante [Tamada et al., 2015].

AcM-C#22 - Hypothèse de la réticulation

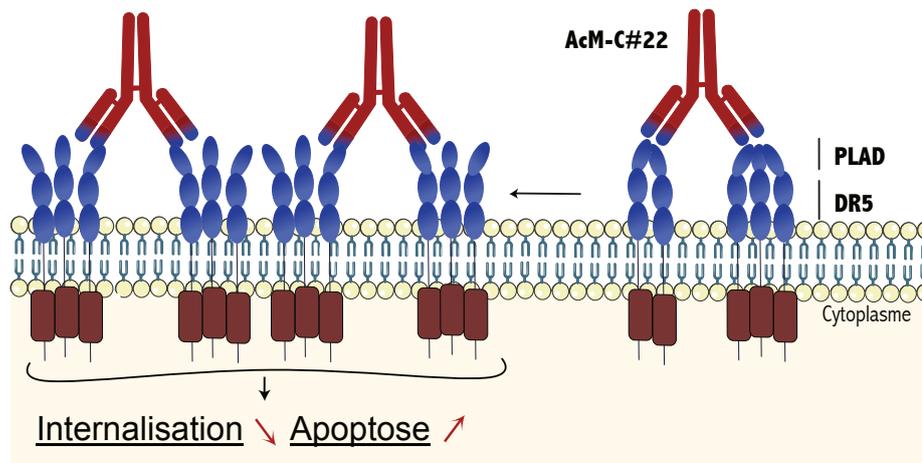


FIGURE 6.19 – Deuxième hypothèse du mode d'action de l'anti-DR5 agoniste AcM-C#22. L'anticorps serait capable seul de réticuler un nombre important de récepteurs DR5, peut-être via leur PLAD.

Le deuxième mode d'action de l'AcM-C#22 pourrait être propre à son activité de potentialisateur, décrite plus loin.

L'anti-DR5 AcM-C#22 présentant des résultats encourageants *in-vitro*, son effet sur la régression tumorale pourrait être **évalué *in-vivo***, d'abord avec la lignée BL2, puis si les résultats sont concluants, sur d'autres lignées tumorales.

5. Activités des quatre anticorps potentialisateurs AcM-C#2, C#11, C#22 et C#24

5.1 Activités et modes d'actions des AcM-C#2, C#11, C#22 et C#24

L'AcM-C#22 et trois autres anticorps ont présenté une synergie avec le ligand TRAIL, rétablissant la sensibilité des cellules cancéreuses résistantes à TRAIL. En accord avec les travaux préliminaires de l'équipe et les découvertes récentes mettant en évidence la capacité des anticorps anti-DR4 et anti-DR5 à augmenter les signaux d'induction d'apoptose par TRAIL [Graves et al., 2014] [Tuthill et al., 2015] [Hao et al., 2016], ces quatre anticorps sont capables d'augmenter l'apoptose induite par TRAIL dans la lignée cellulaire sensible BL2. Trois hypothèses peuvent expliquer cet effet synergique.

Premièrement, la liaison de TRAIL pourrait provoquer un changement de conformation du récepteur qui augmenterait son affinité envers l'AcM potentialisateur, ou inversement. La potentialisation ne serait alors possible qu'en présence des deux éléments. De par l'augmentation de l'affinité, l'association des AcM et/ou TRAIL serait alors plus fréquente et/ou plus forte et la formation du DISC plus performante (figure 6.20). On peut supposer que cela puisse être le cas pour les anticorps anti-DR4 potentialisateurs. TRAIL

pourrait ralentir la cinétique de dissociation de ces AcM, stabilisant la liaison AcM-DR4.

AcM potentialisateurs - Changement de conformation

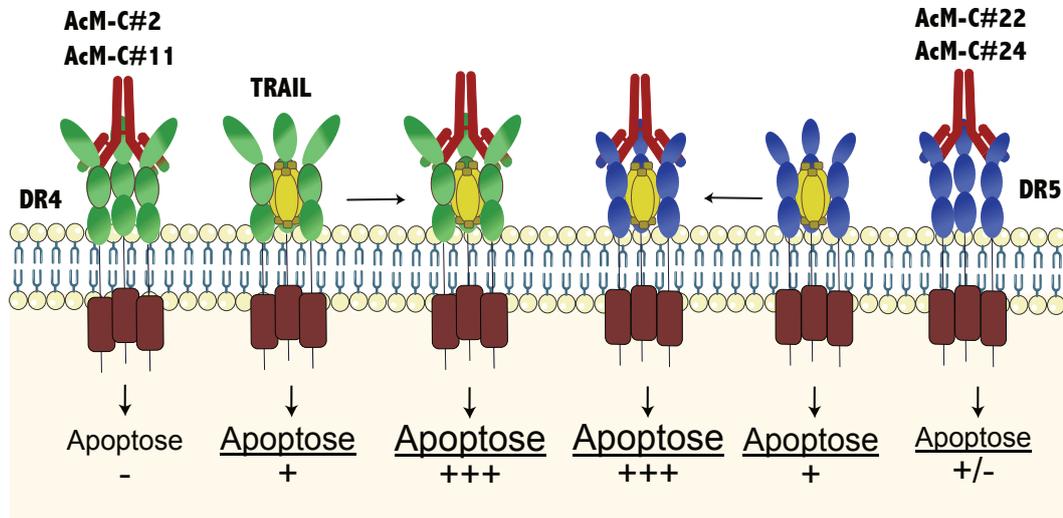


FIGURE 6.20 – Première hypothèse du mode d'action des AcM potentialisateurs. La liaison par TRAIL et l'AcM pourrait engendrer un changement de conformation des récepteurs, ce qui augmenterait l'affinité de l'un par rapport à l'autre.

Deuxièmement, les AcM pourraient reconnaître les récepteurs pré-assemblés mais sans être capables de les activer. TRAIL serait donc indispensable pour induire le changement conformationnel et activer les récepteurs. Comme les Fab pourraient se lier à deux dimères ou trimères pré-assemblés, l'AcM et TRAIL pourraient activer 6 récepteurs au lieu de trois dans le cas de TRAIL utilisé seul (figure 6.21).

Troisièmement, les AcM pourraient servir de pontage entre les récepteurs et TRAIL. Plusieurs études ont mis en lumière le fait que la combinaison peut induire une supermultimérisation des récepteurs [Adams et al., 2008] [Graves et al., 2014] [Vanamee and Faustman, 2018]. Les AcM pourraient reconnaître non plus les récepteurs via leur PLAD mais n'importe quelle partie de leur domaine extracellulaire. L'AcM pourrait alors reconnaître un monomère qui, cette fois, serait regroupé au préalable par TRAIL au sein d'un trimère (DR³), formant un véritable échafaud constitué de multiples ensembles de DR³-TRAIL-AcM (figures 6.22 et 6.23). Cette réticulation améliorée pourrait ainsi stabiliser le complexe à la surface de la cellule, et augmenter considérablement le potentiel du signal d'apoptose intracellulaire. De plus gros clusters de DISC pourrait ainsi être formés. Les multimères de récepteurs étant présents plus longtemps à la surface cellulaire, la caspase-8 initiateur aurait plus de probabilité d'être recrutée au niveau du DISC. Enfin, cette multimérisation pourrait empêcher l'internalisation des récepteurs entraînant une apoptose plus robuste.

AcM potentialisateurs - Réticulation par les PLAD

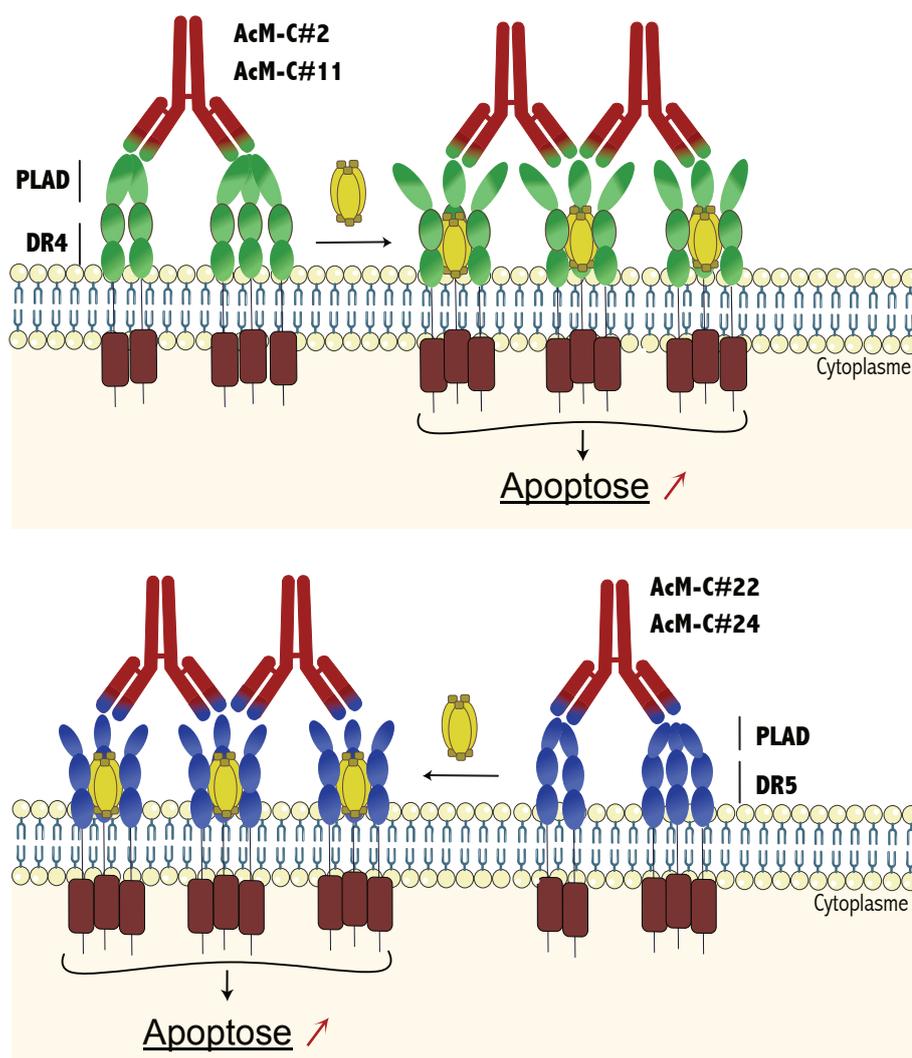


FIGURE 6.21 – Deuxième hypothèse du mode d'action des anticorps potentialisateurs. En liant une région propre aux PLAD, l'anticorps serait capable de réticuler 6 récepteurs à la fois, activés ensuite par TRAIL.

5.2. Les quatre anticorps potentialisateurs restaurent la sensibilité des cellules résistantes

Nous avons montré que, de manière intéressante, ces quatre anticorps sont également capables d'augmenter l'apoptose induite par TRAIL dans la lignée résistante MDA-MB-231. Les lignées cellulaires MDA-MB-231 et HCT116 présentent approximativement le même nombre de DR4 et de DR5 au niveau de leur membrane cellulaire. La sensibilité et la résistance peuvent donc être considérées comme un équilibre entre les signaux pro-apoptotiques et les signaux anti-apoptotiques. Pour les cellules HCT116, les signaux pro-apoptotiques, extracellulaire et via la mitochondrie, sont suffisants pour induire l'apoptose, en prenant le pas sur les signaux anti-apoptotiques intracellulaires. Pour la lignée

AcM potentialisateurs - Superoligomérisation

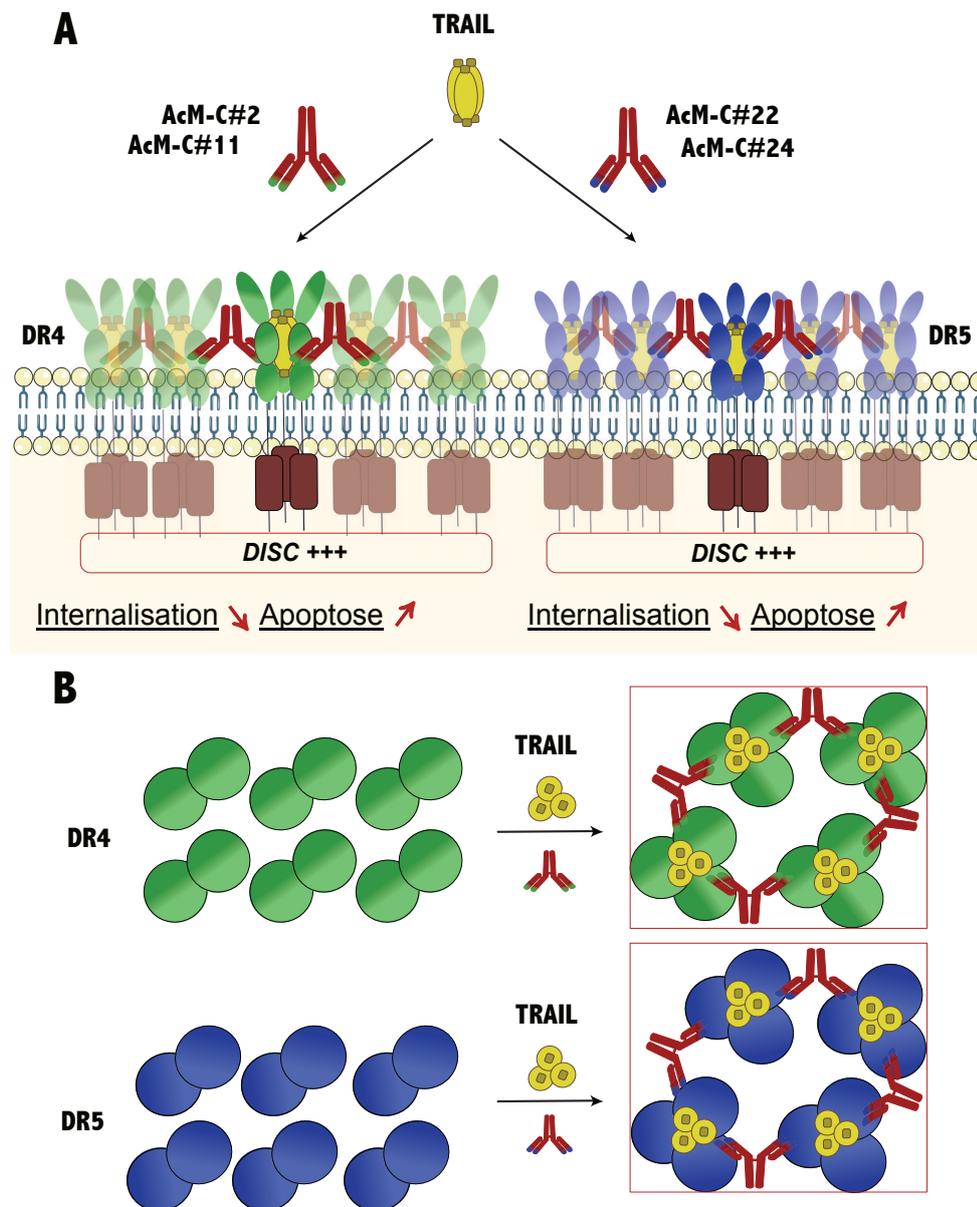


FIGURE 6.22 – Troisième hypothèse du mode d'action des anticorps potentialisateurs. Les AcMs servent de pontage entre les trimères de récepteurs liés au TRAIL. L'ensemble formerait un échafaud, permettant d'engager de multiples récepteurs, et de maintenir les complexes à la surface cellulaire, résultant en une signalisation pro-apoptotique plus robuste. **A** Vue sur le côté. **B** Vue d'en haut. Une unité est représentée par le carré rouge. À la surface cellulaire, l'anticorps étant capable de lier chacun des trois DR lié au TRAIL, cette unité peut être répétée de multiples fois, formant un réseau dense de DR³-TRAIL-AcM [Adams et al., 2008] [Vanamee and Faustman, 2018] [Graves et al., 2014].

cancéreuse MDA-MB-231, cela pourrait être le contraire. La quantité élevée de signaux anti-apoptotiques bloquerait les signaux pro-apoptotiques extrinsèques.

Dans le contexte de la synergie, le DISC formé pourrait rester actif plus longtemps, avec un nombre plus élevé de caspase-8 recrutés. Le message final pourrait ainsi être

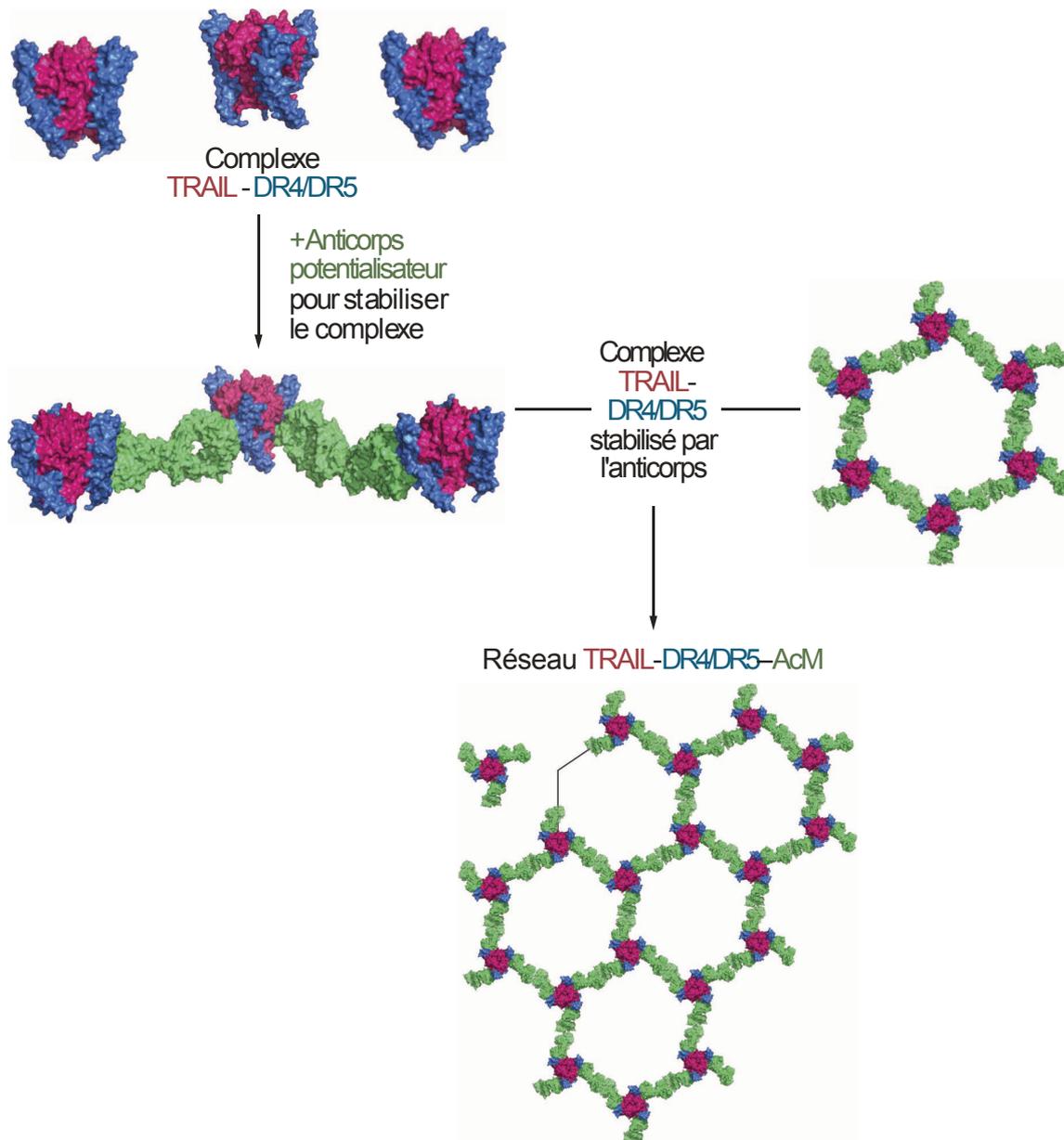


FIGURE 6.23 – Représentation cristallographique de la troisième hypothèse du mode d'action des anticorps potentialisateurs. Le mécanisme est le même que celui présenté dans la figure précédente, à savoir la formation d'un réseau dense de DR³-TRAIL-AcM. D'après [Vanamee and Faustman, 2018].

contrebalancé vers un signal pro-apoptotique, restaurant la sensibilité des cellules MDA-MD-231. Un autre mécanisme peut également entrer en jeu. Il a été décrit qu'une voie non-apoptotique, de survie cellulaire, semble se mettre en place par défaut lorsque le DISC formé n'est pas assez puissant, comme c'est le cas dans les cellules résistantes [Jin and El-Deiry, 2006] [Varfolomeev et al., 2005]. On peut alors penser que l'augmentation du potentiel apoptotique du DISC permet d'inhiber cette voie, en faveur d'une sensibilisation des cellules.

Tous ces anticorps potentialisateurs démontrent donc des propriétés thérapeutiques encourageantes. Dans un premier temps, il faudrait **vérifier le potentiel synergique** de ces anticorps sur d'autres lignées résistantes à TRAIL. De même, il serait judicieux de déterminer la **concentration optimale de TRAIL et des AcM** afin de connaître la dose minimale entraînant une apoptose efficace. Il serait également intéressant de tester des **combinaisons** de ces anticorps entre eux. Des tests préliminaires combinant les 17 anticorps anti-DR4 ont été effectués au cours de cette thèse, mais n'ont donné aucun résultat pour l'instant. Cependant, l'utilisation de plusieurs anticorps potentialisateurs avec TRAIL n'a pas encore été testée. Ces anticorps présentent sûrement des épitopes différents, l'effet de synergie pourrait donc être potentialisé par l'utilisation de plusieurs d'entre eux. On peut également supposer que **le greffage** des AcM potentialisateurs et du TRAIL **sur une même nanoparticule** pourrait présenter des avantages. Enfin, l'effet potentialisateur de ces anticorps en combinaison avec TRAIL devra également être **testé *in-vivo***.

6. Activités des anticorps anti-DR5 et migration cellulaire

La réticulation secondaire des anticorps par des agents tels que les anticorps secondaires, ou la liaison aux récepteurs Fc γ R permet d'améliorer les effets antitumoraux des anticorps, majoritairement les anti-DR5 [Wajant, 2015]. Dans notre crible, la réticulation en adsorbant les anticorps anti-DR5 sur une plaque de culture n'a pas considérablement amélioré l'induction d'apoptose des anticorps. De plus, cette réticulation n'a pas eu d'effet sur le seul anti-DR5 agoniste AcM-C#22. Des tests utilisant **d'autres agents de réticulation** permettraient sans doute de vérifier si la façon dont sont fixés les anticorps (ici dans toutes les directions) a une influence sur l'efficacité de la réticulation.

Il serait également intéressant d'évaluer la **combinaison des 4 anticorps anti-DR5** entre eux. Ces anticorps présentant sûrement des épitopes différents, un effet de synergie pourrait être observé.

Enfin, le récepteur DR5 intervient dans les processus de migration cellulaire. Contrairement à DR4, DR5 possède dans son domaine juxta membranaire quatre lysines portant des charges positives. La différence de charge globale de ce domaine pourrait être à l'origine des différences de repliements de ce récepteur et des différences de recrutements de molécules de signalisation impliquées dans la motilité cellulaire. Il est donc nécessaire de dissocier l'activité pro-métastatique de l'activité pro-apoptotique. Les anticorps anti-DR5 générés pourraient être utilisés pour **tester les propriétés pro-migratoires du DR5**, soit en bloquant la signalisation pro-motile induite par TRAIL, ou encore comme outils pour disséquer le complexe moléculaire et étudier la signalisation pro-motile induite par TRAIL.

Cinquième partie

CONCLUSION GÉNÉRALE

Rétablir, ou activer, la mort cellulaire des tumeurs malignes représente aujourd'hui un des objectifs majeurs de la recherche et le développement de médicaments anticancéreux. Lors de la tumorigénèse, la machinerie cellulaire de la cellule transformée est complètement perturbée et de nombreuses protéines et voies de signalisations sont surexprimées. En particulier, les cellules tumorales surexpriment les récepteurs de mort agonistes DR4 (TRAIL-R1) et DR5 (TRAIL-R2). Or, la liaison de TRAIL, leur ligand naturel, induit le regroupement des récepteurs ainsi que la voie apoptotique des cellules cancéreuses ciblées. Pour une raison qui reste encore à définir, la transduction du signal semble être sélective des cellules tumorales. Ce système est donc très intéressant car il cible spécifiquement les cellules cancéreuses et permet d'induire leur apoptose indépendamment du statut de P53, tout en épargnant les cellules saines. Cibler les récepteurs agonistes de TRAIL représente donc une stratégie intéressante de développement d'anticorps antitumoraux.

Comme TRAIL, les anticorps monoclonaux (AcM) agonistes dirigés contre DR4 et DR5 sont également capables de déclencher l'apoptose dans les cellules tumorales. Un certain nombre de dérivés de TRAIL, y compris TRAIL recombinant et les AcM agonistes anti-DR4 ou anti-DR5 ont été développés et ont induit l'apoptose des cellules tumorales dans les modèles pré-cliniques. Malheureusement, bien que ces composés aient été décrits comme non toxiques dans les modèles animaux et bien tolérés chez l'homme, jusqu'ici leur efficacité clinique s'est avérée assez limitée, empêchant leur mise sur le marché. Les AcM restent néanmoins des outils puissants et prometteurs en raison de leur spécificité et leur faible toxicité. Il existe donc un réel besoin de développer des anticorps ciblant de nouveaux épitopes et qui permettraient d'induire plus efficacement l'apoptose des cellules cancéreuses.

L'approche d'immunisation ADN HTV nous a permis de générer 21 anticorps anti-DR4 et anti-DR5 conformationnels présentant **une affinité et une spécificité fortes** pour leur cible respective, avec des titres élevés. Parmi eux, 5 anticorps sont capables de transduire un signal pro-apoptotique **robuste sur un large panel** de cellules cancéreuses, seuls ou en combinaison avec TRAIL. Les anticorps potentialisateurs peuvent également **sensibiliser** la lignée cellulaire MDA-MB-231, résistante à TRAIL, et l'anticorps agoniste le plus performant, l'anti-DR4 AcM-C#16, a démontré sa capacité à **réduire la pousse tumorale** sur des modèles de xénogreffes. Bien qu'il soit nécessaire de réaliser des travaux supplémentaires afin d'identifier les mécanismes propres à chaque anticorps, ainsi que leur coopération avec les récepteurs et TRAIL, la recherche que nous avons menée a permis d'isoler cinq anticorps susceptibles de démontrer une **valeur thérapeutique** clinique. Mon travail de thèse démontre ainsi l'intérêt de l'immunisation par ADN ainsi que du traitement par les AcM agonistes, et ouvre des perspectives tout à fait intéressantes sur l'exploitation de la synergie AcM/TRAIL, notamment pour surmonter la résistance des cellules et les re-sensibiliser au traitement par TRAIL.

Sixième partie

ANNEXES

Annexe A

Matériels et méthodes

Ligand, produits chimiques et anticorps

TRAIL humain marqué par l'histidine (hTRAIL-His) a été produit et utilisé comme décrit précédemment [Schneider, 2000]. L'inhibiteur de la caspase, Q-VD-Oph, provient de Selleck Chemicals (Munich, Allemagne), la puromycine a été achetée chez InvivoGen (Toulouse, France) et l'enzyme IdeZ chez Promega (Charbonnières, France). Les colonnes d'affinité à haute performance en protéines A (cat. 17-0402-01) et NPROTEIN A SEPH 4 FF (cat. 17-5280-02) proviennent de GE Healthcare (Dutscher, Brumath, France). Le milieu HAT (hypoxanthine-aminoptérine-thymidine, n°H0262) et PEG (n°P2906) proviennent de Sigma (St Quentin Fallavier, France). Le milieu HCS (supplément de clonage d'hybridome, n°sc-224479) a été acheté chez Santa Cruz. Pour la cytométrie en flux, les anticorps anti-DR4 (clone wB-K32) et anti-DR5 (clone B-L27) de Diaclone (Besançon, France), ont été utilisés comme anticorps contrôle et l'anticorps secondaire de chèvre anti-souris conjugué à l'Alexa-488 provient de Molecular Probes (Life Technologies, Saint Aubin, France) [Lalaoui et al., 2011]. Pour la mesure de l'apoptose, l'Annexine V (N°556422) et le 7-AAD (N°559925) proviennent de BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). Pour l'analyse par Western-Blot, l'anticorps anti-DR4 (clone wB-N28) et l'anticorps anti-DR5 (clone B-D37) proviennent de Diaclone (Besançon, France). L'anticorps secondaire anti-souris couplé à l'HRP provient de Jackson ImmunoResearch (Interchim, Montluçon, France). Les anticorps dirigés contre la caspase-3 (clone MF393), la caspase-8 (clone 5F7) et la caspase-9 (clone 5B4) proviennent de Medical & Biological Laboratories (Clinisciences, Montrouge, France). Le PARP-1 anti-clivé (clone D64-E10) de Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint Quentin, France). Les anticorps dirigés contre PARP-1 (clone H-300), GAPDH (clone 0411) et HSC70 (clone B-6) provenaient de Santa Cruz Biotechnology (CliniSciences). L'anticorps secondaire de lapin anti-souris conjugué à HRP (anti-mouse-HRP) provient de Jackson ImmunoResearch (Interchim, Montluçon, France). L'anticorps secondaire anti-IgG (H + L) anti-souris conjugué à la HRP provenait de CovalAb (Villemurbanne, France). Les anticorps spécifiques anti-IgG1-, Ig2a- et Ig2b conjugués à la HRP ont été obtenus chez Southern Biotech (Clinisciences).

Animaux

Les souris utilisées pour ces études ont été maintenues dans une zone exempte d'agents pathogènes spécifiques dans une animalerie agréée. Toutes les expériences ont été réalisées conformément au Comité d'éthique du Grand Campus de Dijon (C2EA, Grand campus Dijon) n°105 - C2EA105. Des souris Balb/c femelles âgées de huit semaines (Charles Rivers France, St Aubin-les-Elbeuf) ont été utilisées pour les protocoles d'immunisations et des souris Balb/c nu/nu femelles (Charles Rivers) âgées de huit semaines ont été utilisés pour l'évaluation de la croissance tumorale après les injections d'anticorps.

Constructions plasmidiques

Assemblage par la méthode Gibson : Cette méthode permet d'assembler jusqu'à 5 fragments d'ADN entre eux pourvus qu'ils contiennent dans les extrémités 5' et 3' des séquences homologues d'une longueur minimum de 15 nucléotides. Contrairement aux ligations classiques, cette méthode nécessite trois enzymes particulières fonctionnant dans un tampon unique (*2X ISO reaction buffer*). Le principe est le suivant, les fragments d'ADN à assembler, dont les extrémités se chevauchent, sont dans un premier temps coupés par une exonucléase. Cette dernière enlève des nucléotides sur l'un des doubles brins d'ADN, permettant l'apparition d'extrémités dites « protrusives ». Ces extrémités protrusives, à l'instar des extrémités cohésives des enzymes de restriction conventionnelles, vont permettre l'assemblage des fragments d'ADN dans l'ordre et l'orientation voulue (chaque fragment d'ADN à assembler possédant des séquences homologues à la région de juxtaposition), grâce aux interactions de faible énergie. Une polymérase va ensuite combler les nucléotides manquant et une ligase associera les fragments entre eux de manière covalente (figure A.1).

Pour l'immunisation ADN : Des plasmides pCR3 codant pour DR4 ou DR5 entiers (pCR3-DR4 et pCR3-DR5) sous le contrôle du promoteur du CMV ont été aimablement donnés par le Dr Pascal Schneider. Le plasmide dérivé du promoteur CAG codant pour le WPRE et le mFLT3L, pCAGGS-mFLT3 (OM1461) a été obtenu par PCR, en utilisant le plasmide pCAG décrit par Niwa et al. [Niwa et al., 1991] , un signal Poly (A) bGH et contenant le mFLT3 (OM1460) et un vecteur contenant WPRE synthétisé à partir de Genscript (OM567) à partir des amorces suivantes OR506 5'-AAA-CCA-AGC-CAA-AAA-TGA-GAA-TTC-GAA-TCA-ACC-TCT-GGA-TTA-CAA-AAT-TTG-TGA-AAG-3'; OR507 5'-AGG-GGC-AAA-CAA-CAG-ATG-GCT-GGC-AAC-TAG-AAG-GCA-CAG-GGC-GGG-GAG-GCG-3'; OR546 5'-TGT-ATG-CGG-CGA-CCG-AGT-TGC-TCT-TGC-3'; OR547 5'-GGT-TGA-TTC-GAA-TTC-ACT-AGG-GAT-GGG-3'; OR548 5'-CCT-GTG-CCT-TCT-AGT-TGC-CAG-C-3'; OR549 5'-CGG-TCG-CCG-CAT-ACA-CTA-TTC-T-3'. Le plasmide dérivé du promoteur CAG codant pour le WPRE et le GMCSF entier, pCAGGS-GMCSF (OM1463) a été obtenu par digestion enzymatique par EcoRI du vecteur OM1461 et par amplification PCR d'un plasmide codant pour l'ADNc du GMCSF obtenu à partir de Riken (RDB 1687, OM1438) obtenu à partir des

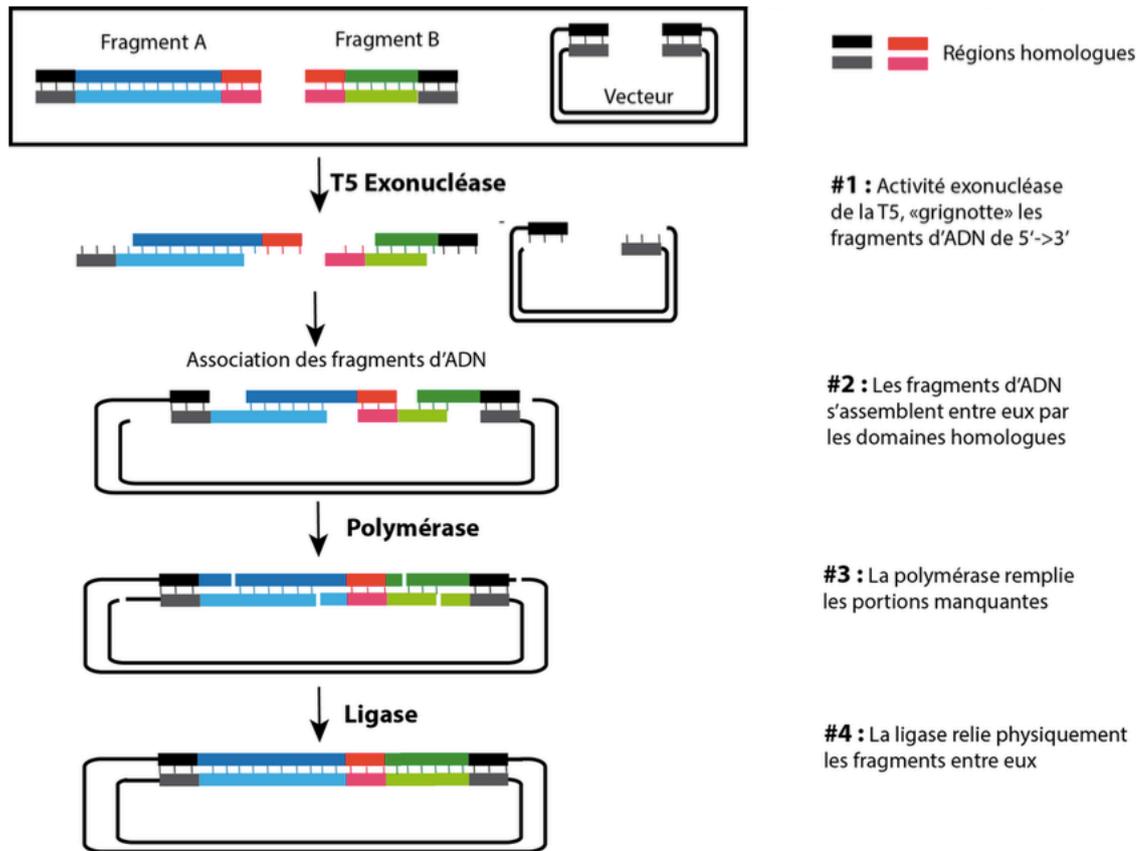


FIGURE A.1 – Principe de l’assemblage Gibson. Les 4 étapes principales de la réaction enzymatique sont décrites à droite du schéma. D’après Nora Belajraf.

amorces suivantes OR510 5'-AAC-GTG-CTG-GTT-ATT-GTG-CTG-TCT-CAT-CAT-TTT-GGC-AAA-GAA-TTC-AAA-TGT-GGC-TGC-AGA-ATT-TAC-TTT-TCC-T-3' et OR511 5'-AAT-TTT-GTA-ATC-CAG-AGG-TTG-ATT-CGA-ATT-CTC-ATT-TTT-GGC-TTG-GTT-TTT-TGC-ATT-CAA-AGG-GGA-3'. Le vecteur final a été ligaturé en utilisant l’assemblage Gibson. Le plasmide promoteur CAG codant pour WPRE et DR5 entier (pCAGGS-DR5) a été obtenu en digérant OM1461 avec EcoRI pour remplacer le mFLT3 par la séquence complète de DR5, comme ci-dessus en utilisant les fragments de PCR obtenus à partir du plasmide pCR3-DR5 OR570 5'-ATC-ATT-TTG-GCA-AAG-AAT-TCC-CAT-GGA-ACA-ACG-GGG-ACA-GAA-CG-3' et OR571 5'-AAT-CCA-GAG-GTT-GAT-TCG-AAT-TCA-GGA-GGA-CAT-GGC-AGA-GTC-TGC-A-3'. Après transformation bactérienne, toutes les constructions finales ont été confirmées par séquençage. Lorsque le séquençage a été confirmé, des préparations de plasmides par MAXI-préparation sans LPS ont été effectuées (Macherey-Nagel, NucleoBond® Xtra Maxi EF).

Pour la production des récepteurs recombinants : Des plasmides codant pour des versions recombinantes solubles de DR4 ou DR5 humaines fusionnées à la fraction constante d’immunoglobuline humaine, à savoir DR4 (DR4-Fc) ou DR5 (DR5-Fc), conférant une

résistance à la puromycine. Le plasmide DR4-Fc (OM1450) a été obtenu par amplification PCR d'un vecteur contenant le DR4-Fc avec le gène de résistance de la néomycine (OM646) et le plasmide contenant le gène de résistance à la puromycine (OM565) en utilisant les amorces suivantes : OR435 5'-GCG-AAA-CGA-TCC-TCA-TCC-TGT-CTC-TTG-ATC-GATC-3' ; OR436 5'-TTT-CGA-TAA-GCC-AGT-AAG-CAG-TGG-GTT-CTC-TAG-3' ; OR437 5'-ACT-GGC-TTA-TCG-AAA-TTA-ATA-CGA-CTC-ACT-ATA-GGG-AGA-CCC-AAG-3' ; OR438 5'-GTG-CCT-GAG-CGG-GAC-TCT-GGG-GTT-3' ; OR439 5'-TGA-GGA-TCG-TTT-CGC-CAT-GAC-CGA-GTA-CAA-GCC-C-3' et OR446 5'-GTC-CCG-CTC-AGG-CAC-CGG-GCT-TGC-3'. Brièvement, la cassette de néomycine du vecteur d'expression pCR3-neo-hDR4-Fc (dont généreux du Dr Pascal Schneider, Epalinges, Suisse, OM646) a été remplacée par la puromycine en assemblant des fragments de PCR obtenus en utilisant OR435/OR436 et OR439/OR446 à l'ADNc codant la résistance à la puromycine générée par amplification par PCR à partir d'OM565. Les fragments ont été assemblés en suivant les instructions du fournisseur (clonage HD In-Fusion, Takara, Clontech), conduisant au pCR3-Puro-hDR4-Fc. La construction du pCR3-neo-hDR5-Fc (OM1449) s'est faite par digestion enzymatique HindIII/XhoI du vecteur pCR3-Puro-hDR4-Fc OM1450 et du vecteur d'expression pCR3-neo-hDR5-Fc (dont généreux du Dr Pascal Schneider, Epalinges, Suisse, OM315) afin de remplacer la cassette DR4-Fc par la cassette DR5-Fc. Les fragments ont été assemblés avec la T4 DNA Ligase. Après transformation bactérienne, toutes les constructions finales ont été confirmées fonctionnellement par transfection dans des cellules 293T sélectionnées à la puromycine. La stratégie de construction de l'ensemble des plasmides est présentée en annexe.

Lignées cellulaires

Les cellules 293-T, les lignées cellulaires de cancer colorectales, cancer du sein, du colon, du pancréas, de la prostate et du poumon respectivement HCT-116, MDA-MB-231, SW480, MiaPaca-2, DU145 et A549 ont été cultivées dans le milieu DMEM (Lonza, Levallois-Perret, France) additionné de 10% de veau foetal sérum (FCS, Lonza). La lignée cellulaire de carcinome du poumon H1703 a été cultivée dans un milieu RPMI (Lonza) complété avec 10% de SVF. Les cellules 293-T exprimant de manière stable hDR4-Fc et hDR5-Fc (décrit ci-dessous) et les dérivés isogéniques MDA-MB-231, déficients en récepteurs TRAIL (DKO), DKO reconstitués avec DR4 (DKO-DR4rec), DR5 (DKO-DR5rec) ont été cultivés comme ci-dessus dans du milieu DMEM [Dufour et al., 2017a] [Dufour et al., 2017b]. Pour le maintien cellulaire, les cellules adhérentes ont été lavées avec du HBSS (Lonza), détachées avec de la trypsine et diluées au 1/10ème avec du milieu complet trois fois par semaine. Les lignées cellulaires de lymphome de Burkitt, lymphomes B et de lymphomes respectivement BL2, RL et Jurkat ont été cultivées dans un milieu RPMI complété avec 10% de sérum de veau foetal.

Production de protéines recombinantes

Des lignées cellulaires stables exprimant DR4-Fc et DR5-Fc (respectivement 293T-DR4-Fc et 293T-DR5-Fc) ont été obtenues par transfections des plasmides pCR3-DRs-Fc (OM1449 ou OM1450) dans des cellules 293T cultivées dans des boîtes de culture de 10-cm jusqu'à 60% de confluence. Les transfections ont été réalisées à l'aide de la lipofectamine 3000, selon les recommandations du prestataire (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Les cellules transfectées ont été cultivées dans un milieu de culture pendant 24h, puis traitées avec du DMEM supplémenté avec 2,5 µg/mL de puromycine. Après 48h de sélection, les populations cellulaires résistantes sont sélectionnées. Les cellules 293T-DR4-Fc et 293T-DR5-Fc sont maintenues dans un milieu de sélection pendant une semaine, puis le milieu est échangé avec un milieu DMEM complet, sans puromycine. Des stocks de cellules sont congelées, et les cellules restantes sont cultivées dans des boîtes culture T175 mm². Lorsque la confluence a atteint 80%, le milieu a été remplacé par un milieu synthétique, OptiMEM Glutamax (Thermo Fisher Scientific), pour stimuler la production de protéines. Après 5 jours d'incubation, le surnageant a été récolté et les protéines ont été purifiées comme suit. Le surnageant contenant la protéine DRs-Fc recombinante a été passé sur une colonne de protéine A à haute performance, lavé deux fois avec du PBS 1X froid, puis les protéines recombinantes ont été éluées avec une solution de NaOH 0,1 M citrate pH 2,5, tamponnée avec un Tris-HCl 1M à pH9. Les échantillons sont ensuite stérilisés par passage sur des membranes de filtration de 0,2 micron et concentrés avec Centricon (Millipore) pour atteindre la concentration de 1 ou 2 mg/mL. Le clivage des récepteurs recombinants, dépourvus de protéines recombinantes Fc, cDR4 et cDR5, sont obtenus en utilisant l'enzyme IdeZ en suivant les recommandations du fabricant. La capacité des récepteurs recombinant à fixer TRAIL a été évaluée par bleu de méthylène sur les cellules HCT116, sensibles à TRAIL. Des cellules HCT116 ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits et traitées par une concentration fixe de His-hTRAIL (250 ng/mL pour les DR-Fc et 500 ng/mL pour les DRc) en combinaison, ou non, d'une concentration croissante de DR-Fc ou DRc, variant de 10 µg/mL à 10 ng/mL. 24 h après stimulation, le nombre de cellules adhérentes, considérées comme vivantes, est évalué par le bleu de méthylène qui colore les protéines, suivant la méthode décrite ci-dessous.

Protocole d'immunisation ADN

Des souris Balb/c ont été immunisées avec soit 50 µg de pCR3-DR4 (OM319) et 2,5 µg de pCR3-GMCSF (OM1438) ou 50 µg de pCAGGS-DR5 (OM680) et 2,5 µg de pCAGGS-GMCSF (OM1463) dilué dans un tampon salin via une injection par voie veineuse hydrodynamique (HTV) comme décrit précédemment [Hazen et al., 2014]. Les injections d'ADN DR4 ont été effectuées une fois par semaine pendant 4 semaines, suivi de 6 injections de 20 µg de protéine recombinante DR4 clivée. Le protocole pCAGGS-DR5 a débuté par une injection de 10 µg de pCAGGS-mFLT3 (OM1461). Une semaine après, les injections d'ADN DR5 été effectuées tous les 14 jours pendant 8 semaines. Les souris

ont été séparées en deux groupes : un groupe recevant 2 rappels protéiques de 20 μg de protéine recombinante DR5 clivée, et l'autre groupe recevant deux rappels ADN de 50 μg de pCAGGS-DR5 (OM680) et 2,5 μg de pCAGGS-GMCSF (OM1463). Pour suivre la production d'anticorps, des échantillons de sang ont été prélevés tout au long de l'immunisation et les sérums ont été testés par ELISA.

Détection du titre des anticorps anti-DRs humains par ELISA

La détermination des titres d'anticorps anti-DR4 ou anti-DR5 provenant de sérums de souris, de surnageants d'hybridome ou d'anticorps purifiés a été évaluée par ELISA. Des sérums de souris Balb/c ont été prélevés pendant l'immunisation, des surnageants d'hybridomes et des anticorps purifiés ont été testés lors du développement d'anticorps monoclonaux. Ils ont été criblés sur des récepteurs solubles recombinants, de fusions DR4-Fc et DR5-Fc, ou clivés cDR4 et cDR5, respectivement. Les tests ELISA ont été effectués comme suit : les protéines recombinantes ont été adsorbées sur des plaques ELISA de microtitration à fond plat EIA / RIA à 96 puits (Corning, Costar 3590, Thermo Fisher Scientific) à une concentration de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pour un volume total de 100 μL / puit, soit 0,1 μg de protéines / puits. Après une incubation d'1 h à 37 °C, les plaques sont saturées 30 min à 37 °C par une solution de blocage contenant 0,5% de BSA en PBS 1X. Les échantillons de surnageant d'hybridomes ont été dilués au demi, les sérums et les anticorps purifiés ont été dilués de moitié en série. Après liaison pendant 1 heure à 37 °C sur une plaque rotative et incubation avec l'anticorps secondaire, les plaques sont lavées 3 fois puis un anticorps secondaire reconnaissant les IgG (H+L) est ajouté. Après 3 lavages supplémentaires, la réactivité a été mesurée par colorimétrie à 450 nm en utilisant un lecteur de microplaques (Labsystems Multiskan Ascent, Bradenton, Etats-Unis d'Amérique). Les échantillons ont été considérés comme positifs lorsque la densité optique était supérieure à 0,3 pour le surnageant des hybridomes. Les titres d'anticorps purifiés ont été évalués comme la dilution la plus élevée (en ng/mL) lorsque la densité optique est supérieure ou égale à 1.

Production d'anticorps monoclonaux

Les fusions ont été réalisées à partir des souris répondant le mieux à l'immunisation. Les rates ont été prélevées et les splénocytes ont été extraits puis fusionnés à des cellules de myélome de souris Sp2 en utilisant du PEG30. 2×10^5 cellules/ml ont ensuite été ensemencées dans une plaque à 96 puits avec un milieu contenant 20% de SVF, du HAT (hypoxanthine-aminoptérine-thymidine) et du HCS (supplément de clonage d'hybridome). Trois semaines après la fusion, les surnageants ont été criblés pour la production d'anticorps par ELISA. Tous les hybridomes sécrétant des anticorps démontrant une positivité significative par cytométrie en flux ont subi deux cycles de sous-clonage. Un anticorps est considéré comme monoclonal quand, dans une série de trois clonages consécutifs à une cellule/puits, 100 % des puits testés sont spécifiques de la cible d'intérêt. Les anticorps produits par ce même clone d'hybridome sont tous identiques, ils sont alors monoclonaux. Les

hybridomes spécifiques ont donc été clonés et sous-clonés par dilution limite afin d'obtenir une population de cellules homogène descendant d'une seule cellule mère et sécrétant l'anticorps d'intérêt. Après les sous-clonages, les hybridomes sont testés et repiqués en plus grand volume afin de produire une quantité importante d'anticorps monoclonaux. Le surnageant des hybridomes, contenant les anticorps produits, est récolté et purifié sur colonne de protéines A/G afin d'obtenir des anticorps purifiés et quantifiés. Vingt et un surnageants d'hybridomes clonaux ont ensuite été purifiés par chromatographie d'affinité Protéine-A.

Cytométrie en flux

La sélectivité a été déterminée par cytométrie en flux en utilisant des lignées cellulaires isogéniques provenant de cellules MDA-MB-231, exprimant soit DR4 ou DR5 ou aucun (DKO) de ces récepteurs [Dufour et al., 2017a]. Pour les anticorps anti-DR4, les surnageants d'hybridomes ont été criblés sur des cellules parentales HCT116 et HCT116-DKO. Pour les anticorps anti-DR5, les surnageants d'hybridomes ont été testés sur des cellules MDA-MB-231 DKO et sur la lignée isogénique MDA-MB-231 DKO^{rec dr5}. Les anticorps purifiés ont été criblés sur des cellules parentales MDA-MB-231 WT et les cellules isogéniques MDA-MB-231-DKO, MDA-MB-231-DKO^{recdr4} et MDA-MB-231-DKO^{recdr5}. Les cellules ont été recueillies à partir de boîtes de culture, lavées avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS, Sigma) refroidie par de la glace et distribuées dans des tubes FACS à une concentration de 10^5 cellules par condition. Après une étape de saturation à la BSA, les cellules sont mises en contact avec 200 μ L de surnageant d'hybridomes, ou avec 200 μ L d'anticorps purifiés dilués au 1/100ème dans du PBS contenant 3% de FBS (sérum de fœtal bovin). Les échantillons ont été ajoutés aux cellules et incubés à 4°C pendant 30 à 60 minutes. Les tubes ont ensuite été centrifugés et lavés avec du PBS. Les cellules ont ensuite été incubées à 4°C pendant 30 à 40 minutes avec de l'anticorps de chèvre anti-souris IgG (H + L) conjugué au fluorochrome AF488. Cet anticorps secondaire est dilué au 1/200ème dans du PBS contenant 3% de FBS. Après une étape de lavage, les cellules sont analysées par cytométrie de flux en utilisant un cytomètre FACS-CANTO (BD Bioscience). Les analyses ont ensuite été effectuées à l'aide du logiciel FlowJo.

Détermination d'affinité

L'affinité et la réactivité croisée ont été déterminées à l'aide d'un système Octet Red et de biocapteurs de quantification anti-IgG humaine (AHQ) (FortéBIO, St Germain-en-Laye, France). Tous les réactifs ont été préparés dans un tampon de liaison (TRIS-NaOH 0,1 M, pH 7,4). Les DR4-Fc et DR5-Fc recombinants ont été préparés à 5 μ g/ml dans un tampon de liaison, fixés au biocapteur puis mis en contact avec l'anticorps d'intérêt. La plaque de dosage a été agitée à 1000 rpm à 30°C. Deux colonnes (8 chacune) de biocapteurs ont été pré-hydratées dans un tampon de liaison pendant 10 minutes. Les biocapteurs anti-hIgG ont été tamponnés pendant 180s avant et après le chargement du DR4-Fc recombinant ou du DR5-Fc (800 s). Les cinétiques de liaison ont été mesurées en plongeant les biocapteurs

chargés (120 s) dans des concentrations variables d'AcM (de 500 nM à 15 nM). Puis, la dissociation a été enregistrée pendant 600 secondes supplémentaires. Les interactions ont été surveillées pendant la période d'association et de dissociation. Les biocapteurs ont ensuite été régénérés avec trois cycles de 5 secondes dans du tampon de régénération (citrate-NaOH pH 2,5), puis neutralisés dans un tampon de liaison. Les données ont été ajustées à un modèle stœchiométrique de liaison 1 : 1. Toutes les expériences sur les octets ont été conçues et analysées avec le logiciel d'acquisition de données FortéBio (7.1) et le logiciel d'analyse de données version 7.1.0.36 avec filtrage Savitsky-Golay pour réduire le bruit. Enfin, les données ont été ajustées avec la version 5 du logiciel GraphPad.

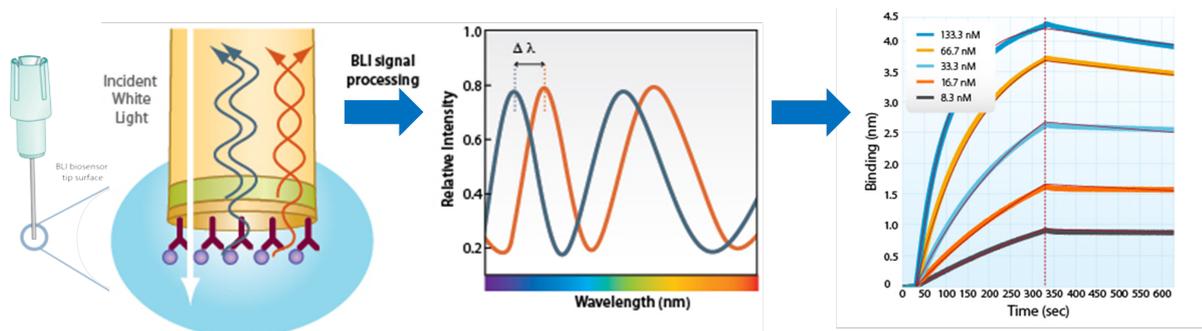


FIGURE A.2 – Représentation schématique du principe de l'Octet ou BLI (*Bio-Layer Interferometry*). Les récepteurs DR4-Fc et DR5-Fc sont fixés aux biocapteurs par leur fragment Fc. La liaison entre les anticorps et les DR-Fc engendre une modification de la longueur d'onde induite. La différence de signal est captée puis transformée en temps réel en sensogramme.

Tests de viabilité cellulaire ou cytotoxicité

Les effets des AcM d'intérêt ont été mesurés sur des cellules HCT116, MDA-MB-231 et BL2. La viabilité a été déterminée en utilisant le dosage au bleu de méthylène comme décrit précédemment [Dimanche Boitrel et al., 1992]. Le test au bleu de méthylène se base sur la propriété basophile des composés cellulaires, tels que les acides nucléiques ou les protéines, vis-à-vis du bleu de méthylène. Après fixation, à pH basique, les protéines présentent des charges électriques négatives qui fixent le cation basique bleu du colorant. La coloration non fixée est éliminée par lavages et le bleu fixé est libéré, après séchage, par une solution d'HCl à faible pH (0,1 M). L'intensité de la couleur bleue de la solution acide est ainsi proportionnelle à la quantité de composés cellulaires basophiles, et donc au nombre de cellules adhérentes fixées [Pelletier et al., 1988]. Les cellules HCT116 ou MDA-MB-231 (à la concentration de 5×10^5 cellules / mL) en combinaison avec des dilutions en cascade de traitements (AcMs seuls, TRAIL seul et une isoconcentration de mAb et TRAIL combinés) à partir de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits et laissées à incuber jusqu'au lendemain à 37°C. Les surnageants contenant ou non des cellules mortes ont été éliminés, les puits ont été lavés avec du PBS et les cellules adhérentes restantes ont été fixées avec du méthanol. Après 15 minutes d'incubation, le méthanol a été rejeté, séché et les cellules ont été colorées en utilisant du bleu de

méthylène pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules colorées ont été lavées abondamment et les plaques ont été séchées pendant 2 heures à 37°C. Ensuite, le bleu de méthylène a été élué avec HCl 0,1M et l'absorbance a été mesurée à 630 nm en utilisant le lecteur de microplaque Asys UVM 340 de Biochrom (Cambridge, Royaume-Uni). Le pourcentage de viabilité cellulaire par rapport au milieu a été calculé par rapport aux cellules non stimulées, ce qui correspond à une survie de 100%. Pour l'évaluation de la cytotoxicité des anticorps anti-DR5 adsorbés, une solution de bicarbonate 0,5 M pH 9,5 diluée au 1/10ème avec de l'eau distillée stérile (solution d'adsorption) est utilisée pour diluer les anticorps d'intérêt. Les anticorps sont dilués en cascade à partir de 10 µg/mL dans la solution d'adsorption sur une plaque ELISA de microtitration à fond plat EIA / RIA à 96 puits (Corning, Costar 3590, Thermo Fisher Scientific). Après 16 h d'incubation à température ambiante et sous hotte, la plaque est lavée avec du PBS 1X froid stérile etensemencée par 5x10⁵ cellules HCT116 / mL. Après 16 h, la survie cellulaire est évaluée par un test au bleu de méthylène.

Tests d'apoptose

L'apoptose induite par les anticorps monoclonaux combinés ou non au TRAIL a été quantifiée par la coloration à l'annexine V-FITC et au 7-AAD selon les instructions du fabricant (BD Biosciences) et analysée par cytométrie en flux (FACS LSRII). Au cours des premiers stades de l'apoptose, la phosphatidylsérine est extériorisée à la surface cellulaire. L'annexine V a une haute affinité pour la phosphatidylsérine, ainsi les cellules présentant des stades précoces de l'apoptose peuvent être identifiées par la liaison de l'annexine V. La phase tardive de l'apoptose ou nécrose ne montre aucune affinité pour l'annexine V mais la distinction des cellules vivantes, mortes ou l'apoptose précoce ou tardive peut être déterminée par 7-AAD, un agent de liaison à l'ADN fluorescent qui s'intercale entre la cytosine et la guanine. La combinaison de ces deux réactifs est par conséquent un puissant outil de détection de l'apoptose [Elmore, 2007]. Pour les tests de criblage utilisant les 10 lignées cancéreuses, les cellules ont été ensemencées à une concentration de 2 x 10⁵ cellules/ml dans des plaques de 24 puits et incubées avec les AcM à 10 µg/ml seuls ou en combinaison avec 1 µg/ml de TRAIL pendant 20 h. Pour les tests avec les cellules BL2, les puits correspondants ont été traités avec 10 pM de Q-VD-Oph (Selleckchem), un inhibiteur de caspase, pendant 30 min à 37°C avant tout traitement par les AcM ou TRAIL. Les cellules MDA-MB-231 ont été ensemencées à 2 x 10⁶ cellules/ml dans des flacons de T25 mm² et incubées avec des AcM à raison de 5 µg/ml seuls ou combinés à 1 µg/ml de TRAIL pendant 8 h. Pour tester l'activité de l'AcM-C#16, dans des lignées cellulaires cancéreuses humaines, les cellules BL2, H1703, HCT116 et MDA-MB-231 ont été ensemencées à 2x10⁵ cellules/ml dans des plaques à 24 puits et incubées avec une dilution d'AcM-C#16 allant de 10 µg/mL à 0,3 µg/mL pendant 24 h. Mise à part les tests de criblage sur les 10 lignées cancéreuses, toutes les expériences mentionnées ci-dessus ont été répétées au moins trois fois.

Analyses d'immunoblot

Les Dot Blot ont été effectués en utilisant DR4 et DR5 recombinants purifiés. Ces récepteurs, dénaturés ou non en présence de DTT pendant 5 min à 95°C, ont été déposés sur des membranes de nitrocellulose et séchés pendant 15 min. Les membranes ont ensuite été bloquées dans du PBS-T (PBS, Tween 20 à 0,5%) contenant 5% de lait sec non gras (PTM) pendant 1 heure et incubées avec des anticorps anti-DR4 et anti-DR5 dilués au 1/1000^e pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les membranes ont été lavées trois fois avec du PBS-T et la liaison a été détectée avec un anticorps anti-IgG (H + L) - HRP de souris. Pour les immunoblots, les cellules BL2, H1703, HCT116 ou MDA-MB-231 ont été placées à 1x10⁶ cellules/ml dans des boîtes de 25 cm² et stimulées par 5 µg/ml ou 1 µg/ml d'AcM seuls ou en combinaison avec 1 µg/ml de TRAIL pour un volume final de 10 ml. Les surnageants et les cellules ont été recueillis 8 h plus tard et les lysats cellulaires ont été préparés en utilisant un tampon de lyse NP40 contenant 1% de NP40, 20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl, 10% de glycérol et un cocktail d'inhibiteur de protéinase (Roche, Meylan, France). Les extraits cellulaires ont été utilisés sur des gels SDS PAGE à 12%. Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad) par électrotransfert liquide en utilisant le dispositif de marquage buvard (Bio-Rad). Les membranes ont ensuite été saturées en utilisant PTM pendant 1 heure et incubées avec des anticorps primaires dans PTM pendant une nuit à 4°C sur une machine rotative. Le lendemain, les membranes ont été lavées trois fois avec du PBS-T puis incubées pendant 1 heure avec des anticorps secondaires conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) dilués au 1/10 000^{ème} dans du PTM. Les membranes ont ensuite été lavées trois fois avec du PBS-T et l'immunoréactivité a été détectée en utilisant le kit de détection chimioluminescent Western BrightQuantum, kit de Advansta (Menlo Park, Californie, États-Unis).

Expériences *in-vivo*

Des souris athymiques femelles nues (Balb / c nu/nu) âgées de sept à huit semaines ont été injectées par voie sous-cutanée (s.c.) dans le flanc inférieur droit avec 1x10⁷ cellules de lymphome de Burkitt 2 (BL2) lavées, reprises dans 50 µL de PBS et mélangées à 50 µL de Matrigel (Corning). Après randomisation, 5 à 6 souris ont été injectées par voie i.p. avec l'AcM-C#16 (10 mg / kg) ou par le véhicule témoin (PBS). Pour le modèle tumoral pré-établi de xénogreffe, lorsque la tumeur a atteint environ 100 mm³, les souris ont reçu une injection d'AcM-C#16 (10 mg/kg) ou de véhicule témoin aux jours 16, 20, 24, 28 et 32 après inoculation des BL2. Pour le modèle *de novo*, les souris ont reçu une injection de AcM-C#16 (10 mg/kg) ou de véhicule témoin (PBS) les jours 4, 8, 12, 16, 20 et 24 après l'inoculation de BL2. Pour tous les groupes, la taille de la tumeur a été mesurée sur deux axes avec un pied à coulisse digital tous les 2 jours. Les valeurs ont été transformées en volumes tumoraux en utilisant la formule suivante : volume de la tumeur (mm³) = (longueur x largeur²) / 2. Les souris ont été euthanasiées lorsque la tumeur a atteint 1500 mm³ ou à la fin de l'expérience (jour 34).

Analyses statistiques

Sauf indication contraire, des analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad en comparant deux groupes par des tests t de student apparié et tous les groupes entre eux en utilisant l'analyse de la variance (ANOVA) et le post-test de Bonferroni. Pour tous les tests, seules les données donnant des valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives.

Annexe B

Stratégie de production des vecteurs

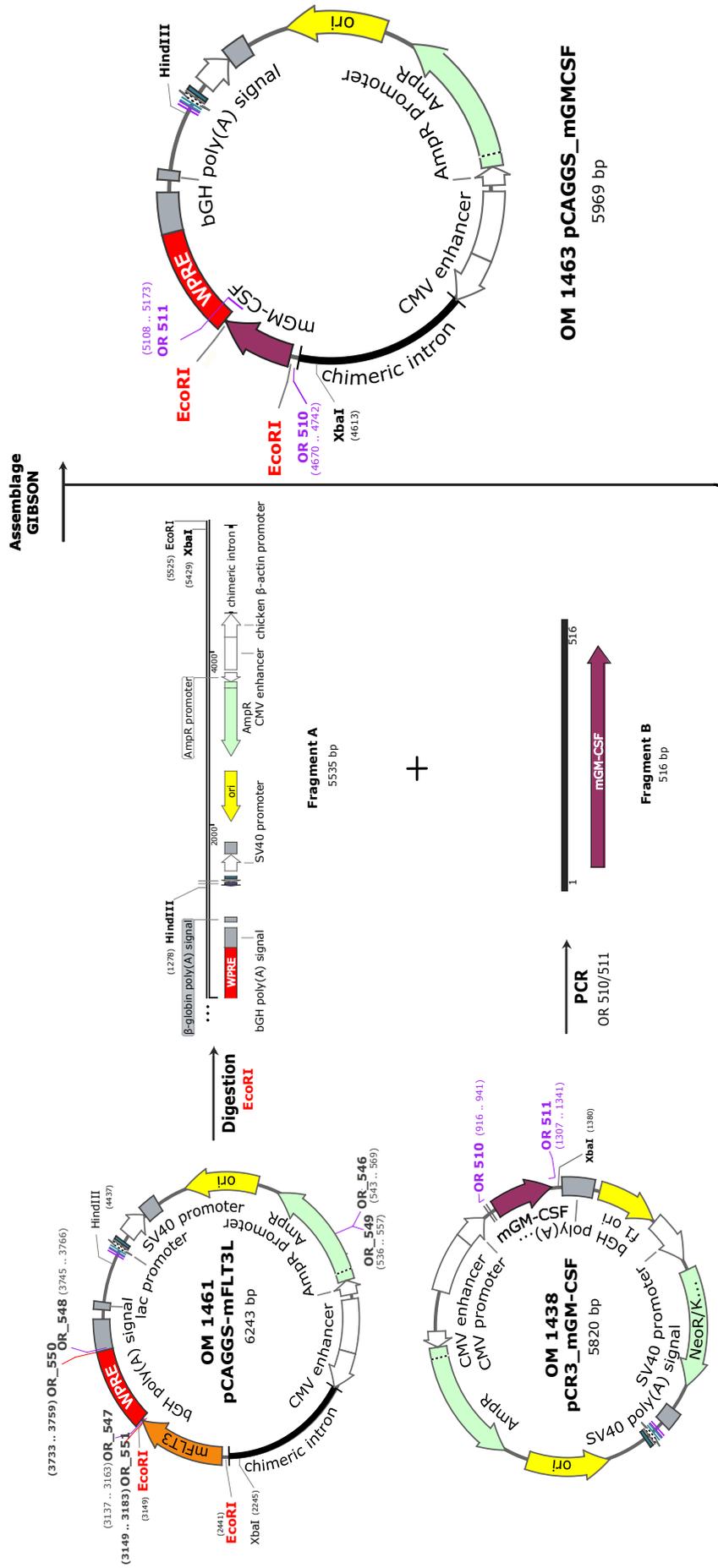


FIGURE B.2 – Stratégie de construction du plasmide OM1463 mGMCSF-pCAGGS

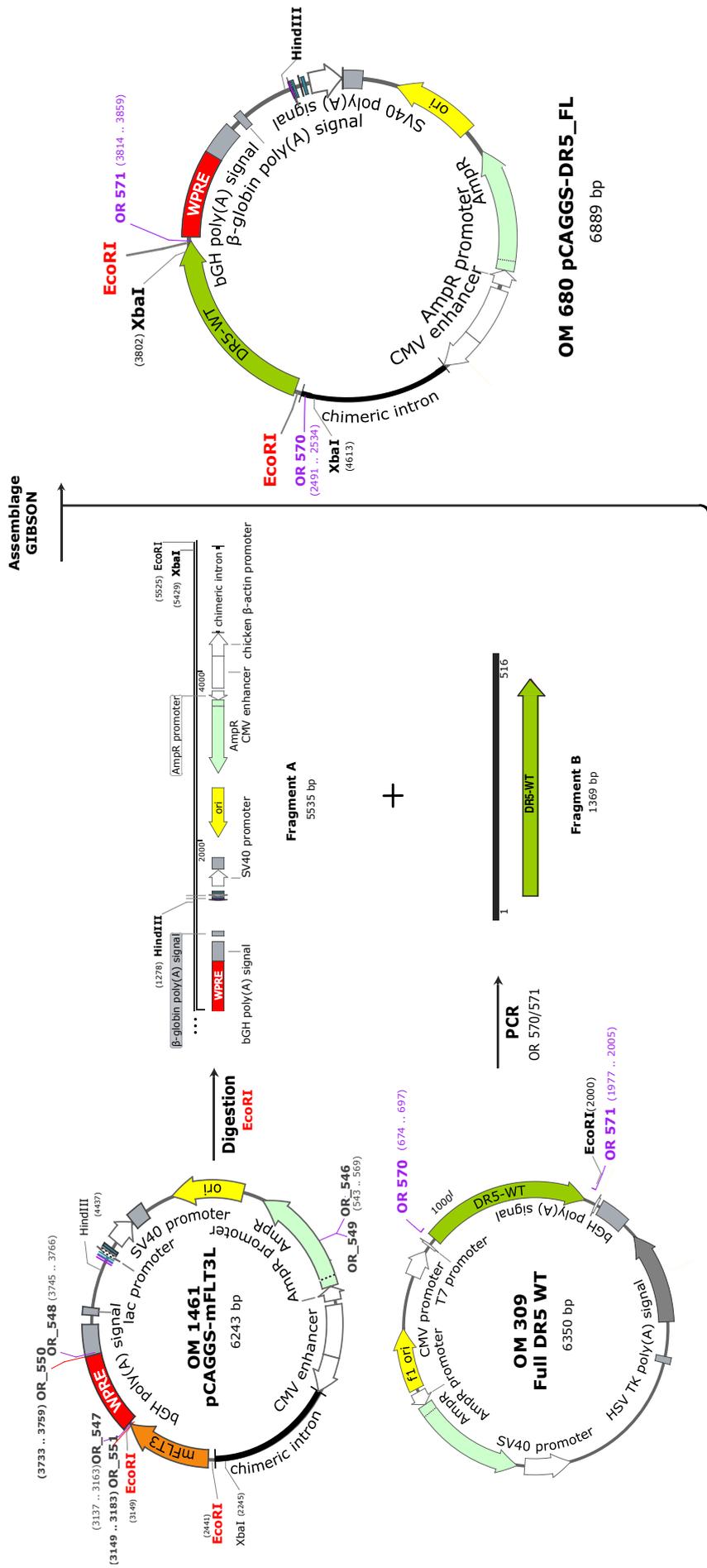


FIGURE B.3 – Stratégie de construction du plasmide OM680 DR5-pCAGGS

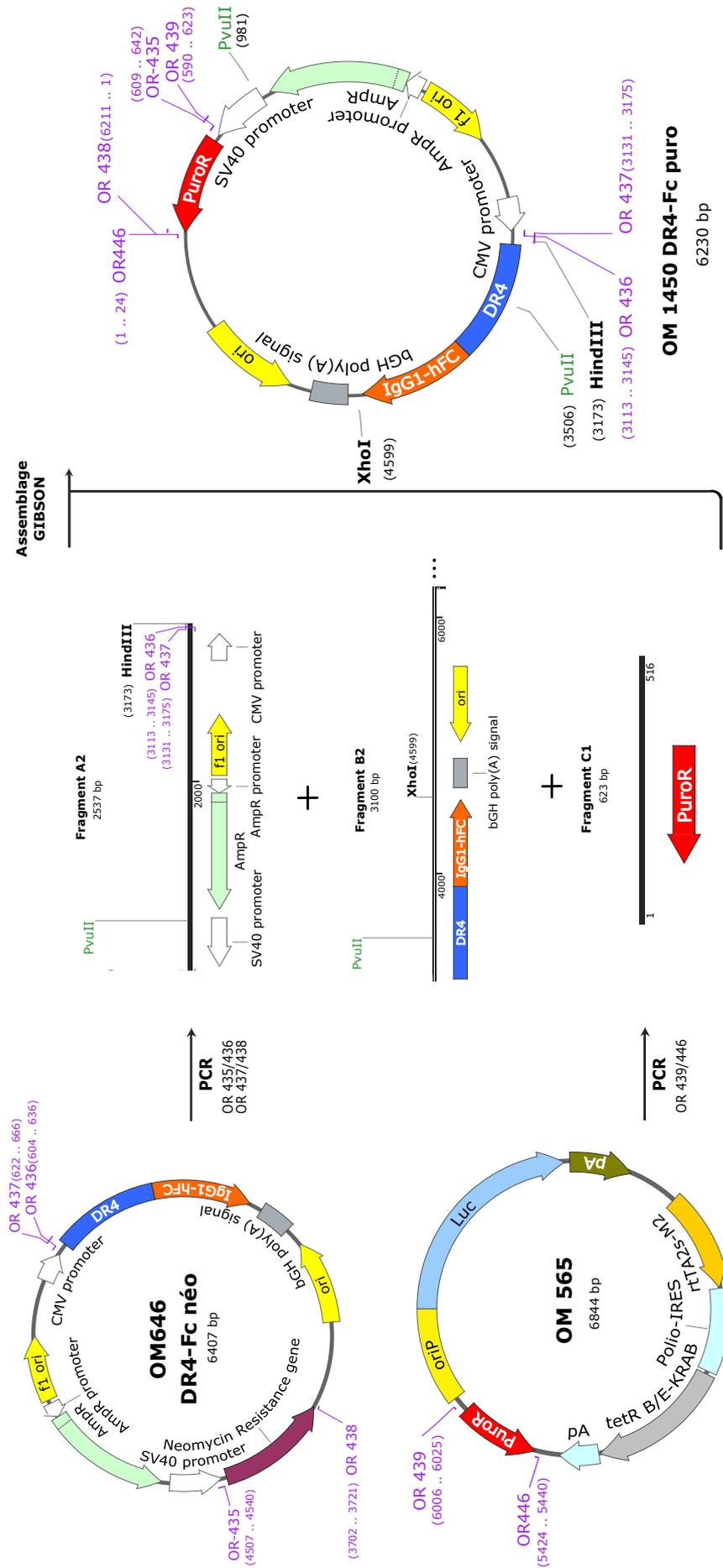


FIGURE B.4 – Stratégie de construction du plasmide OM1450 DR4-Fc puro

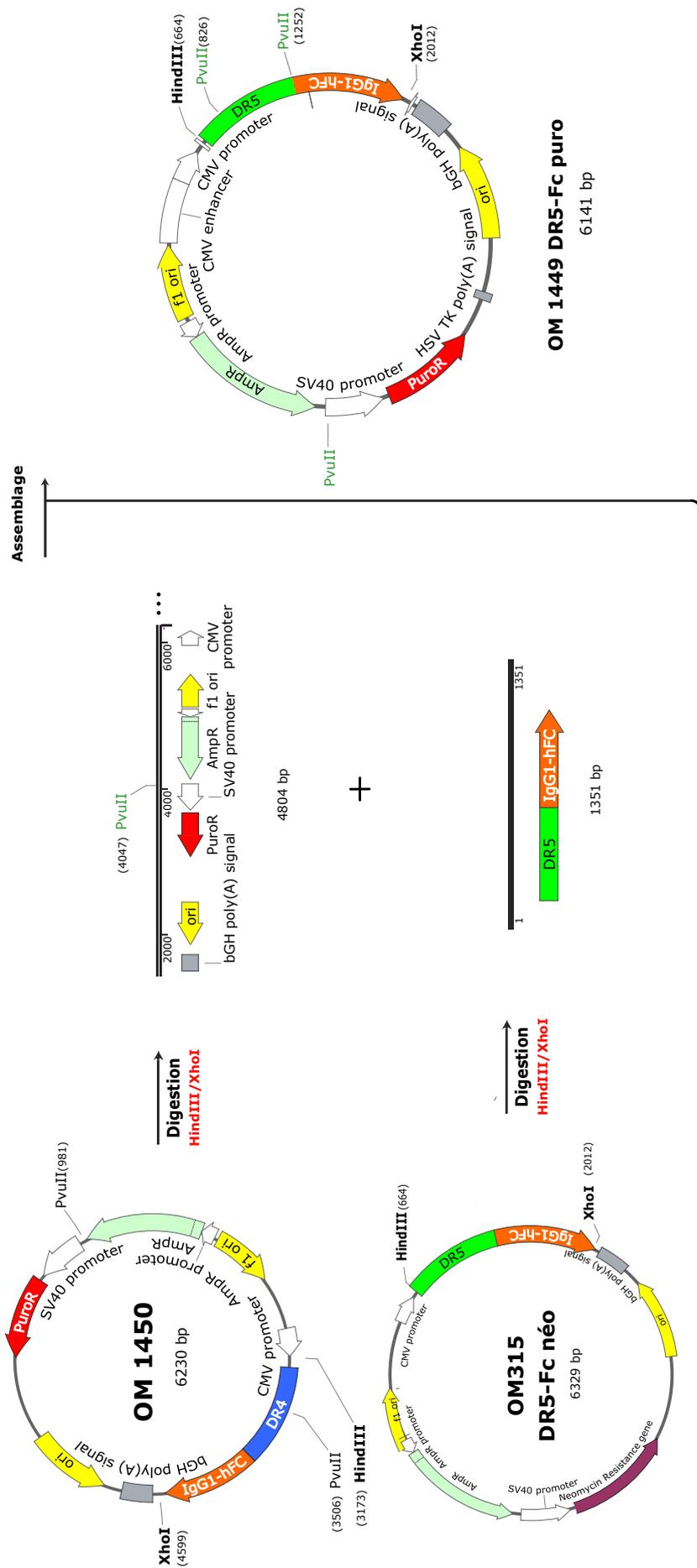


FIGURE B.5 – Stratégie de construction du plasmide OM1449 DR5-Fc puro

Annexe C

Exemples de criblage par ELISA des hybridomes en plaque 96-puits

Bilan des hybridomes à transférer en plaque 24puits

Trail recepateur DR4-pCR3

Hybridomes	test sur DR4-Fc	test sur DR4	Hybridomes	test sur DR4-Fc	test sur DR4
1A2	0,367	0,235	8B2	0,430	0,641
1F2	0,403	0,172	8E5	0,362	0,431
1D3	2,406	2,199	9G8	0,329	0,669
1D4	0,883	0,748	9E10	0,453	0,779
1B8	0,481	0,451	10D1	2,438	2,323
1H10	1,861	1,499	10E3	1,683	0,208
2E3	0,369	0,211	11D7	0,479	0,466
2G3	0,406	0,062	11F11	0,536	0,491
2H6	0,399	0,131	12D2	0,412	0,291
2A7	0,460	0,151	12E4	2,183	2,322
2H9	0,346	0,250	13E10	0,362	0,561
2E10	1,661	1,616	14F2	0,331	0,323
2H12	0,324	0,324	14F4	0,234	0,492
3B1	0,328	0,126	14H4	2,110	2,122
3C1	0,603	0,095	14B5	0,387	0,082
3F2	0,357	0,331	14G5	0,332	0,241
3B3	0,341	0,172	15H5	0,301	0,225
3G3	0,627	0,194	16F6	1,769	2,078
3H3	0,432	0,208	20H9	0,295	0,615
3E5	0,411	0,344	21F6	0,702	0,813
3G6	0,329	0,071	21C8	0,379	1,850
3H6	0,421	0,059	21E11	0,321	0,154
3E7	0,885	0,134	22A1	0,334	0,209
3G7	2,184	0,984	22D1	0,339	0,157
3A9	0,350	0,124	22A3	0,732	0,082
3B10	0,514	0,196	22H3	0,478	0,172
3G10	2,240	2,288	22A4	0,411	0,453
3A11	0,822	0,204	22B4	0,664	0,602
3D22	2,025	2,189	22G4	0,357	0,590
4D2	0,598	0,273	22B5	2,592	2,732
4F2	0,372	0,259	22C5	0,591	0,351
4G2	0,382	0,240	22D5	0,350	0,067
5E2	0,442	0,335	22H5	0,442	0,264
5G4	0,446	0,548	22B10	0,427	0,332
5D10	0,338	0,817	22E10	0,401	0,206
5F12	0,370	0,200	22D11	0,305	0,437
6D6	2,288	2,711	23B5	0,350	0,344
6D7	1,079	1,083	23D8	1,336	0,181
7H3	0,468	0,340	23B10	0,357	0,266
7C10	0,302	0,243			

à transférer en plaque 24puits pour confirmation sur DR5, DR4, BSA, Fc

FIGURE C.1 – Résultats du test ELISA après fusion de la souris DR4-pCR3 R

NB : Les clones sélectionnés ne sont pas révélés dans la thèse dans un souci de propriété intellectuelle.

Projet: Trail récepteur / DR5-pCAGGS /fusion souris 2V

Résultats des 24 puits

Hybridomes	sur DR5 clivé	sur DR4 clivé	sur Fc	sur BSA	Commentaires
4D7	1,379	0,083	0,168	0,077	à tester
4B10	2,254	0,097	0,307	0,084	à tester
5H12	0,980	0,097	0,109	0,062	à tester
7B8	1,477	1,592	1,559	1,947	Abandon non spécifique
8H8	0,800	0,080	0,140	0,081	à tester
9E8	1,234	0,967	1,211	0,607	Abandon non spécifique
11H4	2,145	0,069	0,219	0,067	à tester
11E10	2,552	0,107	0,477	0,094	à tester
11B11	1,773	0,106	0,125	0,066	à tester
11E11	0,992	0,177	0,282	0,097	à tester
13B9	1,843	0,114	0,345	0,066	à tester

FIGURE C.2 – Résultats du test ELISA après fusion de la souris DR5-pCAGGS 2V

Bilan fusions 1B1c & 2B1c / DR5-pCAGGS

Résultats des 24 puits

Souris	Hybridomes	Stade	DR5 clivé	BSA	Commentaires
BALB/c 1 B1c	9H1	24 puits	2,292	0,117	à tester
	9H3	24 puits	2,155	0,099	à tester
	9A12	24 puits	0,343	0,158	Abandon
	10B3	24 puits	1,765	0,082	à tester
	11G3	24 puits	2,308	0,070	à tester
	11H6	24 puits	2,117	0,080	à tester
	12E5	24 puits	1,768	0,079	à tester
	1H7	24 puits	0,074	0,077	Abandon
BALB/c 2 B1c	10G4	24 puits	0,397	0,187	Abandon
	12H2	24 puits	0,102	0,067	Abandon
	12C3	24 puits	1,888	0,084	à tester
	12G9	24 puits	0,108	0,075	Abandon
	15D11	24 puits	1,062	0,071	à tester
	16E8	24 puits	0,127	0,079	Abandon
	18A3	24 puits	0,146	0,113	Abandon
	18B12	24 puits	0,083	0,099	Abandon
	9D1	24 puits	0,114	0,101	Abandon

FIGURE C.3 – Résultats du test ELISA après fusions des souris DR5-pCAGGS 1B1c et 2B1c

Annexe D

Exemples de tests au bleu de méthylène des anticorps anti-DR4

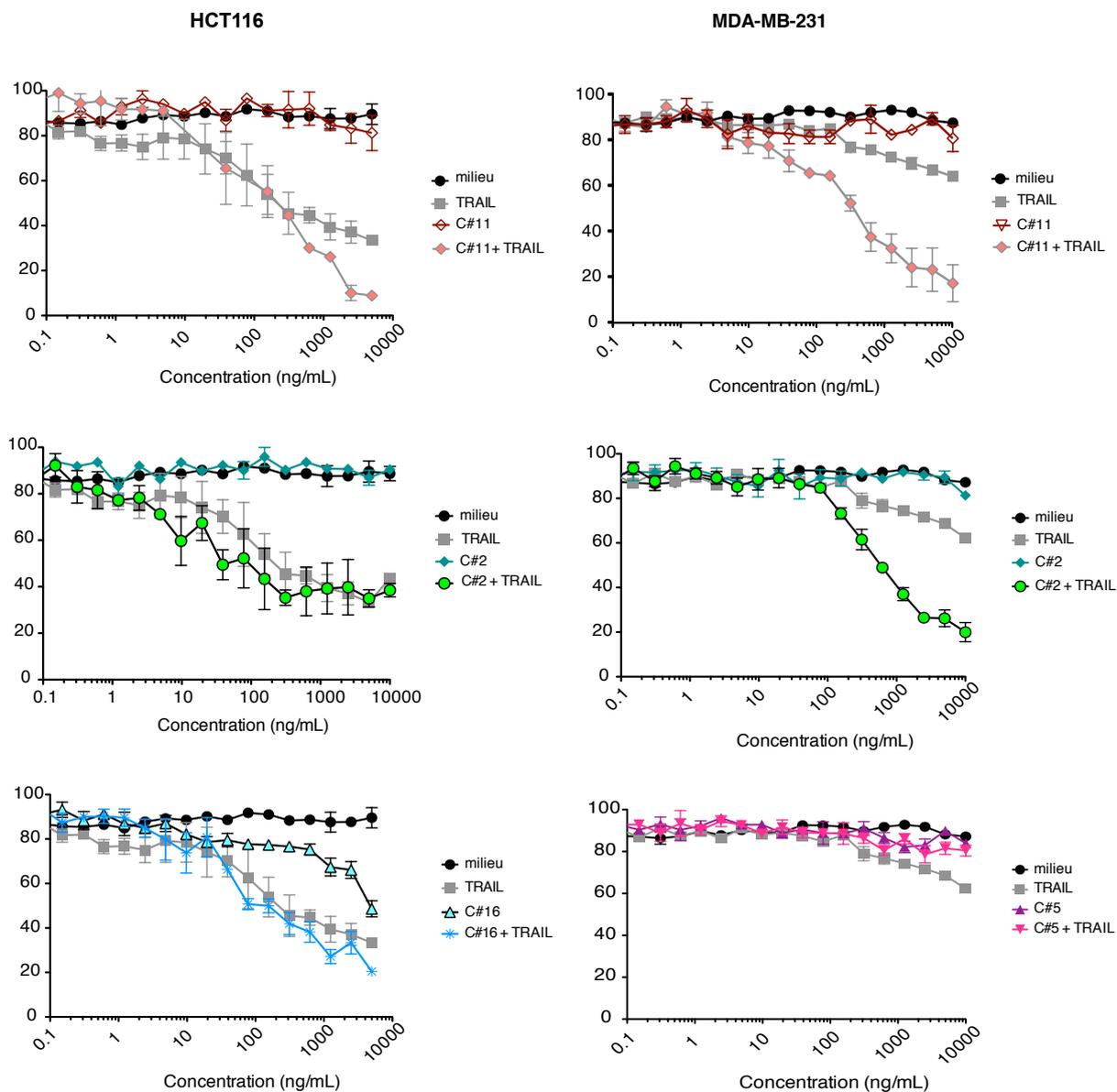


FIGURE D.1 – Évaluation de la cytotoxicité de quelques AcMs anti-DR4 seuls ou combinés à TRAIL. La viabilité cellulaire de HCT116 (à gauche) et MDA-MB-231 (à droite) a été déterminée en utilisant des tests au bleu de méthylène. Les lignées cellulaires ont été traitées pendant 16 heures avec la concentration indiquée de TRAIL ou d'anticorps anti-DR4 AcM-C#11, -C#2, -C#16 et -C#5 seul, ou en combinaison avec TRAIL soluble. Les valeurs présentées sont la moyenne \pm SD de trois expériences indépendantes ($n = 3$).

Annexe E

Criblage de l'AcM-C#16 et de l'AcM-C#11 sur l'ensemble des 10 lignées cancéreuses

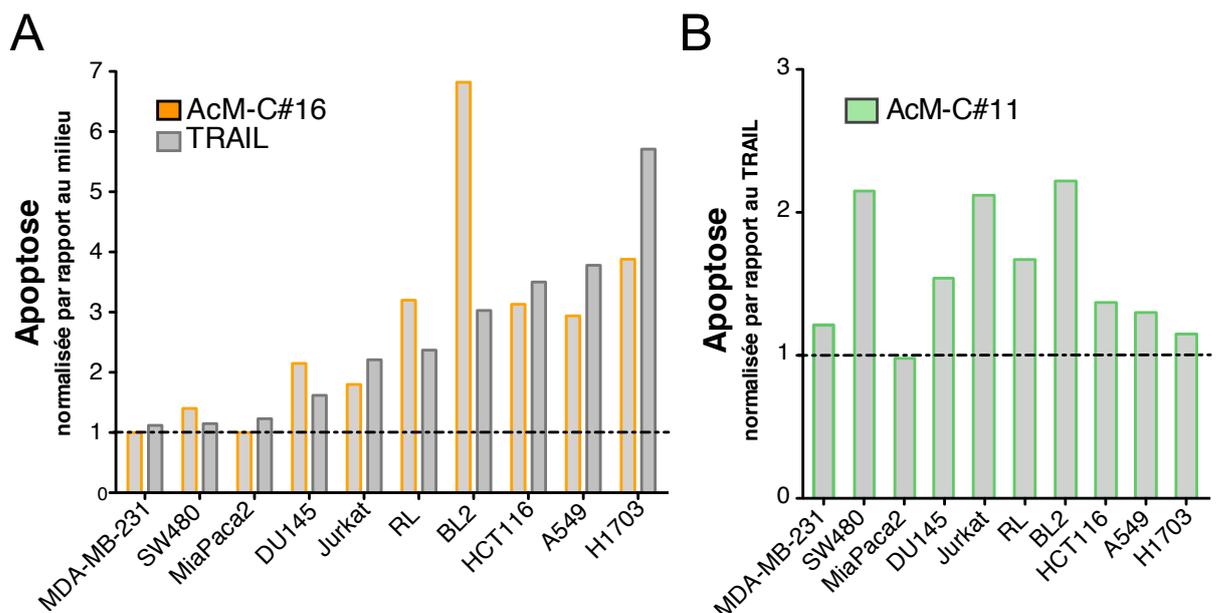


FIGURE E.1 – Effet agoniste et potentialisateur des anticorps anti-DR4 AcM-C#16 et AcM-C#11 sur un panel de 10 lignées cancéreuses humaines. **A.** Criblage de l'anticorps AcM-C#16 et du ligand TRAIL. Les cellules ont été traitées par 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'AcM-C#16. Les résultats ont été analysés par un marquage AnV/7AAD par cytométrie en flux et normalisés par rapport au pourcentage d'apoptose spontanée présent dans le milieu seul ($n = 1$). **B.** Effet potentialisateur de l'anticorps AcM-C#11. Les résultats ont été normalisés par rapport au pourcentage d'apoptose induit par TRAIL seul. Les cellules ont été traitées par une combinaison de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'AcM-C#11 et 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TRAIL, et comme témoin, une concentration fixe de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TRAIL. Les résultats ont été analysés par un marquage AnV/7AAD par cytométrie en flux ($n = 1$).

Annexe F

Exemple représentatif de la taille des tumeurs de chaque groupe des expériences *in-vivo*

Sur DR4-Fc (coating 1µg/ml)

		sérums de souris						
		traitées						non traitée
		3R	4R	5R	1B	4B	5B	1R
dilution 1er puit		1/200						
200		2,708	2,623	2,724	2,661	2,720	2,517	0,194
400		2,516	2,351	2,478	2,555	2,424	2,377	0,126
800		1,862	1,623	1,992	1,942	1,726	1,597	0,093
1600		1,382	1,185	1,198	1,518	1,378	1,317	0,087
3200		0,711	0,588	0,855	0,887	0,721	0,673	0,071
6400		0,468	0,367	0,515	0,524	0,436	0,437	0,064
12800		0,248	0,230	0,264	0,289	0,254	0,253	0,060
25600		0,164	0,131	0,169	0,165	0,161	0,163	0,067
Titre		3200	1600	3200	3200	3200	1600	>200

FIGURE F.1 – Test des sérums de souris à partir de l'expérience de tumeurs pré-établies. Les souris 3R, 4R, 5R, 1B, 4B et 5B ont reçu une injection i.p. avec l'AcM-C#16 (10 mg/kg) et la souris 1R a reçu une injection de PBS (véhicule témoin). 24h après, le sérum est récolté et testé par ELISA sur la protéine recombinante DR4-Fc. Les titres sont considérés comme positifs lorsque la densité optique avoisine 1.

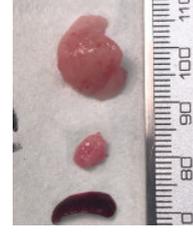
Souris expérience pré-établie



Non traitées



Traitées



Souris expérience de novo



FIGURE F.2 – Évaluation *in situ* de la taille des tumeurs de chacune des expériences *in vivo*. Les souris les plus représentatives de chaque groupe, pour chacune des expériences, à J34, sont présentées ici. Les tumeurs présentées de l'expérience *pré-établie* proviennent d'une souris non traitée (en haut) et d'une souris traitées (en bas). Dans cette expérience, nous avons pu observer la formation d'un second foyer tumoral, juste à côté de la tumeur initiale.

Annexe G

Article I

nistes

Review

Antibodies and Derivatives Targeting DR4 and DR5 for Cancer Therapy

Agathe Dubuisson ^{1,2,3} and Olivier Micheau ^{1,2,3,*}

¹ University Bourgogne Franche-Comté, INSERM, LNC UMR1231, F-21079 Dijon, France; Agathe.Dubuisson@u-bourgogne.fr

² CovalAb, Research Department, 11 Avenue Albert Einstein, 69100 Villeurbanne, Lyon, France

³ INSERM, UMR1231, Laboratoire d'Excellence LipSTIC, F-21079 Dijon, France

* Correspondence: olivier.micheau@inserm.fr; Tel.: +33-380-393-468

Received: 15 September 2017; Accepted: 19 October 2017; Published: 25 October 2017

Abstract: Developing therapeutics that induce apoptosis in cancer cells has become an increasingly attractive approach for the past 30 years. The discovery of tumor necrosis factor (TNF) superfamily members and more specifically TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), the only cytokine of the family capable of eradicating selectively cancer cells, led to the development of numerous TRAIL derivatives targeting death receptor 4 (DR4) and death receptor 5 (DR5) for cancer therapy. With a few exceptions, preliminary attempts to use recombinant TRAIL, agonistic antibodies, or derivatives to target TRAIL agonist receptors in the clinic have been fairly disappointing. Nonetheless, a tremendous effort, worldwide, is being put into the development of novel strategic options to target TRAIL receptors. Antibodies and derivatives allow for the design of novel and efficient agonists. We summarize and discuss here the advantages and drawbacks of the soar of TRAIL therapeutics, from the first developments to the next generation of agonistic products, with a particular insight on new concepts.

Keywords: TRAIL; death-receptor targeting; ligand; cancer therapy; apoptosis; antibody; bi-specific; antibody drug conjugate; chimeric antigen receptor; scFv

1. Introduction

One of the most prominent hallmarks of cancer cells is their ability to escape apoptosis, a programmed cell death process that occurs both during embryonic development and in adults, to remove unwanted cells [1]. Attempts to induce tumor cell death drove intense worldwide research, starting from conventional chemotherapy in the mid-20th century [2] to novel selective approaches, including targeting of TNF (tumor necrosis factor alpha) receptor superfamily members. As early as 1975, the discovery that TNF exhibits potent killing properties [3] unveiled the identification of endogenous cytokines displaying antitumoral properties. Unfortunately, TNF presented significant inflammatory toxicity in clinical trials [4]. In the late '80s, the independent discovery of two monoclonal antibodies, α -APO-1 and α -Fas [5,6], able to trigger apoptosis and induce tumor regression, fostered major interest in the identification of TNF-related family members [7,8], including receptor Fas/CD95, to which α -APO-1 and α -Fas bind specifically. Several other homologous proteins, displaying pro-apoptotic properties, have soon after been discovered, such as FasL, the Fas/CD95 cognate ligand, or TRAIL (TNF-related apoptosis inducing-ligand) and its agonist receptors [7,9–13]. While FasL or antibodies targeting Fas/CD95 exhibit potent pro-apoptotic capabilities, their use in the clinic was early compromised by the finding that the α -Fas monoclonal antibody induces fulminant and lethal hepatotoxicity in vivo [14]. On the contrary, however, TRAIL, early on, was found to be safe in animal models, and to display tumoricidal activity [15].

TRAIL, also known as Apo2 ligand, is a TNF family member discovered in 1995 [9]. This type 2 transmembrane protein has attracted the interest of scientists because of its capacity to specifically engage apoptosis of tumor cells, regardless of their P53 status [16]. TRAIL can induce programmed cell death in a wide range of cancer cells without harming normal tissues, thus exerting limited toxicity [17]. This specificity makes it a very promising anticancer agent. The other main advantage of TRAIL is its independence towards P53, a tumor suppressor gene, whose integrity is, most of the time, essential for conventional chemotherapeutic drugs to cure patients suffering from cancer [2]. Keeping in mind that mutations or alterations of P53 are often occurring during oncogenesis and associated with resistance to chemotherapy, TRAIL has thus been suggested to be able to exert its tumoricidal activity in a broader scope. TRAIL is present as a trimer at the cell surface of activated immune cells, where it plays an important role in tumor and viral immune surveillance [18–20]. Together with the soar of biopharmaceuticals and biotechnology engineering, the finding that a natural cytokine, such as TRAIL, could induce selective tumor cell death prompted great optimism to find the “magic bullet” to cure cancer. While the first generation of TRAIL agonist compounds did not present clinical efficacy [16], recent studies on TRAIL signal transduction allowed a better understanding of its machinery and requirements, leading to the development of a tremendous number of derivatives displaying increased pharmacokinetics and efficacy, including single-chain variable antibody fragment (scFvs), bispecific antibodies, chimeric antibody receptors (CARs) or conjugated derivatives, all of which are discussed in this review.

2. Apoptosis Induced by TRAIL

TRAIL induces cell death by binding to its agonist receptors. To date, five TRAIL receptors have been identified in humans: DR4, DR5, DcR1, DcR2, and osteoprotegerin (OPG) (Figure 1). These receptors, like all members of the TNF super family, are characterized by an extracellular domain, rich in cysteines [21], which are essential for the binding of their cognate ligand. Only two of them, DR4 and DR5, harbor the death domain (DD), a stretch of ~90 amino acids (aa), required and sufficient to activate the apoptotic machinery; they consequently represent promising targets for cancer treatment. DR4, is a *N*-glycosylated protein of 468 aa, also known as tumor necrosis factor receptor superfamily member 10A, CD261, Apo2, TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1, and TRAILR-1 [22,23]. DR5 is *O*-glycosylated [24]. It is also known as tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B, CD262, Killer/Ly98, TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2, TRICK2A, and TRICKB. Although DR5 can be found as two isoforms, DR5a (411 aa) and DR5b (442 aa), their specific or differential functions remain, to date, unknown. DR4 and DR5 share 58% similarity in their extracellular domain and 65% similarity in their intracellular domain [10] (Figure 2A). The other receptors to which TRAIL is able to bind are DcR1 (antagonist decoy receptor for TRAIL/Apo-2L, lymphocyte inhibitor of TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 3, TRAIL receptor 3, tumor necrosis factor receptor superfamily member 10C, CD263, lymphocyte inhibitor of TRAIL (LIT), tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10C, decoy without an intracellular domain, TRAIL-R3), DcR2 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 4, TRAIL receptor 4, TRAIL receptor with a truncated death domain (TRUNDD), tumor necrosis factor receptor superfamily member 10D, CD264, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10D, decoy with truncated death domain TRAIL-4), and OPG (osteoprotegerin, osteoclastogenesis inhibitory factor, TR1, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11B). These receptors cannot induce intracellular death signals, and are suspected to act mostly in normal tissues as decoy receptors for the retro control of TRAIL-mediated apoptosis [25]. Whereas DcR1 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor receptor which is completely devoid of death domain, DcR2 possesses an intracellular domain but harbors a non-functional truncated death domain. OPG is the only antagonist receptor harboring a complete death domain, but it is expressed as a soluble receptor, due to the absence of transmembrane domain, and is therefore unable to transduce apoptosis. Nonetheless, like DcR1 and DcR2, albeit to a lower extent, OPG is able to compete for TRAIL binding, and impair TRAIL-induced cell death. Its binding affinity with TRAIL, though, is much weaker than DR4, DR5, DcR1, or DcR2 [26,27]. Moreover, OPG exhibits strong binding affinity with Receptor activator of NK-kappa-B

ligand (RANKL), and plays a prominent role in osteoclastogenesis [28,29]. Contrary to DR4 and DR5 [30–33], DcR1, DcR2, or OPG have been found to be expressed in normal tissues, but are rarely found in tumor cells [34–36].

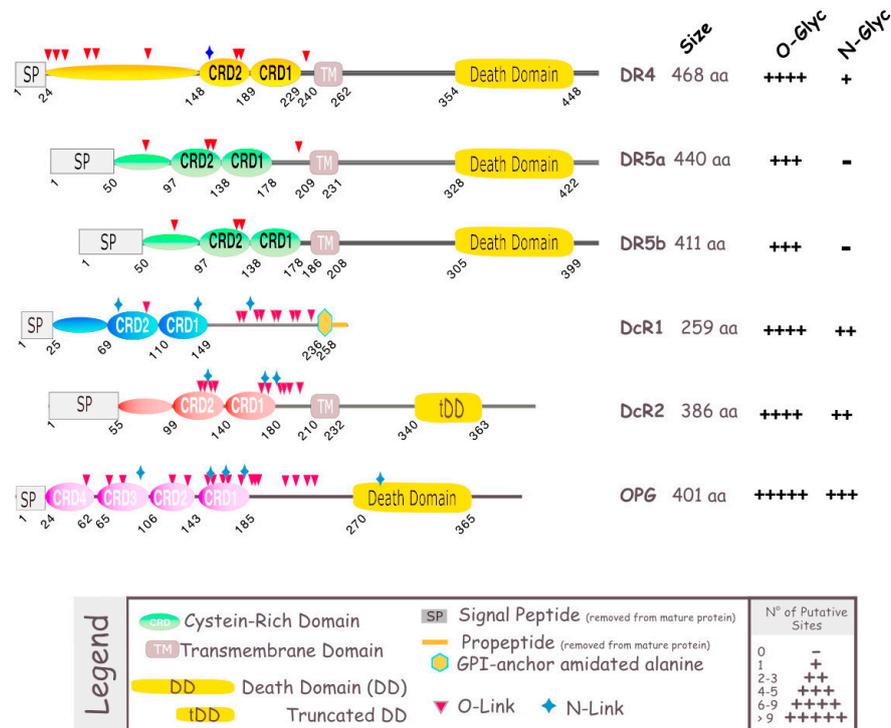


Figure 1. Schematic representation of TRAIL receptors. TRAIL-R1/death receptor 4 (DR4), TRAIL-R2/death receptor 5 (DR5), act as agonistic receptors, owing to their intracellular death domain (DD), through which they transmit an apoptotic signal. The other two membrane receptors, TRAIL-R3/decoy receptor 1 (DcR1) and TRAIL-R4/decoy receptor 2 (DcR2), act as antagonistic/regulatory receptors, due to their lack of functional DD. Osteoprotegerin (OPG), contains a DD, but is unable to trigger apoptosis as it lacks a transmembrane domain (TM), and is therefore a soluble receptor. DR4 and DR5 have been found to be *N*- and *O*-glycosylated, respectively [22–24]. DcR1, DcR2 and OPG, alike, as most members of the TNF superfamily [37], contain putative glycosylation sites, which are depicted as blue stars or red triangle. The size of these receptors is shown on the right-hand side.

As mentioned above, TRAIL is naturally found as a trimer. It contains an unpaired cysteine residue in position 230, where other ligands of the family have a disulfide bridge that is essential for both stability of the trimer and pro-apoptotic activity [38]. Binding of TRAIL to its receptors induces their oligomerization [38]. Multimerization of agonist TRAIL receptors at the cell surface is the first critical event determining whether apoptosis will be fully triggered or not [39,40]. It is worth mentioning here that *N*- and *O*-glycosylation of DR4 and DR5, respectively, were found to be required for proper aggregation of these receptors and execution of apoptosis through recruitment of TRAIL DISC (death-inducing signaling complex) machinery [22,24]. Binding of TRAIL to DR4 and DR5, allow homotypic death domain (DD)-dependent recruitment of the adaptor protein Fas-associated death domain protein (FADD) and subsequent interaction with the pro-caspase-8, also associating within the DISC through death-effector domain homotypic interactions (see Shirley et al. for a comprehensive review [41]).

coined type II cells [44], are nevertheless able to amplify the pro-apoptotic signal through mitochondria. Also known as the intrinsic pathway, the mitochondrial pathway involves the formation of a soluble macromolecular complex known as the apoptosome [45]. This pathway, usually activated by DNA-damaging agents such as chemotherapeutic drugs, is tightly regulated by Bcl-2 proteins (see Jacquemin et al. [46]). Its activation upon TRAIL stimulation is brought by the cleavage of Bid, a BH3-only protein of the Bcl-2 family, and by caspase-8 (Figure 3), leading to cytochrome c release and to the association of pro-caspase-9 with Apaf-1 to form the apoptosome. Activation of caspase-9, in turn, results in the cleavage and activation of caspase-3 and apoptosis.

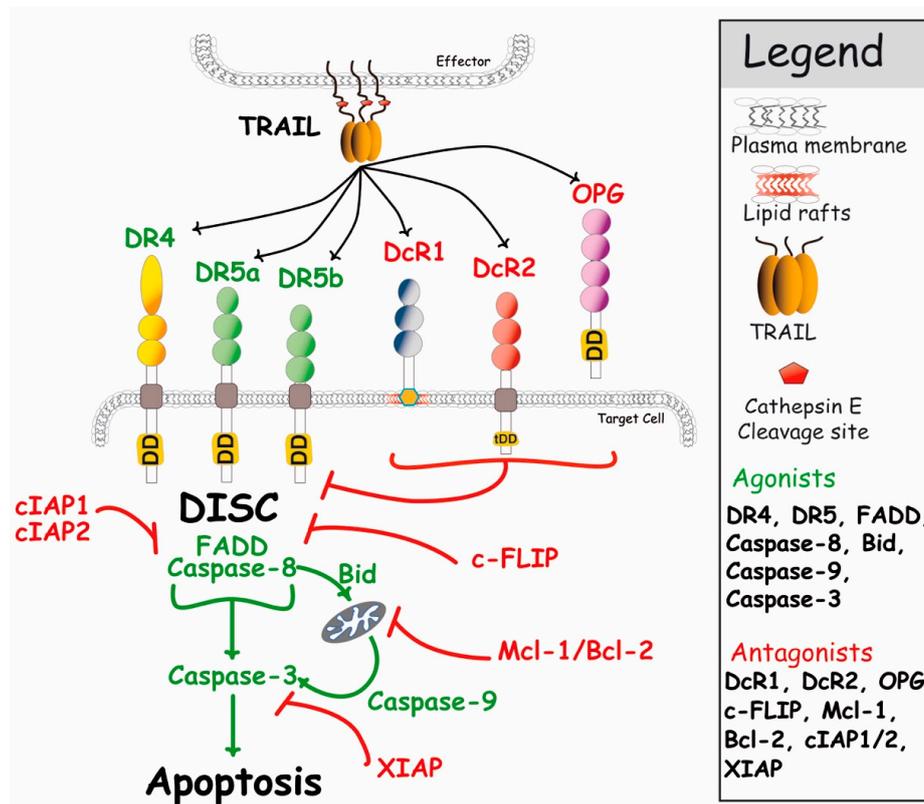


Figure 3. Simplified schematic representation of the main events regulating TRAIL-induced apoptosis. DR4 and DR5 agonistic receptors are able to recruit FADD and caspase-8 upon TRAIL stimulation, leading to apoptosis (see text for detail). In the presence of antagonist receptors, TRAIL-induced cell death is restrained, either due to competition for TRAIL binding (DcR1 and OPG) or steric hindrance, leading to reduced caspase-8 activation (DcR2, see Merino et al., 2006 [47], and Shirley [41]). Within the cytoplasm, the inhibitor c-FLIP, as well as Bcl-2 family members, can also restrain caspase activation and apoptosis, leading to cell resistance to TRAIL-induced cell death [48].

Endogenous TRAIL is naturally found associated with membranes of activated immune cells, and as such, is extremely potent in inducing apoptosis of unwanted cells [25,49–52]. Like most members of the TNF superfamily, TRAIL can be cleaved from the membranes by proteases, including cathepsin E [37], and like recombinant soluble TRAIL trimers, with the exception of a few preparations, soluble TRAIL (sTRAIL) is not able to trigger apoptosis [53–56]. To obtain biologically active TRAIL, researchers have had to use a number of strategies ranging from stabilization of the trimer with zinc [57], production of single chains [58,59], permutation of the ligand (circularly permuted TRAIL, CPT) [60], or fusion of particular amino acid or protein structures to TRAIL (i.e., 6xHis, LZ, collagen, tenascin C, or Ig-Fc) [15,61–63] to increase or restore TRAIL-killing capabilities (see Figure 4). Importantly, irrespective of the biological potential of TRAIL, as both DR4 and DR5 are equally able to bind TRAIL and recruit caspase-8 within the DISC, recent evidence indicates that DR4 is superior to DR5 in transducing apoptosis upon 6xHis-TRAIL binding [56], but also to “membrane-

like" TRAIL, functionalized to nanoparticles [64] (also, unpublished data). Although the molecular explanation of this differential behavior remains unknown, this particularity is likely to be of interest for ongoing and future development of TRAIL derivatives aiming at treating patients in the clinic. In particular, this raises the question whether therapeutic antibody derivatives should target both receptors or not, which is the reason why we have decided to discuss both TRAIL and antibody derivatives in this review.

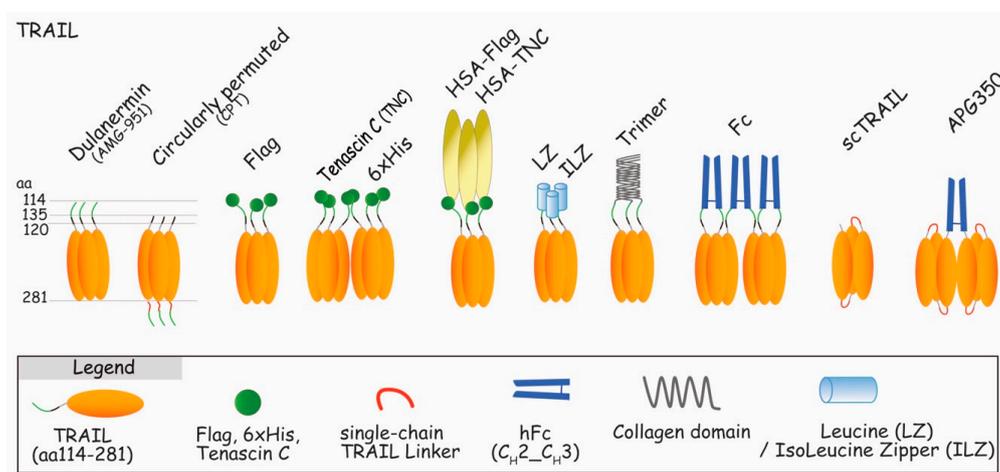


Figure 4. Schematic representation of the main TRAIL recombinant proteins assessed in clinical trials or used in laboratories to induce apoptosis through DR4 and/or DR5. Dulanermin (TRAIL aa114-281) [65,66], circularly permuted TRAIL (CPT, TRAIL aa135-281-linker-TRAIL aa122-135) [67], Flag-TRAIL [68], TNC-TRAIL [61], 6xHis-TRAIL [55], HSA-TRAIL [69], Leucine Zipper and Isoleucine Zipper-TRAIL [15], Trimer-TRAIL [70], Fc-TRAIL [63], Fc-sc-TRAIL [71], and AGP350 [40].

3. TRAIL in Clinical Trials

After the discovery of the attractive concept inferred from TRAIL signaling properties, attempts to translate TRAIL to the clinic was first carried out by Genentech, and next by Beijing Sunbio Biotech Co. Ltd. (Beijing, China).

3.1. First Attempts to Use TRAIL in Clinical Trials

Recombinant human TRAIL, rhTRAIL, has been largely tested at the preclinical level for its tumor selective killing properties and safety [17]. The good results have encouraged Genentech to develop their own construct binding to DR4 and DR5: dulanermin, rhApo2L/TRAIL, a recombinant protein encoding TRAIL from amino acids (aa) 114 to 281 (Figure 4). Unfortunately, dulanermin monotherapy did not induce sufficient overall therapeutic activity to support further clinical development [66,72–78]. The main limitation was proposed to be due to two main factors, its short bioavailability and inherent resistance of primary tumors to TRAIL-induced cell death [16]. Likewise, dulanermin's half-life, ranging from 40 min to 1 h after injection, was found to be rather short, limiting, thus, its action window. The second problem is the possible resistance of the cancer cells to the treatment [79]. At the cell membrane, resistance can be due to the expression of inhibitors, including DcR1, DcR2, two antagonist receptors (DcRs) whose binding affinity with dulanermin is nearly identical to DR4 and DR5 [27]. The tumor microenvironment is a complex biological system, in which the antitumoral action of dulanermin is also likely to be compromised, irrespective of the initial sensitivity of the tumor itself. Likewise, it has been proposed recently that stromal cells harboring DcRs are also likely to impede dulanermin's efficacy [80]. More downstream, a plethora of intracellular inhibitors can induce resistance of TRAIL after binding to its agonistic receptors [81]. The most important inhibitor being c-FLIP, whose expression in cancer cells was found to be upregulated by serum-derived active biomolecules, such as phospholipids [82]. It is therefore more than likely that its upregulation in primary tumors contributes to the lack of efficacy of dulanermin.

In the same vein, pro-survival proteins including inhibitor of apoptosis proteins (IAPs), X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) or survivin, are often highly expressed in cancer cells and may counteract TRAIL-induced apoptosis as well [83]. Last, but not least, resistance may also be attributed to microRNAs, as several of them are dysregulated in tumor cells and are known to display potent pro-survival signaling potential. Likewise, miR-133a and miR-519a-3p have recently been found to induce NF- κ B activation and to suppress DR5 expression [84,85].

Because conventional chemotherapeutic drugs have long been known for their ability to increase or restore TRAIL sensitivity in tumor cells [16], and even to overcome resistance induced by DcR2 [86], additional clinical trials have been set up to evaluate the efficacy of dulanermin combined with chemotherapy [16]. However, albeit well tolerated by the patients, these combinations, like dulanermin alone, did not lead to increased objective responses [16]. This lack of efficacy raised the need to develop products displaying better efficacy. It should be noted, though, that a phase III clinical trial is ongoing, aiming at evaluating the effects of dulanermin injections in the treatment of advanced non-small cell lung cancer [87].

3.2. Novel TRAIL Versions

In response to the disappointing results of dulanermin, several new formulations of TRAIL have been developed to improve recombinant TRAIL stability and half-life [59,88–90] (Figure 4). Most of the attempts have been done by fusing TRAIL to itself as single chains trimers, to single-chain variable antibody fragment (scFv), conjugating TRAIL with chemical drugs, attaching TRAIL to nanoparticles, and by expressing TRAIL on the cell surface of delivery cells. Among the numerous TRAIL fusion formulations, tenascin-C-TRAIL (TNC-TRAIL), TRAIL-Fc, and single chain-TRAIL (scTRAIL) constructs presented interesting conformational and pharmacokinetic properties. Constructs such as TNC-TRAIL were developed to stabilize the trimeric conformation of TRAIL, and were found to increase both receptor clustering and apoptosis [61]. TRAIL-Fc and scTRAIL were used to increase the pharmacokinetics properties of TRAIL, as well as its tumoricidal activity [63]. More specifically, a highly stable trimer scTRAIL (APG350) was designed as a hexavalent TRAIL. This hexameric TRAIL construct was able to induce potent programmed cell death with no need for further crosslinking of TRAIL [40], as is usually required to increase other recombinant TRAIL preparations, such as Flag-TRAIL [61,91,92].

More interestingly, Beijing Sunbio Biotech Co. Ltd. (Beijing, China) has recently developed a novel TRAIL preparation (Figure 4), described as circularly permuted TRAIL (CPT), exhibiting better stability, longer half-life, and stronger antitumor activity, as compared to dulanermin. In early phase II clinical trials, CPT was found to be relatively well tolerated and albeit limited toxicities were reported, CPT was found to elicit an antitumoral response, alone or combined with thalidomide and/or dexamethasone, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma [60,93,94]. CPT is thus, so far, the best and most promising TRAIL derivative. However, similar to TRAIL, CPT is not only likely to suffer from resistance induced decoy receptors in patients but also likely to promote of cell migration and metastasis [95–97]. This implies that further assessment in preclinical animal models are likely needed, to exclude the possibility that CPT may, in a limited number of patients, promote cell-motility and/or metastasis. These limitations have, early-on, prompted the development of more specific therapies that target only DR4 and DR5.

4. First Antibodies in Clinical Trials

Monoclonal antibodies (moAbs) represent tools of choice for the targeting of DR4 and DR5. They clearly offer advantages for eradicating tumors. First of all, they have a longer in vivo half-life (around 14 days) than TRAIL. Second, their Fc domains allow interactions with Fc receptors (FcRs) present on the cell surface of immune cells leading to antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and complement-dependent cellular cytotoxicity (CDC). Finally, owing to their selectivity, moAbs are fully independent of decoy receptors expression, whether on the tumor cells or microenvironment. So far, seven agonistic monoclonal antibodies have been tested in clinical trials: one anti-DR4 and six anti-DR5.

Mapatumumab, also known as HGS-ETR1 or TRM1, is the only anti-DR4 monoclonal antibody that has been evaluated in clinical trials, so far (Figure 5). Developed by the Human Genome Science (HGS) in 2005, this fully human DR4-agonistic demonstrated selective and high binding to DR4, as well as cytotoxicity efficiency [98]. Mapatumumab has been evaluated in several phase I and II clinical trials [99–108], but none of the assays met the initial objectives, prompting discontinuation of its clinical development. Other mouse moAbs targeting DR4 and displaying pro-apoptotic potential have been described in preclinical studies, including m921/922 [109], 4H6/4G7 [110], AY4 [111], and TR1-mAbs [112], but as far as we are aware of, none are being evaluated in the clinic.

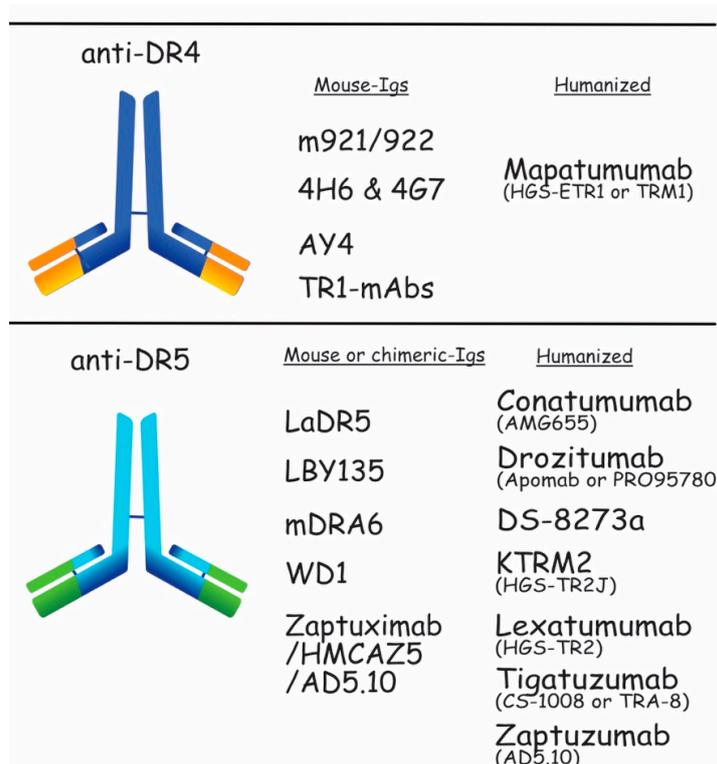


Figure 5. Schematic representation of the DR4 and DR5 moAb. Anti-DR4 developed in preclinical and clinical trials are shown in the upper panel. m921/922, 4H6 & 4G7, AY4, and TR1-mAbs are mouse-Iggs tested in preclinical trials. Mapatumumab is a humanized-Ig assessed in clinical trials. The lower part of the figure shows the anti-DR5 developed as mouse or chimeric-Iggs, which are LaDR5, LBY135, mDRA6, WD1, and Zaptuximab, as well as its humanized form, Zaptuzumab. Conatumumab, Drozitumab, Tigatuzumab, KMTR2, Lexatumumab, and more recently, DS-8273a, are also humanized antibodies targeting DR5. All of them have been tested in clinical trials.

As opposed to DR4, many more monoclonal antibodies against DR5 have been assessed in clinical trials. These include Conatumumab (AMG655), Drozitumab (Apomab or PRO955780), Lexatumumab (HGS-TR2), LBY135, Tigatuzumab (CS-1008 or TRA-8), and DS-8273a [113–124]. Conatumumab, Drozitumab, Lexatumumab, and DS-2873a, respectively, developed by Amgen, Genentech, HGS, and Daiichi-Sankyo, and are fully human DR5-agonistic antibodies. Conatumumab and Drozitumab exhibit effective antitumor effects against advanced solid tumors and Lexatumumab was examined in prostate cancer and bladder cancer cells [116,125,126]. DS-8273a is the latest anti-DR5 antibody assessed in the clinic. Interestingly, the first publication describing this antibody demonstrates that DS-8273a could be of use to eradicate myeloid-derived suppressor cells in patients with advanced cancer, indicating that DS-8273a could indirectly contribute to antitumor therapies [114]. Despite the fact that no objective response has been observed in this study, three additional clinical trials are ongoing, aiming at evaluating its safety in patients with advanced solid tumors and

lymphomas or benefit combined to Nivolumab in patients with advanced colorectal cancer as well as unresectable stage II and IV melanoma [87].

LBY135 and Tigatuzumab are chimeric and humanized mouse–human antibodies, correspondingly developed at UAB with Daiichi-Sankyo and Novartis. LBY135 was well tolerated in solid advanced tumors, and Tigatuzumab was tested for relapsed lymphoma or solid tumors [121,127]. Alone or in combination, Conatumumab and Drozitumumab went to phase II clinical trials, whereas Lexatumumab, LBY-135, and Tigatuzumab did not get beyond phase I clinical trial [16].

Despite encouraging preclinical results, the outcomes of these clinical trials were disappointing. Most of these antibodies appeared to be relatively safe and well tolerated by the patients, but none displayed sufficient clinical benefits. At best, these moAbs induced stable disease, but none of them improved the response rates, whether used alone or combined with chemotherapy. As a consequence, and with the exception of DS-8273a, companies discontinued their development [128–130]. One of the reasons for the lack of clinical efficacy of these moAbs may be the inherent resistance of primary tumors to apoptosis. Apoptosis is tightly controlled by a number of activators and suppressors, whose expression levels determine sensitivity or resistance of the targeted cells, respectively [28,131,132]. After binding to its targets, moAbs initiate formation of the TRAIL DISC, but efficient signal transduction of apoptosis can be inhibited at the very early stage, at the DISC level, by c-FLIP or more downstream, at the mitochondrial level by Bcl-2 family members or cIAP1/cIAP2 and XIAP (Figure 3), leading to cell resistance [133–137]. Circumvention of these inhibitory checkpoints has been achieved in a number of preclinical models using conventional chemotherapy, thus restoring tumor cell sensitivity to TRAIL or agonist moAbs targeting DR4 or DR5 [16,138]. Unfortunately, neither of the combinations tested, so far, showed clinical benefits. It should be noted here that the mode of administration of the combined treatments in these early clinical trials may have also contributed to the lack of efficacy of TRAIL or anti-DR4 and -DR5 agonist moAbs. This is mainly due to the fact that these compounds are often administered into the patient either simultaneously or within short intervals, while in preclinical models, the corresponding chemotherapeutic drug is known to efficiently restore TRAIL-induced cell death, but needs to be given 24 to 72 h ahead, before TRAIL administration [16].

Another explanation for the lack of efficacy of these antibodies may be their weaker ability to trigger apoptosis. Multimerization of TRAIL agonist receptors is mandatory to transduce the apoptotic signal. As opposed to TRAIL, whose ability to trimerize TRAIL agonist receptors at the cell surface is naturally afforded by its spontaneous association as a trimer, moAbs are bivalents. This limited valency could, at least in part, explain why these monospecific antibodies are not the best formulations to target TRAIL signaling for cancer therapy. Indeed, their crosslinking is often further required to increase their antitumor potential [91,110,139–142]. Some of them, though, have been described to induce apoptosis very efficiently in the absence of crosslinking. This is the case for a DR4 bivalent antibody or KMTR2 a fully human moAb agonist targeting DR5, that induces cell death in the sensitive colorectal cell line Colo205 in a ng/mL range [143,144]. In early studies, KMTR2 has been described to be able to suppress growth of subcutaneous glioma xenografts, and prolong animal lifespan bearing intracerebral xenografts [145]. More recently, the crystallographic structure of the extracellular domain of DR5 and a Fab (fragment antigen-binding) domain derived from KMTR2, demonstrated that KMTR2 is able to induce superoligomerization of DR5 [143]. To value the use of anti-DR4 or anti-DR5 moAbs for cancer therapy, and to strengthen their pro-apoptotic potential, other rational approaches have been set up, such as increasing their valency or combining them with TRAIL [146–148]. But so far, none of these therapeutic options have been assessed in the clinic. However, since DR4 and DR5 are attractive targets for cancer therapy, an incredible variety of targeting molecules have been generated, which are presented below.

5. Novel TRAIL-Related Derivatives

Conventional antibodies are composed of two parts: two Fabs (fragment antigen-binding) linked to one Fc (crystallized fragment). Fabs contain regions highly specific to the epitope, while the Fc determines the class of immunoglobulin, and thus, the antibody potential for cell-mediated immune

response. The soar of genetic engineering and our increasing understanding of TRAIL pro-apoptotic signal transduction requirements opens unprecedented opportunities to develop novel promising TRAIL-related derivatives with enhanced antitumor potential [149,150].

5.1. Multivalent-Based Antibodies or Peptides

As discussed above, achieving efficient aggregation of DR4 or DR5 is probably the main bottleneck when considering TRAIL-targeting antibodies or derivatives for cancer therapy. Amongst the monoclonal anti-DR4 and DR5 antibodies described, so far, several are unable to induce tumor cell killing in the absence of crosslinking or coating to the culture plate [110,139–142]. Although antibodies assessed in clinical trial have been described to induce cell death in preclinical models, irrespective of their crosslinking, their lack of clinical efficacy is most likely due to their weaker ability to induce receptor aggregation. In line with this hypothesis, converting DR4-moAb isoforms from IgG to IgM (Figure 6) was found to enhance anti-DR4-mediated apoptosis [146], indicating that increasing moAb valency is a prerequisite to induce sufficient receptor clustering and apoptosis [151]. In the same vein, it has been demonstrated that trimeric DR5 peptidomimetics [152], a tetravalent scFv:DR5 derivative antibody or a single-chain scFv:DR5 nanobody, TAS266 [153,154] display superior antitumor activities than monovalent or divalent peptides or antibodies in preclinical studies (Figure 6). Trimeric DR5 peptidomimetics, for instance, were much more efficient than their dimeric or monomeric counterpart in inducing receptor DISC formation and caspase-8 activation [152]. Whether multivalent anti-DR4 or anti-DR5 will translate to the clinic remains uncertain, so far, as it has recently been found that the scFv:DR5 nanobody, TAS266, alone, displayed hepatotoxicity in a phase I clinical assay aiming at evaluating its safety and tolerability [154]. It should be noted, however, that DR4 and DR5 exhibit distinct crosslinking requirements [91,92]. Likewise, while DR4 was found to be able to trigger apoptosis with a trimeric TRAIL ligand, apoptosis induced by DR5 required crosslinking of TRAIL trimers [92]. It should be noted here, though, that these results were obtained in the presence of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor [155], known to impair cFLIP expression [156]. Further highlighting a differential behavior between DR4 and DR5 is the recent demonstration using isogenic cells expressing solely DR4 or DR5, that DR4 is more prone in inducing apoptosis with soluble hexameric TRAIL than DR5 [56], in the absence of any inhibitor. DR5 remains, however, fully capable of inducing apoptosis when activated by membrane-bound TRAIL, a situation that can be recapitulated using a soluble TRAIL fused to a scFv targeting a defined antigen [92]. This strategy, which allows antigen-dependent immobilization of TRAIL at the cell surface, has largely been explored with a large panel of scFvs, and is described in the paragraph 5.2.1.

With the exception of KMTR2, Lexatumumab, and Zaptuzumab [123,124,143,144], most DR5 agonist antibodies are unable to trigger apoptosis in the absence of crosslinking. However, in vivo, they display strong antitumor activity [110], due to Fc γ R expressing cells that are thought to induce their crosslinking [157]. Indeed, the in vivo antitumor potential of Conatumumab, a fully human agonistic targeting DR5, was demonstrated to require FcR-mediated crosslinking to inhibit tumor growth [158,159]. FcR oligomerize antibodies that are now able to trimerize receptors, providing increasing antitumor activity. Consequently, it was thought that Fc γ R binding was mandatory to induce effective apoptosis. Nonetheless, additional studies shed light on the fact that apoptosis can be performed without this FcR binding. For example, scFv in the format of antibody constructs without the Fc part, thus, without the capacity to bind to FcR, showed promising results [40]. Likewise, the chimeric Fc-TRAIL-single chain hexameric variant APG 350 (Figure 4), displays potent apoptosis capabilities without interactions with Fc γ R-bearing myeloid cells [62,160]. Finally, the development of a new anti-DR5, Zaptuzumab, a chimeric monoclonal antibody obtained after humanization, showed promising anticancer actions without the need of crosslinking [124].

Irrespective whether co-engagement of FcR is required or not to induce suitable programmed cell death, one should probably keep in mind that only co-engagement with Fc γ RIIB confers anti-TNFR agonistic antibodies the potential to trigger apoptosis in vivo [158].

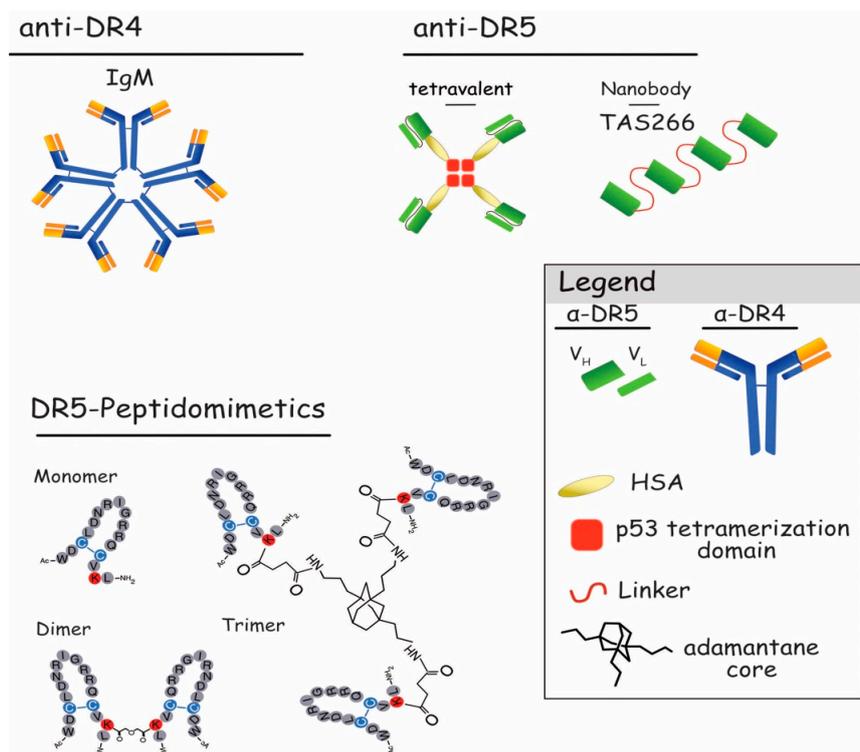


Figure 6. Schematic representation of DR4 or DR5 multivalent agonists. Represented on the upper left is the pentavalent IgM form of the newly described anti-DR4 antibodies [161]. The upper right shows tetraivalent scFvs targeting DR5 [153] and TAS266 nanobody [154]. In the lower part, primary structures of DR5-peptidomimetics as monomer, dimer, and trimer are represented [152].

5.2. Bi- and Tri-Specific Derivatives

Based on their capacity to recognize specific targets with high sensitivity, single-chain variable fragment (scFv) were developed and combined to a variety of TRAIL derivatives to induce specific killing of cancer cells. Produced with phage, yeast, and ribosome display, scFvs contain only the variable regions of the antibodies that recognize the target, without the Fc part. While maintaining specific recognition of the target, their smaller size (around 25 kDa) let them reach deeper tumor compartments, resulting in a better tumor penetration [162]. They offer the possibility to produce bispecific antibodies or chimeric proteins with the capacity to link specifically to two different targets, each of their Fab recognizing different epitopes, enabling selective antitumor therapeutic intervention [163]. These strategies allow better target specificity, as well as reduction of off-target toxicity.

5.2.1. scFv-TRAIL

Various scFv-TRAIL formulations have been developed, each of which has its own advantages [88,164]. Most of the time, TRAIL-induced apoptosis is possible only in cells bearing antigens targeted by the scFv. But non-tumor cells can also be targeted to present TRAIL like a membrane-bound protein, to increase its killing efficacy. Two kinds of scFv-TRAIL were designed. The first class includes scFv-targeting antigens expressed specifically or overexpressed by cancer cells. These include scFv-TRAIL selective for epidermal growth factor (EGFR) [165,166], Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2 (ErbB2) [59], epithelial glycoprotein-2 (EGP2) [167], Potassium channel voltage gated, subfamily H, member 1 (Kv10.1) [168], mesothelin [169], melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan (MCSP) [170], or multidrug resistance protein 3 (MRP3) [171] (Figure 7). Dual targeting not only increases selectivity towards a wide range of tumors, but also affords bystander killing effects via TRAIL activity [172]. The scFv:EGFR-TRAIL is an example of such construct. EGFR is a tyrosine kinase receptor (TKR) whose expression in solid tumors is often associated with tumor

development and progression [173]. scFv:EGFR-TRAIL converted soluble TRAIL into a membrane-bound form, allowing efficient apoptosis in a series of EGFR-positive tumor cell lines [166]. Based on the same principle, constructs such as ENb:TRAIL, another EGFR-targeting nanobody fused to TRAIL molecule, displayed potent antitumor activity towards cells normally resistant to EGFR inhibitors alone, or to TRAIL. In vitro and in vivo, ENb:TRAIL was able to block EGFR signaling while inducing TRAIL-mediated apoptosis of targeted cancer cells [174]. Interestingly, fusing the scFv anti-EGFR to single-chain TRAIL (scTRAIL, see Figure 7), instead of a single monomer of TRAIL, further increased the tumor killing efficiency of the scFv-TRAIL variant by 10-fold [175], highlighting the importance of TRAIL valency for its efficacy. In the same vein, an anti-EGFR diabody linked to the scTRAIL was found to exhibit strong antitumor potential both in vitro and in vivo [71,176].

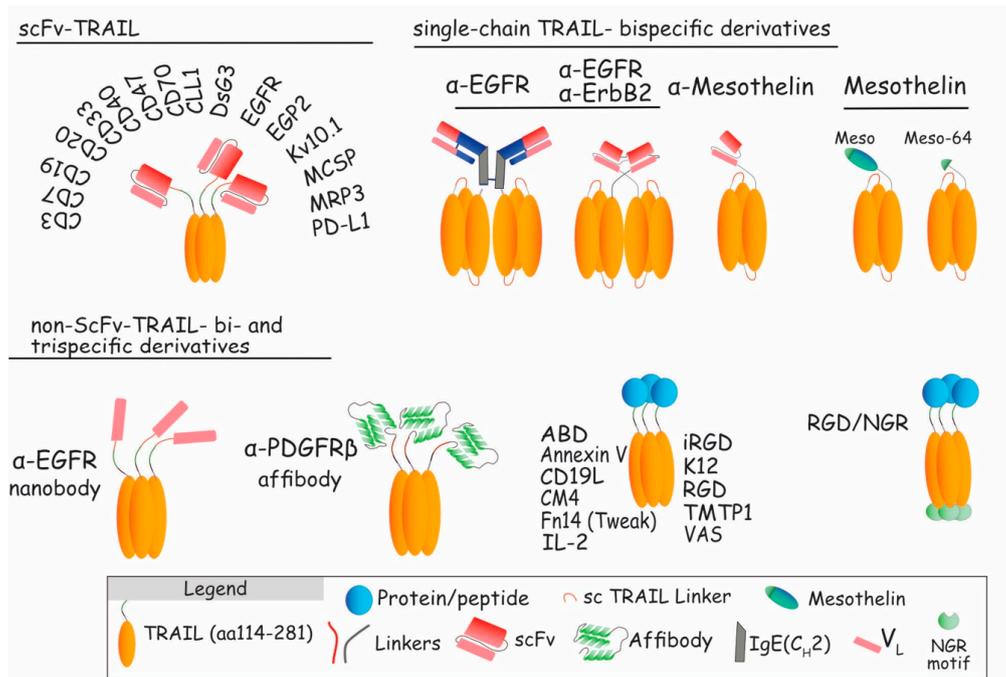


Figure 7. Schematic representation of scFv-TRAIL and non-scFv-TRAIL constructs. Upper left: presentation of different cancer (DsG3 [162], EGFR [149,150], EGP2[152], Kv10.1 [153], MCSP [155], or MRP3 [156]) and immune (CD3 [163], CD7 [164], CD19 [165,166], CD20 [167], CD33 [168], CD40 [169], CD47 [170], CD70 [171], CLL1 [172], or PD-L1 [173]) antigens targeted by scFv-TRAIL constructs. Upper right: single-chain TRAIL-bispecific derivatives targeting EGFR [40,71], ErbB2 [151], and mesothelin [154]. Lower part: non-scFv-TRAIL bi- and trispecific derivatives using nanobody (ENb:TRAIL), affibody, or fusion proteins, to target cancer and immune antigens.

ErbB2, another TKR of the same family, is also widely expressed on human tumor cells [177]. An anti-ErbB2 scFv fused to scTRAIL was found, in vitro and in vivo, to exhibit enhanced therapeutic activity as compared to scTRAIL, alone [59]. Moreover, this single chain-TRAIL variant displayed better pharmacokinetics properties compared to TRAIL, with a half-life increased by 2 to 4-fold. Other scFv-TRAILs were assessed, showing increased antitumor potential, such as EGP2, also known as epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) overexpressed in carcinomas [167], the voltage-gated potassium channel Kv10.1 expressed in 70% of tumors of different origin, but not in normal cells [168], the melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan (MCSP), expressed in melanoma [170], the multidrug resistance protein 3 (MRP3), expressed in glioblastoma [171], or DsG3, one of seven desmosomal cadherins that mediate cell–cell adhesion in desmosomes, whose expression has been found to be increased in primary cancer cells and associated clinical stage [178].

A number of other TRAIL bispecific constructs selective for the albumin binding domain ABD [179], annexin V [180], CM4, a small cationic linear α -helical peptide selective for tumor cells [181],

Fn14 [182], integrins RGD [183–185] and iRGD [186], tumor molecular targeted peptide 1 (TMTP1) [187], or vasostatin (VAS) [188], have also been described, including a trispecific recombinant TRAIL protein harboring both an RGD- and an NGR-binding motif [189], all of which bind more or less specifically to tumor cells, and displaying increased TRAIL-mediated apoptosis rates. Last, further pinpointing to the growing interest for TRAIL-based therapies, an affibody targeting PDGFR β [190], as well as scFV targeting mesothelin [169], a glycosylphosphatidylinositol anchored glycoprotein known to bind to the mucin MUC16, mesothelin itself or its MUC16-minimal-binding domain [191] fused to scTRAIL, were also described to display potent antitumor potential.

The second kind of scFvs or TRAIL-recombinant proteins target immune cell antigens, such as CD3 [192], CD7 [192,193], CD19 [194,195], CD20 [196], CD25 [197], CD33 [198], CD40 [199], CD47 [200], CD70 [201], CLL1 [202], or PD-L1 [203]. Those constructs have been generated with the aim of hastening and reinforcing immune responses by four different ways. As mentioned above for solid tumors, the first objective was to target hematological malignancies. For this, CD7, CD19, and CD33 scFv fused to TRAIL, or CD19L fused to TRAIL constructs, were produced to target and kill selectively immune cancer cells [193–195,198]. The second and third approaches, respectively, activate immune cells or block inhibitory signals. Those bifunctional fusion proteins confer dual pro-apoptotic signaling capacity by bringing immune cells in close proximity with tumor cells. As an example, scFv-CD40-TRAIL has the capacity to stimulate both dendritic cells (DCs) and to trigger apoptosis of DC-targeted cells [199]. Likewise, the recombinant IL2 protein fused to TRAIL targets and activated IL2 receptors overexpressed in most hematological cancers, inducing higher expression of CD25, and leading to activation of natural killer (NK) and T effector cells [197]. A particularly interesting key example of advanced TRAIL derivative is scFv-PD-L1:TRAIL [203]. This bispecific scFv arms or loads immunosuppressive PD-L1 expressing myeloid cells (as Dcs and macropages) with TRAIL molecule. Through the competitive binding to PD-L1, it inhibits, on the one hand, PD-1/PD-L1 interaction, restoring thus antitumoral immunity, and since it loads the immune cells with recombinant TRAIL, it also affords, on the other hand, TRAIL-mediated apoptosis of the targeted tumor cells. Similar to scFv-PD-L1:TRAIL, targeting CD47 or CD70 block the “don’t eat me” inhibitory signals, restoring tumoricidal activity of immune cells and inducing TRAIL-dependent pro-apoptotic signal [200,201]. Lastly, cell-based therapies targeting CD3, CCL1, or CD20 arm T-cells [192], granulocytes [202] immune cells or mesenchymal stem cells [196], respectively, with high levels of cell surface TRAIL, have also been found to efficiently induce apoptosis of immune-resistant cancer cells.

5.2.2. Unconventional and Bispecific Antibodies

Unconventional antibody-like and bi-specific derivatives targeting both DR4 and DR5, or DR5 and an antigen specifically expressed by a given tumor cell or tumor microenvironment, have been generated and assessed for their ability to trigger tumor-selective killing. They have mostly been produced based on phage display technology [204,205] or from a protein scaffold library based on the Kringle domain structure [206] (Figure 8).

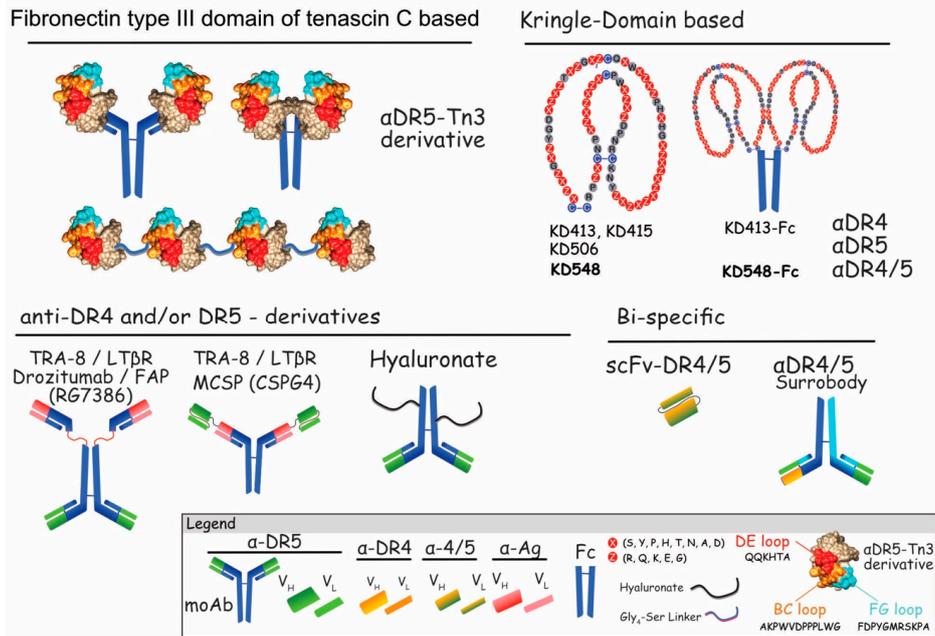


Figure 8. Schematic representation of unconventional and BsAbs harboring selectivity for DR4 and/or DR5. Fibronectin type III domain of tenascin C-based formats recognizing DR5, are presented in the upper left, covalently linked to Igs, Fc or as single-chains. Amino acids highlighted in red/orange and pale blue correspond to TN3 variable loops (DE, FG and BC) which can be mutated without changing its globular structure. These correspond to aa that allow binding to DR5. Amino acids shown in beige, depict TN3 amino acids that need to be preserved to maintain the globular structure of the recombinant protein. Upper right panel illustrates Kringle domain (KD)-based formats fused to the Fc. Specific KDs are numbered 413 to 548. Affinity binding for DR4 and/or DR5 is indicated. Lower left panel depicts anti-DR4 and/or DR5-derivatives targeting TRA-8, LT β R, FAP, MCSP, or hyaluronate. BsAbs targeting both DR4 and DR5 are represented in the lower right.

The first category includes unconventional multivalent anti-DR4 and anti-DR5 antibodies, that were generated either from the fibronectin type III tenascin C domain (Tn3) or the Kringle domain (KD) protein scaffold libraries (Figure 8). Interestingly, while anti-DR5-Tn3 covalently linked to Igs displayed pro-apoptotic activity, these unconventional divalent antibodies were far less efficient than TRAIL. However, in line with previous studies demonstrating superior activity of TRAIL functionalized to nanoparticles [64], multivalent DR5-Tn3 linear chains were found to be 10 to 100-fold more potent than TRAIL *in vitro* and *in vivo* [205]. Earlier on, another group has developed DR4–DR5 bispecific antibodies (BsAbs) using yeast surface display, based on the Kringle domain (KD). Fused to dual affinity Ig-Fc Kringle, domain-based moAbs showed high-affinity target binding, and enhanced capacity to induce apoptosis and inhibit tumor growth, *in vivo*, as compared with the standard monomer counter parts [206,207]. Interestingly enough, receptor complex formation analysis comparison after TRAIL or KD548-Fc stimulation revealed that this DR4/5 dual-specific Kringle domain agonist variant induces the recruitment proteins of additional proteins to the TRAIL DISC complex, including riboflavin kinase, nox1, and Rac1, whose activation induces reactive oxygen species (ROS)-mediated cell death [208]. This DR4/5 dual-specific Kringle domain agonist is likely to enter clinical trials soon, as efforts are being made to produce it at high levels [209]. Although, preliminary, these results highlight the potential therapeutic benefits that can be achieved by targeting both receptors, rather than targeting specifically one of the two death receptors. Several other bi-DR4/5-specific antibody derivatives have been described. Using the phage display technology, MedImmune developed numerous scFv constructs selective for DR4 and/or DR5 [204]. Out of the published screen, 10 anti-DR4 scFv and 6 anti-DR5 scFv were selected. Each of them exhibited specificity towards their own target, but these scFvs displayed only mild anticancer properties *in vitro*, in the presence of cycloheximide. Strikingly, albeit DR4 and DR5 show high

sequence homology, and despite the fact that the main homologous amino acids are accessible as immunogen, as inferred from the crystallographic structure of DR4 and DR5 (Figure 2), very few scFvs—less than 2%—displayed crossreactivity for both receptors. A second screen, alternating rounds of selection on either DR4 or DR5, enabled the identification of 134 distinct dual-DR4/5-scFvs. However, none of these scFvs were able to induce cell death in the two cell lines tested, HT1080 and ST486, a fibrosarcoma and a Burkitt's lymphoma, respectively [204]. This library, nonetheless, probably represents an interesting source of scFvs for the engineering of diabodies or whole antibodies targeting solely DR4, DR5, or both (Figure 8). Using a similar approach, namely a human phage display surrobody library, an antibody crossreactive to both DR4 and DR5 was found [210]. However, this antibody displayed moderate antitumor potential *in vitro*, since protein-G beads had to be used prior incubation with the target cells to detect its antitumoral activity. Yet, this surrobody exhibited potent activity *in vivo* [210], most likely due to ADCC.

Other bispecific derivatives described, so far, are based on tetravalent antibodies (Figure 8). These harbor TRA-8 or Drozitumab variable chains and scFv fragments targeting either LT β R or MCSP, also known as lymphotoxin β receptor and melanoma associated chondroitin sulfate proteoglycan, respectively. BsAb TRA-8xLT β R antibodies are aimed at targeting epithelial cancer cell lines [211]. Constructed with a scFv:LT β R fused to the N- or the C-terminus of the heavy chain of TRA-8 antibody (Figure 8), both BsAbs inhibited tumor growth of LT β R-expressing cells *in vivo*. More recently, a MCSPxDR5 bispecific antibody, engineered from a high affinity MCSP moAb to which the variable binding domains of tigatuzumab were covalently linked, was assessed for antitumor selectivity towards melanomas [212]. MCSP is a well-established target for melanoma immunotherapy, since it is overexpressed in more than 90% of melanomas, but its expression is restricted in normal melanocytes. By targeting this membrane-bound protein with the BsAb MCSP \times DR5, the authors of this study have been able to demonstrate first that binding of MCSP \times DR5 mainly occurs on MCSP + DR5 + cells, compared to MCSP – DR5 + cells, indicating that binding mainly occurs through MCSP, and second, that BsAb MCSP \times DR5 is able to induce tumor cell death both in an ADCC-dependent and -independent manner, *in vitro* [212]. Consequently, MCSP \times DR5 represents an interesting compound for melanomas.

The last category of BsAbs has been engineered with scFvs or ligands selective for a given antigen present in the tumor microenvironment and scFv:DR5. It includes RG7368, a fibroblast-activation protein (FAP)-targeted DR5 bispecific antibody derived from Drozitumab [213]. RG7368 was found to target both tumor associated fibroblasts from the stroma, and DR5 present on tumor cells. This strategy permits to put in contact anti-DR5 agents in FAP-positive tumoral microenvironment. RG7368 was found to induce potent tumor killing in a FAP-dependent manner, and to inhibit tumor growth *in vivo* [213]. Combining RG7368 with irinotecan or doxorubicin also demonstrated a substantial increase in tumor growth regression in colorectal patient-derived xenografts. Another tetravalent scFv:DR5-based hybrid antibody has recently been evaluated, with success, for its ability to treat liver metastasis in preclinical animal xenograft models [214]. Multivalency was afforded in this study by the covalent functionalization of hyaluronate (HA) to scFv:DR5, enabling binding to receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) and CD44, two receptors significantly overexpressed in a variety of tumors.

5.3. Chimeric Antigen Receptors (CARs)

Chimeric antigen receptors are promising tumoricidal formats. They are designed by a scFv recognizing specific tumor antigen fused to an intracellular T-cell activation system [215,216]. Upon contact with target antigen, CARs induce T-cell signaling functions, such as cytokine secretion, enhanced cell proliferation and survival, and improves effector cell functions [217]. To date, only one CAR targeting TRAIL death receptors has been described (Figure 9). This TR1-scFv-CAR was developed using scFv recognizing DR4 [218]. Expressed on the cell surface of DR4-deficient Jurkat cells, as well as a NK cell line or human peripheral blood cells (PBLs), it induced DR4-mediated apoptosis of target cells expressing DR4 endogenously. In addition, when expressed in immune cells, NK, and PBLs, respectively, TR1-scFv-CAR induced CAR-mediated cytolytic activity, demonstrating

that CARs targeting DRs could be used as anticancer therapeutic tools to induce tumor regression [218]. Along the line, smart CAR systems based on combinatorial antigen recognition [219] are likely to offer ideal tools to deliver, specifically, TRAIL or TRAIL derivatives to the tumor.

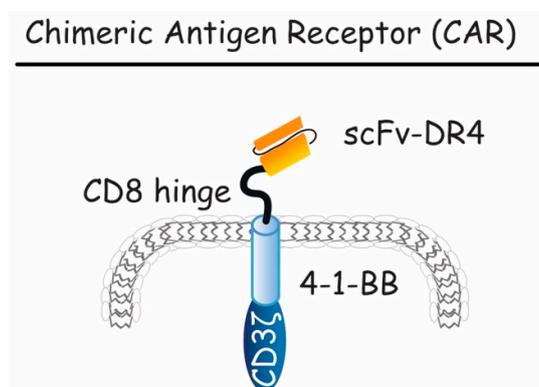


Figure 9. Schematic representation of chimeric antigen receptor (CAR). Here, the CAR construct is presented, containing a scFv extracellular domain targeting DR4, a CD8 hinge and a CD3 intracellular domain mediating T-cell activation. This compound is capable of activating both DR4-mediated apoptosis and tumor specific T-cell cytotoxicity.

5.4. Antibody Drug Conjugate-Like TRAIL Derivatives (ADC-Like)

The ADC technology takes advantage of innovative chemistry or biochemistry, and of high specificity of antibodies for their target antigens, to deliver a more powerful cytotoxic agent to specific tumor cells [220,221]. Although this method has, so far, never been tested with moAb or derivatives targeting DR4 or DR5, it has been assessed with recombinant TRAIL variants to overcome chemotherapy related toxicity, as well as TRAIL resistance. It has been used for example to conjugate TRAIL with monomethyl auristatin E (TRAIL–MMAE) via valine and citrulline linkage [222,223] (Figure 10) or PEG [224]. Selective targeting of the tumor with TRAIL allowed selective delivery of the cytotoxic drug MMAE to the cancer site. After binding, TRAIL–MMAE is rapidly internalized into the cytoplasm of targeted cancer cells, and released in lysosome via lysosomal-specific cleavage of the linker, placed between TRAIL itself and MMAE. Once released into the cytoplasm, the cytotoxic drug exerts its antimetabolic action, leading to cancer cell death. The study of proof-of-concept, demonstrated, *in vitro*, that the human TRAIL-resistant breast carcinoma cell line MCF-7, efficiently internalized MMAE into its cytoplasm, and died by apoptosis. Interestingly, *in vivo*, TRAIL–MMAE exhibited a long half-life (>11 h) and displayed potent antitumor activities in xenograft models, while remaining safe for the animal, since no sign of toxicity could be detected [223]. The PEGylated TRAIL–MMAE conjugate was also found to display good pharmacodynamics, with a half-life reaching 7 h. Interestingly, it exhibited selective antitumoral potential, but no signs of hepatotoxicity [224]. AD-O53.2 is another ADC-like TRAIL derivative (Figure 10). It has been engineered by fusing TRAIL and Smac/Diablo with a linker containing a metalloprotease cleavage site and a membrane penetrating peptide, with the aim to overcome cancer cell resistance to TRAIL-induced cell death [225]. AD-O53.2 increased, *in vitro*, tumor cell sensitivity to apoptosis by 3 to 6 orders of magnitude, and was very potent in inducing tumor regression in xenograft animal models [225]. Last, an ADC-like TRAIL derivative based on Melittin, a water-soluble 26-amino acid peptide derived from bee venom of *Apis mellifera*, has been tested for its capacity to induce tumor cell killing. Melittin, for unknown reasons, exerts selective cytotoxicity on a large variety of tumor cells, but is not toxic for normal cells. It had previously been found to sensitize apoptosis induced by TRAIL in hepatocellular carcinomas [226]. Fused to TRAIL in an ADC-like fashion, TRAIL–Melittin conjugate was found, *in vitro*, to display a moderate increase in antitumor properties, as compared to TRAIL alone [227]. With the exception of the TRAIL–Melittin conjugate, whose gain of function was rather limited, these findings suggest that conjugation of DR4 or DR5 derivatives in an ADC-like antitumoral drug could

also lead in the future to efficient TRAIL therapies, provided that such a compound remains safe in vivo, but efficient in inhibiting tumor growth.

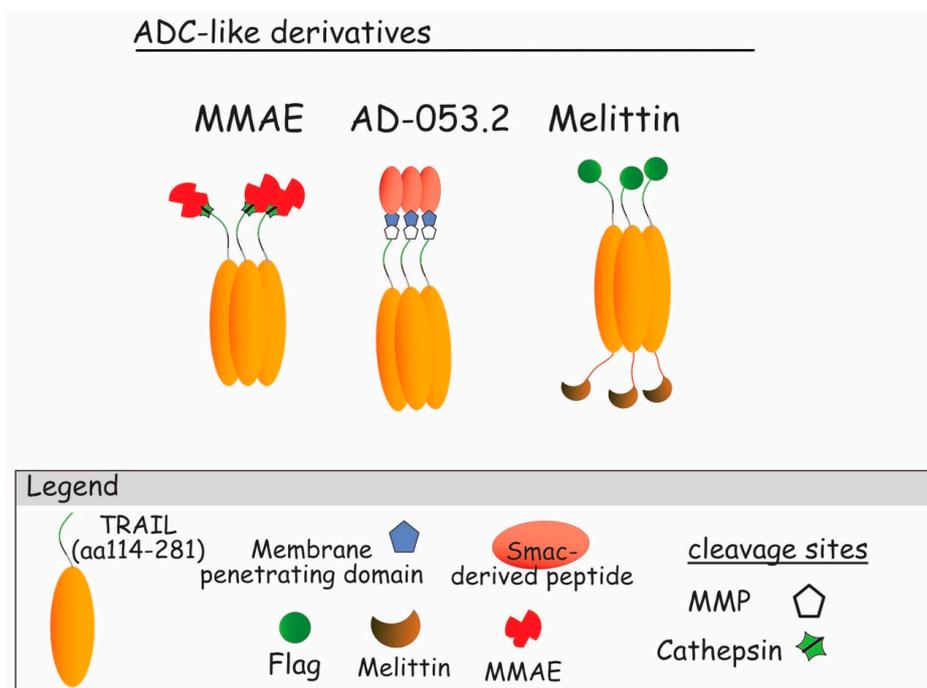


Figure 10. TRAIL ADC-like derivatives. From the left to the right : ADC-like TRAIL build up with Smac-derived peptide (AD-053.2) an intracellular pro-apoptotic agent [225]; Melittin ADC-like, an antibacterial highly cytotoxic harbored on trimeric TRAIL and linked with FLAG [226,227]; MMAE-TRAIL, TRAIL trimeric molecule linked to the monomethyl auristatin E, an antimetabolic agent [222–224].

6. Conclusions

The discovery of TRAIL and its receptors in the mid-’90s raised much interest for antitumor therapies, prompting preclinical and clinical evaluation of TRAIL or TRAIL receptor agonist antibodies. While early clinical evaluation of these first generation of compounds failed to demonstrate enough efficacy to warrant further development, the increase in understanding of the molecular events governing TRAIL-mediated apoptosis signal transduction, together with the advent of innovative biomolecular engineering, suggest that targeting TRAIL receptors is still likely to hold promise for cancer therapy.

Likewise, second generation of TRAIL recombinant proteins fused to Fc, scFv, single chains or monoclonal antibodies targeting TRAIL receptors functionalized to nanoparticles or linkers, in order to increase their valency, are being developed with the aim to increase both bioavailability and efficacy. Whereas, it still remains unknown whether DR4 and DR5 targeting therapeutics will meet the requirements to get approval for cancer therapy, a number of these novel formulations raise hope, due to the excellent results obtained from preclinical or early clinical studies.

The next generation of DR4 and DR5 targeting agents are, thus, likely to put hope back on the trail of antitumoral therapeutics.

Acknowledgments: O.M. is supported by grants from the ANR (Agence Nationale de la Recherche) program “Investissements d’Avenir” Labex LipSTIC (ANR-11-LABX-0021-01) ANR grants (07-PCV-0031 and SphingoDR), the Conseil Régional de Bourgogne, the FEDER (Fonds Européen de Développement Régional; BG0003196), the INCa (Institut National du Cancer, POLYNOM-174), the Cancéropôle Grand-Est, la Ligue Nationale Contre le Cancer and the fondation ARC (Association pour la Recherche sur le cancer). The authors are grateful to Bruno Robert and Said El Alaoui for constructive discussions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

Aa	amino acids
ADC	antibody-drug conjugate
ADCC	antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity
APO	apoptosis antigen
Bcl-2	B-cell lymphoma 2, apoptosis inhibitor
BsAbs	bispecific antibodies
CARs	chimeric antibody receptors
CD	cluster of differentiation
CDC	complement-dependent cellular cytotoxicity
c-FLIP	cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein
CPT-TRAIL	circularly permuted TRAIL
DC	dendritic cell
DcR	decoy receptor
DcR1	decoy receptor 1, TRAIL-R3
DcR2	decoy receptor 2, TRAIL-R4
DD	death domain
DISC	death-inducing signaling complex
DR	death receptor
DR4	death receptor 4, TRAIL-R1
DR5	death receptor 5, TRAIL-R2
Fab	fragment antigen-binding
Fas	fibroblast associated surface antigen
Fas-L	as ligand
Fc	crystalized fragment
FcR	crystalized fragment receptor
GPI	glycosylphosphatidylinisitol
KD	Kringle domain
Mcl-1	myeloid cell leukemia-1
moAbs	monoclonal antibodies
NK cell	natural killer cell
OPG	osteoprotegerin, TRAIL-R5
PBLs	eripheral blood cells
ROS	reactive oxygen species
rhTRAIL	human recombinant TRAIL
scFv	single chain fragment variable
sc-TRAIL	single chain TRAIL
sTRAIL	soluble TRAIL
TNC-TRAIL	tenascin-C-TRAIL
TNF	tumor necrosis factor
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand

References

1. Kerr, J.F.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R., Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **1972**, *26*, 239–257.
2. DeVita, V.T., Jr., Chu, E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 8643–8653.
3. Carswell, E.A.; Old, L.J.; Kassel, R.L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 3666–3670.
4. Lejeune, F.J.; Ruegg, C.; Lienard, D. Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Curr. Opin. Immunol.* **1998**, *10*, 573–580.
5. Trauth, B.C.; Klas, C.; Peters, A.M.; Matzku, S.; Möller, P.; Falk, W.; Debatin, K.M.; Krammer, P.H. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* **1989**, *245*, 301–305.
6. Yonehara, S.; Ishii, A.; Yonehara, M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **1989**, *169*, 1747–1756.

7. Wiley, S.R.; Schooley, K.; Smolak, P.J.; Din, W.S.; Huang, C.; Nicholl, J.K.; Sutherland, G.R.; Smith, T.D.; Rauch, C.; Smith, C.A.; et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **1995**, *3*, 673–682.
8. Smith, C.A.; Farrah, T.; Goodwin, R.G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death. *Cell* **1994**, *76*, 959–962.
9. Pitti, R.M.; Marsters, S.A.; Ruppert, S.; Donahue, C.J.; Moore, A.; Ashkenazi, A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the TNF cytokine family. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12687–12690.
10. Schneider, P.; Bodmer, J.-L.; Thome, M.; Hofmann, K.; Holler, N.; Tschopp, J. Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Lett.* **1997**, *416*, 329–334.
11. MacFarlane, M.; Ahmad, M.; Srinivasula, S.M.; Fernandes-Alnemri, T.; Cohen, G.M.; Alnemri, E.S. Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 25417–25420.
12. Marsters, S.A.; Sheridan, J.P.; Pitti, R.M.; Huang, A.; Skubatch, M.; Baldwin, D.; Yuan, J.; Goddard, A.D.; Godowski, P.; et al. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr. Biol.* **1997**, *7*, 1003–1006.
13. Walczak, H.; Degli-Esposti, M.A.; Johnson, R.S.; Smolak, P.J.; Waugh, J.Y.; Boiani, N.; Timour, M.S.; Gerhart, M.J.; Schooley, K.A.; Smith, C.A.; et al. TRAIL-R2: A novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* **1997**, *16*, 5386–5397.
14. Ogasawara, J.; Watanabe-Fukunaga, R.; Adachi, M.; Matsuzawa, A.; Kasugai, T.; Kitamura, Y.; Itoh, N.; Suda, T.; Nagata, S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* **1993**, *364*, 806–809.
15. Walczak, H.; Miller, R.E.; Ariail, K.; Gliniak, B.; Griffith, T.S.; Kubin, M.; Chin, W.; Jones, J.; Woodward, A.; Le, T.; et al. Tumorcidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 157–163.
16. Micheau, O.; Shirley, S.; Dufour, F. Death receptors as targets in cancer. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *169*, 1723–1744.
17. Ashkenazi, A.; Pai, R.C.; Fong, S.; Leung, S.; Lawrence, D.A.; Marsters, S.A.; Blackie, C.; Chang, L.; McMurtrey, A.E.; Hebert, A.; et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Investig.* **1999**, *104*, 155–162.
18. Wang, S.L.; El-Deiry, W.S. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* **2003**, *22*, 8628–8633.
19. Lee, H.O.; Herndon, J.M.; Barreiro, R.; Griffith, T.S.; Ferguson, T.A. TRAIL: A mechanism of tumor surveillance in an immune privileged site. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 4739–4744.
20. Smyth, M.J.; Takeda, K.; Hayakawa, Y.; Peschon, J.J.; van den Brink, M.R.M.; Yagita, H. Nature's TRAIL—On a path to cancer immunotherapy. *Immunity* **2003**, *18*, 1–6.
21. Bodmer, J.L.; Schneider, P.; Tschopp, J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 19–26.
22. Dufour, F.; Rattier, T.; Shirley, S.; Picarda, G.; Constantinescu, A.A.; Morlé, A.; Zakaria, A.B.; Marcion, G.; Causse, S.; Szegezdi, E.; et al. N-glycosylation of mouse TRAIL-R and human TRAIL-R1 enhances TRAIL-induced death. *Cell Death Differ.* **2017**, *24*, 500–510.
23. Yoshida, T.; Shiraishi, T.; Horinaka, M.; Wakada, M.; Sakai, T. Glycosylation modulates TRAIL-R1/death receptor 4 protein: Different regulations of two pro-apoptotic receptors for TRAIL by tunicamycin. *Oncol. Rep.* **2007**, *18*, 1239–1242.
24. Wagner, K.W.; Punnoose, E.A.; Januario, T.; Lawrence, D.A.; Pitti, R.M.; Lancaster, K.; Lee, D.; von Goetz, M.; Yee, S.F.; Totpa, K.; et al. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 1070–1077.
25. Mirandola, P.; Ponti, C.; Gobbi, G.; Sponzilli, L.; Vaccarezza, M.; Cocco, L.; Zauli, G.; Secchiero, P.; Manzoli, F.M.; Vitale, M. Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. *Blood* **2004**, *104*, 2418–2424.
26. Emery, J.G.; McDonnell, P.; Burke, M.B.; Deen, K.C.; Lyn, S.; Silverman, C.; Dul, E.; Appelbaum, E.R.; Eichman, C.; DiPrinzio, R.; et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14363–14367.

27. Truneh, A.; Sharma, S.; Silverman, C.; Khandekar, S.; Reddy, M.P.; Deen, K.C.; Mclaughlin, M.M.; Srinivasula, S.M.; Livi, G.P.; Marshall, L.A.; et al. Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 23319–23325.
28. LeBlanc, H.N.; Ashkenazi, A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ.* **2003**, *10*, 66–75.
29. Kobayashi, Y.; Udagawa, N.; Takahashi, N. Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **2009**, *19*, 61–72.
30. Omran, O.M.; Ata, H.S. Expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand death receptors DR4 and DR5 in human nonmelanoma skin cancer. *Am. J. Dermatopathol.* **2014**, *36*, 710–717.
31. Sanlioglu, A.D.; Korcum, A.F.; Pestereli, E.; Erdogan, G.; Karaveli, S.; Savas, B.; Griffith, T.S.; Sanlioglu, S. TRAIL death receptor-4 expression positively correlates with the tumor grade in breast cancer patients with invasive ductal carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2007**, *69*, 716–723.
32. Macher-Goeppinger, S.; Aulmann, S.; Tagscherer, K.E.; Wagener, N.; Haferkamp, A.; Penzel, R.; Brauckhoff, A.; Hohenfellner, M.; Sykora, J.; Walczak, H.; et al. Prognostic value of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors in renal cell cancer. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 650–659.
33. Ganten, T.M.; Sykora, J.; Koschny, R.; Batke, E.; Aulmann, S.; Mansmann, U.; Stremmel, W.; Sinn, H.-P.; Walczak, H. Prognostic significance of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in patients with breast cancer. *J. Mol. Med.* **2009**, *87*, 995–1007.
34. Van Noesel, M.M.; van Bezouw, S.; Salomons, G.S.; Voûte, P.A.; Pieters, R.; Baylin, S.B.; Herman, J.G.; Versteeg, R. Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 2157–2161.
35. Gottwald, L.; et al. Membrane expression of TRAIL receptors DR4, DR5, DcR1 and DcR2 in the normal endometrium, atypical endometrial hyperplasia and endometrioid adenocarcinoma: A tissue microarray study. *Arch. Gynecol. Obstet.* **2013**, *288*, 889–899.
36. Anees, M.; Hoak, P.; Schiefer, A.-I.; Vanhara, P.; El-Gazzar, A.; Perco, P.; Kiesewette, B.; Mullauer, L.; Streubel, B.; Raderer, M.; et al. The potential evasion of immune surveillance in mucosa associated lymphoid tissue lymphoma by DcR2-mediated up-regulation of nuclear factor-kappaB. *Leuk. Lymphoma* **2015**, *56*, 1440–1449.
37. Micheau, O. Posttranslational modifications and death receptor Signalling. In *TRAIL, Fas Ligand, TNF and TLR3 in Cancer*; Micheau, O., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2017; pp. 247–290.
38. Bodmer, J.L.; Meier, P.; Tschopp, J.; Schneider, P. Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 20632–20637.
39. Belkahla, H.; Herlem, G.; Picaud, F.; Gharbi, T.; Hémadi, M.; Ammar, S.; Micheau, O. TRAIL-NP hybrids for cancer therapy: A review. *Nanoscale* **2017**, *9*, 5755–5768.
40. Gieffers, C.; Kluge, M.; Merz, C.; Sykora, J.; Thiemann, M.; Schaal, R.; Fischer, C.; Marcus, B.; Abhari, B.A.; Hohenberger, P.; Fulda, S.; et al. APG350 induces superior clustering of TRAIL receptors and shows therapeutic antitumor efficacy independent of cross-linking via Fcγ receptors. *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12*, 2735–2747.
41. Shirley, S.; Morizot, A.; Micheau, O. Regulating TRAIL Receptor-Induced Cell Death at the Membrane: A Deadly Discussion. *Recent Pat. Anti-Cancer Drug Discov.* **2011**, *6*, 311–323.
42. Mongkolsapaya, J.; Grimes, J.M.; Chen, N.; Xu, X.-N.; Stuart, D.I.; Jones, E.Y.; Sreaton, G.R. Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 1048–1053.
43. Ramamurthy, V.; Yamniuk, A.P.; Lawrence, E.J.; Yong, W.; Schneeweis, L.A.; Cheng, L.; Murdock, M.; Corbett, M.J.; Doyle, M.L.; Sheriff, S. The structure of the death receptor 4-TNF-related apoptosis-inducing ligand (DR4-TRAIL) complex. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **2015**, *71*, 1273–1281.
44. Scaffidi, C.; Schmitz, I.; Zha, J.; Korsmeyer, S.J.; Krammer, P.H.; Peter, M.E. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 22532–22538.
45. Chinnaiyan, A.M. The apoptosome: Heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* **1999**, *1*, 5–15.
46. Jacquemin, G.; Shirley, S.; Micheau, O. Combining naturally occurring polyphenols with TNF-related apoptosis-inducing ligand: A promising approach to kill resistant cancer cells? *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 3115–3130.

47. Merino, D.; Lalaoui, N.; Morizot, A.; Schneider, P.; Solary, E.; Micheau, O. Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 7046–7055.
48. Shirley, S.; Micheau, O. Targeting c-FLIP in cancer. *Cancer Lett.* **2013**, *332*, 141–150.
49. Zamai, L.; Ahmad, M.; Bennett, I.M.; Azzoni, L.; Alnemri, E.S.; Perussia, B. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: Differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J. Exp. Med.* **1998**, *188*, 2375–2380.
50. Brincks, E.L.; Katewa, A.; Kucaba, T.A.; Griffith, S.T.; Legge, K.L. CD8 T cells utilize TRAIL to control influenza virus infection. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 4918–4925.
51. Griffith, T.S.; Wiley, S.R.; Kubin, M.Z.; Sedger, L.M.; Maliszewski, C.R.; Fanger, N.A. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J. Exp. Med.* **1999**, *189*, 1343–1354.
52. Halaas, O.; Vik, R.; Ashkenazi, A.; Espevik, T. Lipopolysaccharide induces expression of APO2 ligand/TRAIL in human monocytes and macrophages. *Scand. J. Immunol.* **2000**, *51*, 244–50.
53. Schneider, P.; Thome, M.; Burns, K.; Bodmer, J.-L.; Hofmann, K.; Kataoka, T.; Holler, N.; Tschopp, J. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity* **1997**, *7*, 831–836.
54. Holler, N.; Tardivel, A.; Kovacsovics-Bankowski, M.; Hertig, S.; Gaide, O.; Martinon, F.; Tinel, A.; Deperthes, D.; Calderara, S.; Schulthess, T.; et al. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 1428–1440.
55. Kim, S.H.; Kim, K.; Kwagh, J.G.; Dicker, D.T.; Herlyn, M.; Rustgi, A.K.; Chen, Y.; El-Deiry, W.S.; et al. Death induction by recombinant native TRAIL and its prevention by a caspase 9 inhibitor in primary human esophageal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 40044–40052.
56. Dufour, F.; Rattier, T.; Constantinescu, A.A.; Zischler, L.; Morlé, A.; Mabrouk, H.B.; Humblin, E.; Jacquemin, G.; Szegezdi, E.; Delacote, F.; et al. TRAIL receptor gene editing unveils TRAIL-R1 as a master player of apoptosis induced by TRAIL and ER stress. *Oncotarget* **2017**, *8*, 9974–9985.
57. Sun, A.Y.; Shen, Y.L.; Yin, J.C.; Zhang, H.; Tang, Y.N.; Wei, D.Z. Improvement of expression level and bioactivity of soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Apo2L/TRAIL) by a novel zinc ion feeding strategy. *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 1215–1219.
58. Krippner-Heidenreich, A.; Grunwald, I.; Zimmermann, G.; Kühnle, M.; Gerspach, J.; Sterns, T.; Shnyder, D.; Gill, J.H.; Männel, D.N.; Pfizenmaier, K.; et al. Single-chain TNF, a TNF derivative with enhanced stability and antitumoral activity. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 8176–8183.
59. Schneider, B.; Munkel, S.; Krippner-Heidenreich, A.; Grunwald, I.; Wels, W.S.; Wajant, H.; Pfizenmaier, K.; Gerspach, J. Potent antitumoral activity of TRAIL through generation of tumor-targeted single-chain fusion proteins. *Cell Death Dis.* **2010**, *1*, e68.
60. Chen, W.M.; Qiu, L.; Hou, J.; Zhao, Y.; Pan, L.; Yang, S.; Leng, Y.; Xi, H.; Zhang, X.; Cui, J.; Wei, N. Recombinant Circularly Permuted TRAIL (CPT) for the Treatment of Relapsed or Refractory Multiple Myeloma: An Open-Label, Multicenter Phase II Clinical Trial. *Blood* **2012**, *120*, 78.
61. Berg, D.; Lehne, M.; Muller, N.; Siegmund, D.; Munkel, S.; Sebald, W.; Pfizenmaier, K.; Wajant, H. Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 2021–2034.
62. Gieffers, C.; Kluge, M.; Hill, O.; Meinolf, T.; Merz, C.; Branschädel, M.; Harald, F. APG350, a dimerized single chain TRAIL receptor agonist with enhanced functional properties. *Cancer Res.* **2011**, *71*, doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0323.
63. Wang, H.Z.; Davis, J.S.; Wu, X.W. Immunoglobulin Fc Domain Fusion to TRAIL Significantly Prolongs Its Plasma Half-Life and Enhances Its Antitumor Activity. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13*, 643–650.
64. Zakaria, A.B.; Picaud, F.; Rattier, T.; Pudlo, M.; Saviot, L.; Chassagnon, R.; Lherminier, J.; Gharbi, T.; Micheau, O.; Herlem, G. Nanovectorization of TRAIL with Single Wall Carbon Nanotubes Enhances Tumor Cell Killing. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 891–895.
65. Holland, P.M.; Miller, R.; Jones, J.; Douangpanya, H.; Piasecki, J.; Roudier, M.; Dougall, W.C. Combined therapy with the RANKL inhibitor RANK-Fc and rhApo2L/TRAIL/dulanermin reduces bone lesions and skeletal tumor burden in a model of breast cancer skeletal metastasis. *Cancer Biol. Ther.* **2010**, *9*, 539–550.
66. Soria, J.C.; Smit, E.; Khayat, D.; Besse, B.; Yang, X.; Hsu, C.-P.; Reese, D.; Wizezorek, J.; Blackhall, F. Phase 1b study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin,

- and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 1527–1533.
67. Fang, F.; Wang, A.; Yang, S.F. Antitumor activity of a novel recombinant mutant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Acta Pharmacol. Sin.* **2005**, *26*, 1373–1381.
 68. Schneider, P. Production of recombinant TRAIL and TRAIL receptor: Fc chimeric proteins. *Methods Enzymol.* **2000**, *322*, 325–345.
 69. Muller, N.; Schneider, B.; Pfizenmaier, K.; Wajant, H. Superior serum half life of albumin tagged TNF ligands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *396*, 793–799.
 70. Liu, H.; Su, D.; Zhang, J.; Ge, S.; Li, Y.; Wang, F.; Gravel, M.; Roulston, A.; Song, Q.; Xu, W.; et al. Improvement of Pharmacokinetic Profile of TRAIL via Trimer-Tag Enhances its Antitumor Activity in vivo. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 8953.
 71. Hutt, M.; Marquardt, L.; Seifert, O.; Siegemund, M.; Müller, I.; Kulms, D.; Pfizenmaier, K.; Kontermann, R.E. Superior properties of Fc-comprising scTRAIL fusion proteins. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0551.
 72. Quintavalle, C.; Condorelli, G. Dulanermin in cancer therapy: Still much to do. *Transl. Lung Cancer Res.* **2012**, *1*, 158–159.
 73. Belada, D.; Mayer, J.; Czuczman, M.S.; Flinn, I.W.; Durbin-Johnson, B.; Bray, G.L. Phase II study of dulanermin plus rituximab in patients with relapsed follicular non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 8104.
 74. Blackhall, F.H.; Márk, Z.; Zatloukal, P.; Szima, B.; Albert, I.; Juhász, E.; Yang, X.; Smethurst, D.; Hei, Y.; Soria, J. A randomized phase II study of paclitaxel (P) and carboplatin (C) ± bevacizumab (B) ± dulanermin (D) in non-small cell lung cancer (NSCLC). *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 7534.
 75. Kasubhai, S.M.; Bendell, J.C.; Kozloff, M.; Kapp, A.V.; Ashkenazi, A.; Royer-Joo, S.; Portera, C.C. Phase Ib study of dulanermin combined with FOLFIRI (with or without bevacizumab [BV]) in previously treated patients (Pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 3543.
 76. Kozloff, M.; Messersmith, W.A.; Kapp, A.V.; Ashkenazi, A.; Royer-Joo, S.; Portera, C.C.; Wainberg, Z.A. Phase Ib study of dulanermin combined with first-line FOLFOX plus bevacizumab (BV) in patients (Pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 3552.
 77. Pan, Y.; Xu, R.; Peach, M.; Huang, C.-P.; Branstetter, D.; Novotny, W.; Herbst, R.S.; Eckhardt, S.G.; Holland, P.M. Evaluation of pharmacodynamic biomarkers in a Phase 1a trial of dulanermin (rhApo2L/TRAIL) in patients with advanced tumours. *Br. J. Cancer* **2011**, *105*, 1830–1838.
 78. Soria, J.C.; Márk, Z.; Zatloukal, P.; Szima, B.; Albert, I.; Juhász, E.; Pujol, J.L.; Kozielski, J.; Baker, N.; Smethurst, D.; et al. Randomized phase II study of dulanermin in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 4442–4451.
 79. Wang, F.; Lin, J.; Xu, R. The molecular mechanisms of TRAIL resistance in cancer cells: Help in designing new drugs. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 6714–6722.
 80. O'Leary, L.; van der Sloot, A.M.; Reis, C.R.; Deegan, S.; Ryan, A.E.; Dhami, S.P.S.; Murillo, L.S.; Cool, R.H.; de Sampaio, P.C.; Thompson, K.; et al. Decoy receptors block TRAIL sensitivity at a supracellular level: The role of stromal cells in controlling tumour TRAIL sensitivity. *Oncogene* **2015**, *35*, 1261–1270.
 81. Selvarajoo, K. A systems biology approach to overcome TRAIL resistance in cancer treatment. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2017**, *128*, 142–154.
 82. Kang, Y.C.; Kim, K.M.; Lee, K.S.; Namkoong, S.; Lee, S.J.; Han, J.A.; Jeoung, D.; Ha, K.S.; Kwon, Y.G.; Kim, Y.M. Serum bioactive lysophospholipids prevent TRAIL-induced apoptosis via PI3K/Akt-dependent cFLIP expression and Bad phosphorylation. *Cell Death Differ.* **2004**, *11*, 1287–1298.
 83. Rathore, R.; McCallum, J.E.; Varghese, E.; Florea, A.-M.; Büsselberg, D. Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). *Apoptosis* **2017**, *22*, 898–919.
 84. Wang, S.S.; Feng, L.; Hu, B.; Lu, Y.; Wang, W.; Guo, W.; Wang, S.; Jiao, B.; Pang, J.; Fu, W.; et al. miR-133a Promotes TRAIL Resistance in Glioblastoma via Suppressing Death Receptor 5 and Activating NF-kappaB Signaling. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2017**, *8*, 482–492.
 85. Breunig, C.; Pahl, J.; Küblbeck, M.; Miller, M.; Antonelli, D.; Erdem, N.; Wirth, C.; Will, R.; Bott, A.; Cerwenka, A.; et al. MicroRNA-519a-3p mediates apoptosis resistance in breast cancer cells and their escape from recognition by natural killer cells. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2973.

86. Morizot, A.; Mérino, D.; Lalaoui, N.; Jacquemin, G.; Granci, V.; Iessi, E.; Lanneau, D.; Bouyer, F.; Solary, E.; Chauffert, B.; et al. Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level. *Cell Death Differ.* **2011**, *18*, 700–711.
87. A database of privately and publicly funded clinical studies conducted around the world. Available online: <https://clinicaltrials.gov> (accessed on 16 October 2017).
88. De Miguel, D.; Lemke, J.; Anel, A.; Walczak, H.; Martinez-Lostao, L. Onto better TRAILs for cancer treatment. *Cell Death Differ.* **2016**, *23*, 733–747.
89. Lemke, J.; von Karstedt, S.; Zinngrebe, J.; Walczak, H. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 1350–1364.
90. Lim, B.; Allen, J.E.; Prabhu, V.V.; Talekar, M.K.; Finnberg, N.K.; El-Deiry, W.S. Targeting TRAIL in the treatment of cancer: New developments. *Expert Opin. Ther. Targets* **2015**, *19*, 1171–1185.
91. Natoni, A.; Farlane, M.M.; Lnoue, S.; Walewska, R.; Majid, A.; Knee, D.; Stover, D.R.; Dyer, M.J.S.; Cohen, G.M. TRAIL signals to apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells primarily through TRAIL-R1 whereas cross-linked agonistic TRAIL-R2 antibodies facilitate signalling via TRAIL-R2. *Br. J. Haematol.* **2007**, *139*, 568–577.
92. Wajant, H.; Moosmayer, D.; Wuest, T.; Bartke, T.; Gerlach, E.; Schonherr, U.; Peters, N.; Scheurich, P.; Pfizenmaier, K. Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene* **2001**, *20*, 4101–4106.
93. Leng, Y.; Hou, J.; Jin, J.; Zhang, M.; Ke, X.; Jiang, B.; Pan, L.; Yang, L.; Zhou, F.; Wang, J.; et al. Circularly permuted TRAIL plus thalidomide and dexamethasone versus thalidomide and dexamethasone for relapsed/refractory multiple myeloma: A phase 2 study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2017**, *79*, 1141–1149.
94. Geng, C.; Hou, J.; Zhao, Y.; Ke, X.; Wang, Z.; Qiu, L.; Xi, H.; Wang, F.; Wei, N.; Liu, Y.; et al. A multicenter, open-label phase II study of recombinant CPT (Circularly Permuted TRAIL) plus thalidomide in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Am. J. Hematol.* **2014**, *89*, 1037–1042.
95. Somasekharan, S.P.; Koc, M.; Morizot, A.; Mischeau, O.; Sorensen, P.H.B.; Gaide, O.; Andera, L.; Martinou, J.-C. TRAIL promotes membrane blebbing, detachment and migration of cells displaying a dysfunctional intrinsic pathway of apoptosis. *Apoptosis* **2013**, *18*, 324–336.
96. Secchiero, P.; Zerbinati, C.; Rimondi, E.; Corallini, F.; Milani, D.; Grill, V.; Forti, G.; Capitani, S.; Zauli, G. TRAIL promotes the survival, migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 1965–1974.
97. Ishimura, N.; Isomoto, H.; Bronk, S.F.; Gores, G.J. Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2006**, *290*, G129–G36.
98. Pukac, L.; Kanakaraj, P.; Humphreys, R.; Alderson, R.; Bloom, M.; Sung, C.; Riccobene, T.; Johnson, R.; Fiscella, M.; Mahoney, M. et al. HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer* **2005**, *92*, 1430–1441.
99. Tolcher, A.W.; Mita, M.; Meropol, N.J.; von Mehren, M.; Patnaik, A.; Padavic, K.; Hill, M.; Mays, T.; McCoy, T.; Fox, N.L. et al. Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 1390–1395.
100. Ciuleanu, T.; Bazin, I.; Lungulescu, D.; Miron, L.; Bondarenko, I.; Deptala, A.; Rodriguez-Torres, M. Giantonio, B. Fox, N.L.; Wissel, P. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase II study to assess the efficacy and safety of mapatumumab with sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Ann. Oncol.* **2016**, *27*, 680–687.
101. Greco, F.A.; Bonomi, P.; Crawford, J.; Kelly, K.; Oh, Y.; Halpern, W.; Lo, L.; Gallant, G. Klein, J. et al. Phase 2 study of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody which targets and activates the TRAIL receptor-1, in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **2008**, *61*, 82–90.
102. Hotte, S.J.; Hirte, H.W.; Chen E.X.; Siu, L.L.; Le, L.H.; Corey, A.; Iacobucci, A.; MacLean, M.; Lo, L.; Fox, N.L. et al. A phase 1 study of mapatumumab (fully human monoclonal antibody to TRAIL-R1) in patients with advanced solid malignancies. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 3450–3455.
103. Smith, M.A.; Morton, C.L.; Kolb, E.A.; Gorlick, R.; Keir, S.T.; Carol, H.; Lock, R.; Kang, M.H.; Reynolds, C.P.; Maris, J.M. et al. Initial testing (stage 1) of mapatumumab (HGS-ETR1) by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr. Blood Cancer* **2010**, *54*, 307–310.

104. Sun, W.; Nelson, D.; Alberts, S.R.; Poordad, F.; Leong, S.; Teitelbaum, U.R.; Woods, L.; Fox, N.; O'Neil, B.H. Phase Ib study of mapatumumab in combination with sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) and chronic viral hepatitis. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 261.
105. Trarbach, T.; Moehler, M.; Heinemann, V.; Köhne, C.-H.; Przyborek, M.; Schulz, C.; Sneller, V.; Gallant, G.; Kanzler, S. Phase II trial of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets and activates the tumour necrosis factor apoptosis-inducing ligand receptor-1 (TRAIL-R1), in patients with refractory colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **2010**, *102*, 506–512.
106. Von Pawel, J.; Harvey, J.H.; Spigel, D.R.; Dediu, M.; Reck, M.; Cebotaru, C.L.; Humphreys, R.C.; Gribbin, M.J.; Fox, N.L.; Camidge, D.R. Phase II trial of mapatumumab, a fully human agonist monoclonal antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1), in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Clin. Lung Cancer* **2014**, *15*, 188–196. e2.
107. Von Pawel, J.; et al. A randomized phase II trial of mapatumumab, a TRAIL-R1 agonist monoclonal antibody, in combination with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced NSCLC. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, doi:10.1200/jco.2010.28.18_suppl.lba7501.
108. Younes, A.; Harvey, J.H.; Spigel, D.R.; Dediu, M.; Reck, M.; Cebotaru, C.L.; Kumm, E.; Gallant, G.; Fox, N.; Camidge, D.R. A Phase 1b/2 trial of mapatumumab in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Br. J. Cancer* **2010**, *103*, 1783–1787.
109. Feng, Y.; Xiao, X.; Zhu, Z.; Dimitrov, D.S. Identification and characterization of a novel agonistic anti-DR4 human monoclonal antibody. *MAbs* **2010**, *2*, 565–570.
110. Chuntharapai, A.; Dodge, K.; Grimmer, K.; Schroeder, K.; Marsters, S.A.; Koeppen, H.; Ashkenazi, A.; Kim, K.J. Isotype-dependent inhibition of tumor growth in vivo by monoclonal antibodies to death receptor 4. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 4891–4898.
111. Sung, E.-S.; Park, K.-J.; Lee, S.-H.; Jang, Y.-S.; Park, S.-K.; Park, Y.-H.; Kwag, W.-J.; Kwon, M.-H.; Kim, Y.-S. A novel agonistic antibody to human death receptor 4 induces apoptotic cell death in various tumor cells without cytotoxicity in hepatocytes. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 2276–2285.
112. Lin, Z.; Jin, A.; Ozawa, T.; Tajiri, K.; Obata, T.; Ishida, I.; Jin, F.; Kishi, H.; Muraguchi, A. Post-translational modification of TRAIL receptor type 1 on various tumor cells and the susceptibility of tumors to TRAIL-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *395*, 251–257.
113. Burvenich, I.J.; Lee, F.-T.; Guo, N.; Gan, H.K.; Rigopoulos, A.; Parslow, A.C.; O'Keefe, G.J.; Gong, S.J.; Tochon-Danguy, H.; Rudd, S.E. et al. In Vitro and In Vivo Evaluation of 89Zr-DS-8273a as a Theranostic for Anti-Death Receptor 5 Therapy. *Theranostics* **2016**, *6*, 2225–2234.
114. Dominguez, G.A.; Condamine, T.; Mony, S.; Hashimoto, A.; Wang, F.; Liu, Q.; Forero, A.; Bendell, J.; Witt, R.; Hockstein, N. et al. Selective Targeting of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer Patients Using DS-8273a, an Agonistic TRAIL-R2 Antibody. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 2942–2950.
115. Forero, A.; Bendell, J.C.; Kumar, P.; Janisch, L.; Rosen, M.; Wang, Q.; Copigneaux, C.; Desai, M.; Senaldi, G.; Maitland, M.L. First-in-human study of the antibody DR5 agonist DS-8273a in patients with advanced solid tumors. *Investig. New Drugs* **2017**, *35*, 298–306.
116. Herbst, R.S.; Kurzrock, R.; Hong, D.S.; Valdivieso, M.; Hsu, C.-P.; Goyal, L.; Juan, G.; Hwang, Y.; Wong, S.; Hill, J.S. et al. A first-in-human study of conatumumab in adult patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 5883–5891.
117. LoRusso, P.M.; Hong, D.; Heath, E.; Kurzrock, R.; Wang, D.; Hsu, M.; Goyal, L.; Wiezorek, J.; Storgard, C.; Herbst, R. First-in-human study of AMG 655, a pro-apoptotic TRAIL receptor-2 agonist, in adult patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 3534.
118. Camidge, D.R.; Herbst, R.S.; Gordon, M.S.; Eckhardt, S.G.; Kurzrock, R.; Durbin, B.; Ing, J.; Tohny, T.M.; Sager, J.; Ashkenazi, A.; et al. A phase I safety and pharmacokinetic study of the death receptor 5 agonistic antibody PRO95780 in patients with advanced malignancies. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 1256–1263.
119. Kang, Z.; Chen, J.-J.; Yu, Y.; Li, B.; Sun, S.-Y.; Zhang, B.; Cao, L. Drozitumab, a human antibody to death receptor 5, has potent antitumor activity against rhabdomyosarcoma with the expression of caspase-8 predictive of response. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 3181–3192.
120. Forero-Torres, A.; Infante, J.R.; Waterhouse, D.; Wong, L.; Vickers, S.; Arrowsmith, E.; He, A.R.; Har, L.; Trent, D.; Wade, J.; et al. Phase 2, multicenter, open-label study of tigatuzumab (CS-1008), a humanized monoclonal antibody targeting death receptor 5, in combination with gemcitabine in chemotherapy-naïve patients with unresectable or metastatic pancreatic cancer. *Cancer Med.* **2013**, *2*, 925–932.

121. Forero-Torres, A.; Shah, J.; Wood, T.; Posey, J.; Carlisle, R.; Copigneaux, C.; Luo, F.; Wojtowicz-Praga, S.; Percent, I.; Saleh, M. Phase I trial of weekly tigatuzumab, an agonistic humanized monoclonal antibody targeting death receptor 5 (DR5). *Cancer Biother. Radiopharm.* **2010**, *25*, 13–19.
122. Ichikawa, K.; Liu, W.; Zhao, L.; Wang, Z.; Liu, D.; Ohtsuka, T. Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 954–960.
123. Belyanskaya, L.L.; Marti, T.M.; Hopkins-Donaldson, S.; Kurtz, S.; Felley-Bosco, E.; Stahel, R.A. Human agonistic TRAIL receptor antibodies Mapatumumab and Lexatumumab induce apoptosis in malignant mesothelioma and act synergistically with cisplatin. *Mol. Cancer* **2007**, *6*, 66.
124. Chen, L.; Qiu, Y.; Hao, Z.; Cai, J.; Zhang, S.; Liu, Y.; Zheng, D. A novel humanized anti-tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-R2 monoclonal antibody induces apoptotic and autophagic cell death. *IUBMB Life* **2017**, doi:10.1002/iub.1659.
125. Rocha Lima, C.M.; Bayraktar, S.; Flores, A.M.; MacIntyre, J.; Montero, A.; Baranda, J.C.; Wallmark, J.; Portera, C.; Raja, R.; et al. Phase Ib study of drozitumab combined with first-line mFOLFOX6 plus bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Investig.* **2012**, *30*, 727–731.
126. Shimada, O.; Wu, X.; Jin, X.; Abdel-Muneem Nouh, M.A.; Fiscella, M.; Albert, V.; Matsuda, T.; Kakehi, Y. Human agonistic antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2 induces cytotoxicity and apoptosis in prostate cancer and bladder cancer cells. *Urology* **2007**, *69*, 395–401.
127. Sharma, S.; de Vries, E.G.; Infante, J.R.; Oldenhuis, C.N.; Gietema, J.A.; Yang, L.; Bilic, S.; Parker, K.; Goldbrunner, M.; Scott, J.W.; et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the DR5 antibody LB135 alone and in combination with capecitabine in patients with advanced solid tumors. *Investig. New Drugs* **2014**, *32*, 135–144.
128. Fulda, S. Safety and tolerability of TRAIL receptor agonists in cancer treatment. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2015**, *71*, 525–527.
129. Holland, P.M. Death receptor agonist therapies for cancer, which is the right TRAIL? *Cytokine Growth Factor Rev.* **2014**, *25*, 185–193.
130. Ashkenazi, A. Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer: Lessons learned and future directions. *J. Clin. Investig.* **2015**, *125*, 487–489.
131. Kasibhatla, S.; Tseng, B. Why target apoptosis in cancer treatment? *Mol. Cancer Ther.* **2003**, *2*, 573–580.
132. Baetu, T.M.; Hiscott, J. On the TRAIL to apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2002**, *13*, 199–207.
133. Lemke, J.; von Karstedt, S.; El Hay, M.A.; Conti, A.; Arce, F.; Montinaro, A.; Papenfuss, K.; El-Bahrawy, M.A.; Walczak, H. Selective CDK9 inhibition overcomes TRAIL resistance by concomitant suppression of cFlip and Mcl-1. *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 491–502.
134. Hughes, M.A.; Powley, I.R.; Jukes-Jones, R.; Horn, S.; Feoktistova, M.; Feoktistova, L.; Schwabe, J.W.R.; Leverkus, M.; Cain, K.; MacFarlane, M. Co-operative and Hierarchical Binding of c-FLIP and Caspase-8: A Unified Model Defines How c-FLIP Isoforms Differentially Control Cell Fate. *Mol. Cell.* **2016**, *61*, 834–849.
135. Ndozangue-Touriguine, O.; Sebbagh, M.; Merino, D.; Micheau, O.; Bertoglio, J.; Breard, J. A mitochondrial block and expression of XIAP lead to resistance to TRAIL-induced apoptosis during progression to metastasis of a colon carcinoma. *Oncogene* **2008**, *27*, 6012–6022.
136. Finlay, D.; Vamos, M.; González-López, M.; Ardecky, R.J.; Ganji, S.R.; Yuan, H.; Su, Y.; Cooley, T.R.; Hauser, C.T.; Welsh, K.; et al. Small-molecule IAP antagonists sensitize cancer cells to TRAIL-induced apoptosis: Roles of XIAP and cIAPs. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13*, 5–15.
137. Perimenis, P.; Galaris, A.; Voulgari, A.; Prassa, M.; Pintzas, A. IAP antagonists Birinapant and AT-406 efficiently synergise with either TRAIL, BRAF, or BCL-2 inhibitors to sensitise BRAFV600E colorectal tumour cells to apoptosis. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 624.
138. Wang, S. The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway. *Oncogene* **2008**, *27*, 6207–6215.
139. Griffith, T.S.; Rauch, C.T.; Smolak, P.J.; Waugh, J.Y.; Boiani, N.; Lynch, D.H.; Smith, C.A.; Goodwin, R.G.; Kubin, M.Z. Functional analysis of TRAIL receptors using monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 2597–2605.
140. Takeda, K.; Yamaguchi, N.; Akiba, H.; Kojima, Y.; Hayakawa, Y.; Tanner, J.E.; Sayers, T.J.; Seki, N.; Okumura, K.; Yagita, H.; et al. Induction of Tumor-specific T Cell Immunity by Anti-DR5 Antibody Therapy. *J. Exp. Med.* **2004**, *199*, 437–448.

141. Watanabe, N.; Nomura, T.; Takai, T.; Chiba, T.; Honjo, T.; Tsubata, T. Antigen receptor cross-linking by anti-immunoglobulin antibodies coupled to cell surface membrane induces rapid apoptosis of normal spleen B cells. *Scand. J. Immunol.* **1998**, *47*, 541–547.
142. Szegezdi, E.; Leverkus, M. Guiding the Killer and Bringing in Accomplices: Bispecific Antibody Treatment for Malignant Melanoma. *J. Investig. Dermatol.* **2016**, *136*, 362–364.
143. Tamada, T.; Shinmi, D.; Ikeda, M.; Yonezawa, Y.; Kataoka, S.; Kuroki, R.; Mori, E.; Motoki, K. TRAIL-R2 Superoligomerization Induced by Human Monoclonal Agonistic Antibody KMTR2. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17936.
144. Motoki, K.; Mori, E.; Matsumoto, A.; Thomas, M.; Tomura, T.; Humphreys, R.; Albert, V.; Muto, M.; Yoshida, H.; Aoki, M.; et al. Enhanced apoptosis and tumor regression induced by a direct agonist antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 3126–3135.
145. Nagane, M.; Shimizu, S.; Mori, E.; Kataoka, S.; Shiokawa, Y. Predominant antitumor effects by fully human anti-TRAIL-receptor 2 (DR5) monoclonal antibodies in human glioma cells in vitro and in vivo. *Neuro Oncol.* **2010**, *12*, 687–700.
146. Graves, J.D.; Kordich, J.J.; Huang, T.H.; Piasecki, J.; Bush, T.L.; Sullivan, T.; Foltz, I.N.; Chang, W.; Douangpanya, H.; Dang, T.; et al. Apo2L/TRAIL and the Death Receptor 5 Agonist Antibody AMG 655 Cooperate to Promote Receptor Clustering and Antitumor Activity. *Cancer Cell* **2014**, *26*, 177–189.
147. Tuthill, M.H.; Montinaro, A.; Zinngrebe, J.; Prieske, K.; Draber, P.; Prieske, S.; Newsom-Davis, T.; von Karstedt, S.; Graves, J.; Walczak, H. TRAIL-R2-specific antibodies and recombinant TRAIL can synergise to kill cancer cells. *Oncogene* **2015**, *34*, 2138–2144.
148. Hao, Z.C.; Han, X.; Sun, X.; Shen, M.; Huang, J.; Li, Y.; Ozawa, T.; Pang, D.; Jin, S.; Kishi, H.; et al. Fully human monoclonal antibodies to TRAIL-R1 enhance TRAIL-induced apoptosis via activation of caspase-8 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *475*, 238–244.
149. Marshall, J.L. *Cancer Therapeutic Targets*; Springer: New York, NY, USA, **2017**; p. 1105.
150. Hendriks, D.; Choi, G.; de Bruyn, M.; Wiersma, V.R.; Bremer, E. Antibody-Based Cancer Therapy: Successful Agents and Novel Approaches. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2017**, *331*, 289–383.
151. Wajant, H. Principles of antibody-mediated TNF receptor activation. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 1727–1741.
152. Pavet, V.; Beyrath, J.; Pardin, C.; Morizot, A.; Lechner, M.-C.; Briand, J.-P.; Wendland, M.; Maison, W.; Fournel, S.; Micheau, O.; et al. Multivalent DR5 peptides activate the TRAIL death pathway and exert tumoricidal activity. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 1101–1110.
153. Liu, F.; Si, Y.; Liu, G.; Li, S.; Zhang, J.; Ma, Y. The tetravalent anti-DR5 antibody without cross-linking direct induces apoptosis of cancer cells. *Biomed. Pharmacother.* **2015**, *70*, 41–45.
154. Papadopoulos, K.P.; Isaacs, R.; Bilic, S.; Kentsch, K.; Huet, H.A.; Hofmann, A.; Rasco, D.; Kundamal, N.; Tang, Z.; Cooksey, J.; et al. Unexpected hepatotoxicity in a phase I study of TAS266, a novel tetravalent agonistic Nanobody(R) targeting the DR5 receptor. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2015**, *75*, 887–895.
155. Siegel, M.R.; Sisler, H.D. Inhibition of Protein Synthesis in Vitro by Cycloheximide. *Nature* **1963**, *200*, 675–676.
156. Fulda, S.; Meyer, E.; Debatin, K.M. Metabolic inhibitors sensitize for CD95 (APO-1/Fas)-induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like interleukin 1-converting enzyme inhibitory protein expression. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3947–3956.
157. Bruhns, P.; Iannascoli, B.; England, P.; Mancardi, D.A.; Fernandez, N.; Jorieux, S.; Daëron, M. Specificity and affinity of human Fc gamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* **2009**, *113*, 3716–3725.
158. Li, F.; Ravetch, J.V. Antitumor activities of agonistic anti-TNFR antibodies require differential FcγRIIB coengagement in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 19501–19506.
159. Cheng, X.; Meng, Q.; Gao, C.; Zhuang, G.; Huang, X.; Zhang, J.; Liu, B.; Fan, X.; Zhang, M. Analysis of aDR5scFv with Specific Identification and Function. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* **2016**, *35*, 25–31.
160. Piao, X.H.; Ozawa, T.; Hamana, H.; Shitaoka, K.; Jin, A.; Kishi, H.; Muraguchi, A. TRAIL-receptor 1 IgM antibodies strongly induce apoptosis in human cancer cells in vitro and in vivo. *Oncoimmunology* **2016**, *5*, doi:10.1080/2162402X.2015.1131380.
161. Kaplan-Lefko, P.J.; Graves, J.D.; Zoog, S.J.; Pan, Y.; Wall, J.; Branstetter, D.G.; Moriguchi, J.; Coxon, A.; Huard, J.N.; et al. Conatumumab, a fully human agonist antibody to death receptor 5, induces apoptosis via caspase activation in multiple tumor types. *Cancer Biol. Ther.* **2010**, *9*, 618–631.

162. Ahmad, Z.A.; Yeap, S.K.; Ali, A.M.; Ho, W.Y.; Alitheen, N.B.M.; Hamid, M. scFv Antibody: Principles and Clinical Application. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, doi:10.1155/2012/980250.
163. Zhang, X.L.; Yang, Y.; Fan, D.; Xiong, D. The development of bispecific antibodies and their applications in tumor immune escape. *Exp. Hematol. Oncol.* **2017**, *6*, 12.
164. Naoum, G.E.; Buchsbaum, D.J.; Tawadros, F.; Farooqi, A.; Arafat, W.O. Journey of TRAIL from Bench to Bedside and its Potential Role in Immuno-Oncology. *Oncol. Rev.* **2017**, *11*, 332.
165. Arabpour, M.; Poelstra, K.; Helfrich, W.; Bremer, E.; Haisma, H.J. Targeted elimination of activated hepatic stellate cells by an anti-epidermal growth factor-receptor single chain fragment variable antibody-tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (scFv425-sTRAIL). *J. Gene Med.* **2014**, *16*, 281–290.
166. Bremer, E.; Samplonius, D.F.; van Genne, L.; Dijkstra, M.H.; Kroesen, B.J.; de Leij, L.F.M.H.; Helfrich, W. Simultaneous inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling and enhanced activation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor-mediated apoptosis induction by an scFv:sTRAIL fusion protein with specificity for human EGFR. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 10025–10033.
167. Bremer, E.; Samplonius, D.; Kroesen, B.-J.; van Genne, L.; de Leij, L.; Helfrich, W. Exceptionally potent anti-tumor bystander activity of an scFv:sTRAIL fusion protein with specificity for EGP2 toward target antigen-negative tumor cells. *Neoplasia* **2004**, *6*, 636–645.
168. Hartung, F.; Pardo, L.A. Guiding TRAIL to cancer cells through Kv10.1 potassium channel overcomes resistance to doxorubicin. *Eur. Biophys. J.* **2016**, *45*, 709–719.
169. Tatzel, K.; Kuroki, L.; Dmitriev, I.; Kashentseva, E.; Curiel, D.T.; Goedegebuure, S.P.; Powell, M.A.; Mutch, D.G.; Hawkins, W.G.; Spitzer, D. Membrane-proximal TRAIL species are incapable of inducing short circuit apoptosis signaling: Implications for drug development and basic cytokine biology. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22661.
170. De Bruyn, M.; Rybczynska, A.A.; Wei, Y.; Schwenkert, M.; Fey, G.H.; Dierckx, R.A.; van Waarde, A.; Helfrich, W.; Bremer, E. Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan (MCSP)-targeted delivery of soluble TRAIL potently inhibits melanoma outgrowth in vitro and in vivo. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 301.
171. Wang, L.H.; Ni, C.-W.; Lin, Y.-Z.; Yin, L.; Jiang, C.-B.; Lv, C.-T.; Le, Y.; Lang, Y.; Zhao, C.-Y.; Yang, K. et al. Targeted induction of apoptosis in glioblastoma multiforme cells by an MRP3-specific TRAIL fusion protein in vitro. *Tumour Biol.* **2014**, *35*, 1157–1168.
172. Hartung, F.; Stuhmer, W.; Pardo, L.A. Tumor cell-selective apoptosis induction through targeting of K(V)10.1 via bifunctional TRAIL antibody. *Mol. Cancer* **2011**, *10*, 109.
173. Ettinger, D.S. Clinical implications of EGFR expression in the development and progression of solid tumors: Focus on non-small cell lung cancer. *Oncologist* **2006**, *11*, 358–373.
174. Zhu, Y.N.; Bassoff, N.; Reinshagen, C.; Bhere, D.; Nowicki, M.O.; Lawler, S.E.; Roux, J.; Shah, K. Bi-specific molecule against EGFR and death receptors simultaneously targets proliferation and death pathways in tumors. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2602.
175. Siegemund, M.; Pollak, N.; Seifert, O.; Wahl, K.; Hanak, K.; Vogel, A.; Nussler, A.K.; Göttisch, D.; Münkler, S.; Bantel, H.; et al. Superior antitumoral activity of dimerized targeted single-chain TRAIL fusion proteins under retention of tumor selectivity. *Cell Death Dis.* **2012**, *3*, e295.
176. Siegemund, M.; Seifert, O.; Zarani, M.; Džinić, T.; De Leo, V.; Göttisch, D.; Münkler, S.; Hutt, M.; Pfizenmaier, K.; Kontermann, R.E. An optimized antibody-single-chain TRAIL fusion protein for cancer therapy. *MAbs* **2016**, *8*, 879–891.
177. Holbro, T.; Hynes, N.E. ErbB receptors: Directing key signaling networks throughout life. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, *44*, 195–217.
178. Kouno, M.; Lin, C.; Schechter, N.M.; Siegel, D.; Yang, X.; Seykora, J.T.; Stanley, J.R. Targeted delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand to keratinocytes with a pemphigus mAb. *J. Investig. Dermatol.* **2013**, *133*, 2212–2220.
179. Li, R.; Yang, H.; Jia, D.; Nie, Q.; Cai, H.; Fan, Q.; Wan, L.; Li, L.; Lu, X. Fusion to an albumin-binding domain with a high affinity for albumin extends the circulatory half-life and enhances the in vivo antitumor effects of human TRAIL. *J. Control Release* **2016**, *228*, 96–106.
180. Qiu, F.; Hu, M.; Tang, B.; Liu, X.; Zhuang, H.; Yang, J.; Hua, Z.-C. Annexin V-TRAIL fusion protein is a more sensitive and potent apoptotic inducer for cancer therapy. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 3565.
181. Sang, M.; Zhang, J.; Li, B.; Chen, Y. TRAIL-CM4 fusion protein shows in vitro antibacterial activity and a stronger antitumor activity than solo TRAIL protein. *Protein Expr. Purif.* **2016**, *122*, 82–89.

182. Prigozhina, T.B.; Szafer, F.; Aronin, A.; Tzdaka, K.; Amsili, S.; Makdasi, E.; Shani, N.; Elhalel, M.D. Fn14-TRAIL fusion protein is oligomerized by TWEAK into a superefficient TRAIL analog. *Cancer Lett.* **2017**, *400*, 99–109.
183. Cao, L.; Du, P.; Jiang, S.-H.; Jin, G.-H.; Huang, Q.-L.; Hua, Z.-C. Enhancement of antitumor properties of TRAIL by targeted delivery to the tumor neovasculature. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 851–861.
184. Huang, K.; Duan, N.; Zou, W.; Zhang, C.; Lai, Y.; Shen, P.; Hua, Z. Fused hydrophobic elastin-like-peptides (ELP) enhance biological activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Protein Pept. Lett.* **2015**, *22*, 1000–1006.
185. Yao, R.; Sui, A.; Wang, Z.; Liu, S.; Zhou, Q.; Liu, X.; Zhang, H. Induction of non-small cell lung carcinoma apoptosis using soluble RGD-TRAIL by targeting the integrin receptor of tumor cells. *Mol. Med. Rep.* **2012**, *6*, 1355–1360.
186. Huang, Y.; Li, X.; Sha, H.; Zhang, L.; Bian, X.; Han, X.; Liu, B. sTRAIL-iRGD is a promising therapeutic agent for gastric cancer treatment. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 579.
187. Liu, R.; Ma, X.; Wang, H.; Xi, Y.; Qian, M.; Yang, W.; Luo, D.; Fan, L.; Xia, X.; Zhou, J.; et al. The novel fusion protein sTRAIL-TMTP1 exhibits a targeted inhibition of primary tumors and metastases. *J. Mol. Med.* **2014**, *92*, 165–175.
188. Fan, J.; Wang, Z.; Huang, L.; Shen, Y. Efficient refolding of the bifunctional therapeutic fusion protein VAS-TRAIL by a triple agent solution. *Protein Expr. Purif.* **2016**, *125*, 68–73.
189. Wang, X.; Qiao, X.; Shang, Y.; Zhang, S.; Li, Y.; He, H.; Chen, S.-Z. RGD and NGR modified TRAIL protein exhibited potent anti-metastasis effects on TRAIL-insensitive cancer cells in vitro and in vivo. *Amino Acids* **2017**, *49*, 931–941.
190. Tao, Z.; Yang, H.; Shi, Q.; Fan, Q.; Wan, L.; Lu, X. Targeted Delivery to Tumor-associated Pericytes via an Affibody with High Affinity for PDGFRbeta Enhances the in vivo Antitumor Effects of Human TRAIL. *Theranostics* **2017**, *7*, 2261–2276.
191. Su, Y.; Tatzel, K.; Wang, X.; Belt, B.; Binder, P.; Kuroki, L.; Powell, M.A.; Mutch, D.G.; Hawkins, W.G.; Spitzer, D. Mesothelin's minimal MUC16 binding moiety converts TR3 into a potent cancer therapeutic via hierarchical binding events at the plasma membrane. *Oncotarget* **2016**, *7*, 31534–31549.
192. De Bruyn, M.; Wei, Y.; Wiersma, V.R.; Samplonius, D.F.; Klip, H.G.; van der Zee, A.G.J.; Yang, B.; Helfrich, W.; Bremer, E. Cell surface delivery of TRAIL strongly augments the tumoricidal activity of T cells. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 5626–5637.
193. Bremer, E.; Samplonius, D.G.; Peipp, M.; van Genne, L.; Kroesen, B.J.; Fey, G.H.; Gramatzki, M.; de Leij, L.F.M.H.; Helfrich, W. Target cell-restricted apoptosis induction of acute leukemic T cells by a recombinant tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand fusion protein with specificity for human CD7. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 3380–3388.
194. Stieglmaier, J.; Bremer, E.; Kellner, C.; Liebig, T.M.; ten Cate, B.; Peipp, M.; Schulze-Koops, H.; Pfeiffer, M.; Bühring, H.-J.; Greil, J.; et al. Selective induction of apoptosis in leukemic B-lymphoid cells by a CD19-specific TRAIL fusion protein. *Cancer Immunol. Immunother.* **2008**, *57*, 233–246.
195. Uckun, F.M.; Myerd, D.E.; Qazi, S.; Ozer, Z.; Rose, R.; D'Cruz, O.J.; Ma, H. Recombinant human CD19L-sTRAIL effectively targets B cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Investig.* **2015**, *125*, 1006–1018.
196. Yan, C.; Li, S.; Li, Z.; Peng, H.; Yuan, X.; Jiang, L.; Zhang, Y.; Fan, D.; Hu, X.; Yang, M.; et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells as vehicles of CD20-specific TRAIL fusion protein delivery: A double-target therapy against non-Hodgkin's lymphoma. *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 142–151.
197. Madhumathi, J.; Sridevi, S.; Verma, R.S. Novel TNF-related Apoptotic-inducing Ligand-based Immunotoxin for Therapeutic Targeting of CD25 Positive Leukemia. *Target Oncol.* **2016**, *11*, 535–547.
198. Ten Cate, B.; Bremer, E.; de Bruyn, M.; Bijma, T.; Samplonius, D.F.; Schwemmlein, M.; Huls, G.; Fey, G.H.; Helfrich, W. A novel AML-selective TRAIL fusion protein that is superior to Gemtuzumab Ozogamicin in terms of in vitro selectivity, activity and stability. *Leukemia* **2009**, *23*, 1389–1397.
199. El-Mesery, M.; Trebing, J.; Schäfer, V.; Weisenberger, D.; Siegmund, D.; Wajant, H. CD40-directed scFv-TRAIL fusion proteins induce CD40-restricted tumor cell death and activate dendritic cells. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e916.
200. Wiersma, V.R.; He, Y.; Samplonius, D.F.; van Ginkel, R.J.; Gerssen, J.; Eggleton, P.; Zhou, J.; Bremer, E.; Helfrich, W. A CD47-blocking TRAIL fusion protein with dual pro-phagocytic and pro-apoptotic anticancer activity. *Br. J. Haematol.* **2014**, *164*, 304–307.

201. Trebing, J.; El-Mesery, M.; Schäfer, V.; Weisenberger, D.; Siegmund, D.; Silence, K.; Wajant, H. CD70-restricted specific activation of TRAILR1 or TRAILR2 using scFv-targeted TRAIL mutants. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1035.
202. Wiersma, V.R.; de Bruyn, M.; Shi, C.; Gooden, M.J.M.; Wouters, M.C.A.; Samplonius, D.F.; Hendriks, D.; Nijman, H.W.; Wei, Y.; Zhou, J.; et al. C-type lectin-like molecule-1 (CLL1)-targeted TRAIL augments the tumoricidal activity of granulocytes and potentiates therapeutic antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *MAbs* **2015**, *7*, 321–330.
203. Hendriks, D.; He, Y.; Koopmans, I.; Wiersma, V.R.; van Ginkel, R.J.; Samplonius, D.F.; Helfrich, W.; Bremer, E. Programmed Death Ligand 1 (PD-L1)-targeted TRAIL combines PD-L1-mediated checkpoint inhibition with TRAIL-mediated apoptosis induction. *Oncoimmunology* **2016**, *5*, e1202390.
204. Dobson, C.L.; Main, S.; Newton, P.; Chodorge, M.; Cadwallader, K.; Humphreys, R.; Albert, V.; Vaughan, T.J.; Minter, R.R.; Edwards, B.M. Human monomeric antibody fragments to TRAIL-R1 and TRAIL-R2 that display potent in vitro agonism. *MAbs* **2009**, *1*, 552–562.
205. Swers, J.S.; Grinberg, L.; Wang, L.; Feng, H.; Lekstrom, K.; Carrasco, R.; Xiao, Z.; Inigo, I.; Leow, C.C.; Wu, H.; Tice, D.A.; Baca, M. Multivalent scaffold proteins as superagonists of TRAIL receptor 2-induced apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12*, 1235–1244.
206. Lee, C.H.; Park, K.J.; Kim, S.J.; Kwon, O.; Jeong, K.J.; Kim, A.; Kim, Y.S. Generation of bivalent and bispecific kringle single domains by loop grafting as potent agonists against death receptors 4 and 5. *J. Mol. Biol.* **2011**, *411*, 201–219.
207. Lee, C.H.; Park, K.J.; Sung, E.S.; Kim, A.; Choi, J.D.; Kim, J.D.; Kim, S.H.; Kwon, M.K.; Kim, Y.S. Engineering of a human kringle domain into agonistic and antagonistic binding proteins functioning in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 9567–9571.
208. Park, K.J.; Lee, C.H.; Kim, A.; Jeong, K.J.; Kim, C.H.; Kim, Y.S. Death receptors 4 and 5 activate Nox1 NADPH oxidase through riboflavin kinase to induce reactive oxygen species-mediated apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 3313–3325.
209. Jeong, G.M.; Lee, Y.J.; Kim, Y.S.; Jeong, K.J. High-level production of Fc-fused kringle domain in *Pichia pastoris*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *41*, 989–996.
210. Milutinovic, S.; Kashyap, A.K.; Yanagi, T.; Wimer, C.; Zhou, S.; O'Neil, R.; Kurtzman, A.L.; Faynboym, A.; Xu, L.; Hannum, C.H.; et al. Dual Agonist Surrobody Simultaneously Activates Death Receptors DR4 and DR5 to Induce Cancer Cell Death. *Mol. Cancer Ther.* **2016**, *15*, 114–124.
211. Michaelson, J.S.; Demarest, S.J.; Miller, B.; Amatucci, A.; Snyder, W.B.; Wu, X.; Huang, F.; Phan, S.; Gao, S.; Doern, A.; et al. Anti-tumor activity of stability-engineered IgG-like bispecific antibodies targeting TRAIL-R2 and LTbetaR. *MAbs* **2009**, *1*, 128–141.
212. He, Y.; Hendriks, D.; van Ginkel, R.; Samplonius, D.; Bremer, E.; Helfrich, W. Melanoma-Directed Activation of Apoptosis Using a Bispecific Antibody Directed at MCSP and TRAIL Receptor-2/Death Receptor-5. *J. Investig. Dermatol.* **2016**, *136*, 541–544.
213. Brunker, P.; Wartha, K.; Friess, T.; Grau-Richards, S.; Waldhauer, I.; Koller, C.F.; Weiser, B.; Majety, M.; Runza, V.; Niu, H.; et al. RG7386, a Novel Tetravalent FAP-DR5 Antibody, Effectively Triggers FAP-Dependent, Avidity-Driven DR5 Hyperclustering and Tumor Cell Apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* **2016**, *15*, 946–957.
214. Lee, H.; Hong, B.-J.; Lee, J.H.; Yeo, S.; Jung, H.Y.; Chung, J.; Ahn, G.-O.; Hahn, S.K. Hyaluronate-Death Receptor 5 Antibody Conjugates for Targeted Treatment of Liver Metastasis. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 3085–3093.
215. Gross, G.; Gorochov, G.; Waks, T.; Eshhar, Z. Generation of effector T cells expressing chimeric T cell receptor with antibody type-specificity. *Transplant. Proc.* **1989**, *21*, 127–130.
216. Gross, G.; Waks, T.; Eshhar, Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 10024–10028.
217. Sadelain, M.; Brentjens, R.; Riviere, I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **2009**, *21*, 215–223.
218. Kobayashi, E.; Kishi, H.; Ozawa, T.; Hamana, H.; Nakagawa, H.; Jin, A.; Lin, Z.; Muraguchi, A. A chimeric antigen receptor for TRAIL-receptor 1 induces apoptosis in various types of tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *453*, 798–803.
219. Roybal, K.T.; Rupp, L.J.; Morsut, L.; Walker, W.J.; McNally, K.A.; Park, J.S.; Lim, W.A. Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. *Cell* **2016**, *164*, 770–779.

220. Beck, A.; Goetsch, L.; Dumontet, C.; Corvaia, N. Strategies and challenges for the next generation of antibody drug conjugates. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 315–337.
221. Lambert, J.M.; Morris, C.Q. Antibody-Drug Conjugates (ADCs) for Personalized Treatment of Solid Tumors: A Review. *Adv. Ther.* **2017**, *34*, 1015–1035.
222. Pan, L.Q.; Wang, H.B.; Xie, Z.M.; Li, Z.H.; Tang, X.J.; Xu, Y.C.; Zhang, C.; Naranmandura, H.; Chen, S.Q. Novel conjugation of tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) with monomethyl auristatin E for efficient antitumor drug delivery. *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 4718–4722.
223. Pan, L.Q.; Zhao, W.B.; Lai, J.; Ding, D.; Wei, X.; Li, Y.; Liu, W.; Yang, X.; Xu, Y.; Chen, S. Hetero-modification of TRAIL trimer for improved drug delivery and in vivo antitumor activities. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14872.
224. Wei, X.; Yang, X.; Zhao, W.; Xu, Y.; Pan, L.; Chen, S. Optimizing Multistep Delivery of PEGylated Tumor-Necrosis-Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Toxin Conjugates for Improved Antitumor Activities. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 2180–2189.
225. Pieczykolan, J.S.; Kubiński, K.; Masłyk, M.; Pawlak, S.D.; Pieczykolan, A.; Różga, P.K.; Szymanik, M.; Gałązka, M.; Teska-Kamińska, M.; Żerek, B.; et al. AD-O53.2—A novel recombinant fusion protein combining the activities of TRAIL/Apo2L and Smac/Diablo, overcomes resistance of human cancer cells to TRAIL/Apo2L. *Investig. New Drugs* **2014**, *32*, 1155–1166.
226. Wang, C.; Chen, T.; Zhang, N.; Yang, M.; Li, B.; Lü, X.; Cao, X.; Ling, C. Melittin, a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting I κ B kinase-NF κ B. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 3804–3813.
227. Liu, H.; Han, Y.; Fu, H.; Liu, M.; Wu, J.; Chen, X.; Zhang, S.; Chen, Y. Construction and expression of sTRAIL-melittin combining enhanced anticancer activity with antibacterial activity in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 2877–2884.



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Annexe H

Article II en révision dans *Cell Death
and Disease*

Generation and characterization of novel anti-DR4 and anti-DR5 antibodies developed by genetic immunization

Agathe Dubuisson^{1,2,3}, Cécile Favreau^{1,3}, Eric Fourmaux², Sabrina Lareure², Rafael Saraiva^{1,3}, Catherine Pellat-Deceunynk⁴, Said El Alaoui², Olivier Micheau^{1,2,3,*}

¹Université Bourgogne Franche-Comté, INSERM, LNC UMR1231, F-21079 Dijon, France

²CovalAb, Research Department, 11 Avenue Albert Einstein, 69100 Villeurbanne, Lyon, France

³INSERM, UMR1231, « Equipe labellisée Ligue contre le Cancer » and Laboratoire d'Excellence LipSTIC, Dijon, F-21079 France

⁴INSERM, UMR892, CNRS 6299, Université de Nantes, Nantes, F-44007 France

*Correspondance : Olivier Micheau, olivier.micheau@inserm.fr, tel +33 3 80393468

Abstract (226 words)

Development of therapeutic antibodies in oncology has attracted much interest in the last decades. More than 30 of them have been approved and are being used to treat patients suffering from cancer.

Despite encouraging results, and albeit most clinical trials have been discontinued, monoclonal antibodies targeting TRAIL agonist death receptors (DR4 or DR5), remain interesting targets, since these receptors are overexpressed by tumour cells and able to trigger their death. In an effort to develop novel and specific anti-DR4 and anti-DR5 antibodies with improved properties, we used genetic immunisation to express native proteins *in vivo*. Injection of DR4 and DR5 cDNA into the tail veins of mice elicited significant humoral anti-DR4 and anti-DR5 responses and fusions of the corresponding spleens resulted in numerous hybridomas secreting antibodies that could specifically recognise DR4 or DR5 in their native forms. All antibodies bound specifically to their targets with a very high affinity, from picomolar to nanomolar range. Among the 21 anti-DR4 and anti-DR5 monoclonal antibodies that we have produced and purified, two displayed pro-apoptotic properties alone, and four were found to potentiate TRAIL-induced apoptosis. The most potent anti-DR4 antibody, C#16, was assessed *in vivo*, and was found, alone, to inhibit tumour growth in animal models. This is the first demonstration that DNA-based immunization method can be used to generate efficient therapeutic monoclonal antibodies targeting receptors of the TNF superfamily.

Keywords : Therapeutic antibodies; TNF receptors; DNA-immunization; cell death; apoptosis; DR4; DR5

Introduction

TRAIL agonist receptors, DR4 and DR5, have for more than two decades, been considered as potential targets for cancer therapy owing to their ability to trigger selective apoptosis in tumour cells while sparing normal cells ^{1,2}. Clinical evaluations of TRAIL, the natural ligand of DR4 and DR5, or anti-DR4 or anti-DR5 antibodies, alone or combined with chemotherapy, have, however, been discontinued due to the lack of efficacy ³. The sole exceptions, to date, include the clinical studies of the novel TRAIL recombinant protein developed by Sunbio Biotech ⁴. Coined CPT for circularly permuted TRAIL, assessment of this recombinant protein has been found to increase objective response in patients suffering from multiple myeloma, alone or combined with thalidomide ^{5,6}. Engagement of apoptosis by TRAIL agonist receptors mostly relies on the ability of the ligand or agonist antibodies to induce receptor aggregation. Accordingly, increasing TRAIL agonists valency enhances their pro-apoptotic activity up to 100-fold ^{7,8,9}. Mechanistically, the binding of TRAIL or agonist antibodies to DR4 and DR5 allows recruitment of the adaptor protein FADD, which in turn enables the binding of the initiator cysteine protease, caspase-8, within a supramolecular scaffold coined DISC for Death Inducing Signalling Complex ¹⁰. Within this scaffold, the zymogen caspase gets activated by proximity ¹¹, and released to the cytosol, where it can cleave other proteases such as caspase-3, another cysteine protease responsible for the execution phase of the apoptotic machinery. To date antibodies assessed in the clinic have mostly focused on DR5, with only one anti-DR4 evaluated in phase I/II ⁴. Keeping in mind that, DR4 prevails over DR5 in transducing TRAIL-induced cell death ¹², or that anti-DR5 and anti-DR4 antibodies can potentiate TRAIL-induced cell death ^{13,14}, development of antibodies targeting these receptors still holds interest in oncology.

Development of therapeutic antibodies by immunization is today an optimized and well-controlled process. Conventional immunization is mostly based on recombinant proteins or peptides^{15, 16, 17}. However, not all targets can be reproduced recombinantly. Their highly hydrophobic nature or conformational and topological complexity can make them difficult to produce¹⁸. In particular, generation of antibodies directed against multiple transmembrane proteins has proved to be difficult. Moreover, protein folding can be altered by the production and purification processes or due to the lack of their transmembrane domain. The difficulty to generate certain post-translational modifications makes the endogenous and native conformations of the immunogenic protein and its native epitopes hard to reproduce *in-vitro*^{19, 20}. For all these reasons, a new approach of immunization was developed in the early 90's, coined genetic immunization^{21, 22}. Originally developed as a vaccination method²³, DNA immunization has demonstrated its ability to induce significant cellular and humoral response²⁴. DNA immunization was found to be more effective than protein immunization in activating B cells in the germinal center. It has also presented advantages for the production of monoclonal antibodies²⁵. We describe here the characterization of several monoclonal anti-DR4 and -DR5 antibodies developed by this approach displaying pro-apoptotic activity, alone, or able to synergize with TRAIL.

Materials and Methods

Ligand, chemicals and antibodies

His-tagged human TRAIL was produced and used as described previously ²⁶. The anti-TRAIL-R1 (clone wB-K32) and anti-TRAIL-R2 (clone B-L27) antibodies, from Diaclone (Besançon, France), were used for flow cytometry ²⁷. Alexa-488 conjugated-goat anti-mouse secondary antibody was from Molecular Probes (Life technologies, Saint Aubin, France). For apoptosis measurement, Annexin V (N°556422) and 7AAD (N°559925) were from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). For western blot analysis, anti-TRAIL-R1 (clone AB16955) antibody was purchased from Chemicon (Millipore, Molsheim, France). Antibodies against caspase-3 (clone MF393), caspase-8 (clone 5F7) and anti-caspase-9 (clone 5B4) were from Medical & Biological Laboratories (Clinisciences, Montrouge, France). The anti-cleaved PARP-1 (clone D64-E10) from Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint Quentin, France). Antibodies against PARP-1 (clone H-300), GAPDH (clone 0411) and HSC70 (clone B-6) were from Santa Cruz Biotechnology (CliniSciences). HRP-conjugated anti-rabbit was from Jackson ImmunoResearch (Interchim, Montluçon, France). HRP-conjugated anti-mouse IgG (H+L) secondary antibody was from CovalAb (Villeurbanne, France). HRP-conjugated anti-mouse IgG1-, Ig2a- and Ig2b-specific antibodies were obtained from Southern Biotech (Clinisciences). The caspase inhibitor, Q-VD-Oph was from Selleck Chemicals (Munich, Germany). Puromycin was purchased from InvivoGen (Toulouse, France), IdeZ enzyme from Promega (Charbonnières, France). Protein A high performance affinity columns (cat# 17-0402-01) and NPROTEIN A SEPH 4 FF (cat# 17-5280-02) were from GE Healthcare (Dutscher, Brumath, France). HAT (hypoxanthine-aminopterin-thymidine, cat# H0262) and PEG (cat# P2906) were from Sigma (St Quentin Fallavier, France). HCS (hybridoma cloning supplement, cat# sc-224479) from Santa Cruz.

Animals

Mice used for these studies were maintained in a specific pathogen-free zone in accredited animal facility. All experiments were performed in compliance with the Committee of Ethics of Grand Campus de Dijon (C2EA grand campus Dijon) n°105 – C2EA105. Eight-week-old female Balb/c mice (Charles Rivers France, St Aubin-les-Elbeuf) were used for the immunization protocol, and eight-week-old female Balb/c NUDE mice (Charles Rivers) were used for the tumor growth evaluation following antibody injections.

Plasmid constructs

Plasmids encoding soluble human recombinant versions of DR4 or DR5 fused to the constant fraction of human gamma-immunoglobulin, *i.e.* DR4 (DR4-Fc) or DR5 (DR5-Fc), and conferring resistance to puromycin were constructed by PCR following In-Fusion manufacturer's instructions (In-Fusion HD cloning, Takara, Clontech), using the following primers OR435 5'-GCG-AAA-CGA-TCC-TCA-TCC-TGT-CTC-TTG-ATC-GATC-3'; OR436 5'-TTT-CGA-TAA-GCC-AGT-AAG-CAG-TGG-GTT-CTC-TAG-3'; OR437 5'-ACT-GGC-TTA-TCG-AAA-TTA-ATA-CGA-CTC-ACT-ATA-GGG-AGA-CCC-AAG-3'; OR438 5'-GTG-CCT-GAG-CGG-GAC-TCT-GGG-GTT-3'; OR439 5'-TGA-GGA-TCG-TTT-CGC-CAT-GAC-CGA-GTA-CAA-GCC-C-3' and OR446 5'-GTC-CCG-CTC-AGG-CAC-CGG-GCT-TGC-3'. Briefly, the neomycin cassette of the pCR3-neo-hDR4-Fc and pCR3-neo-hDR5-Fc expression vectors (generous gift from Dr Pascal Schneider, Epalinges, Switzerland) was replaced by puromycin by assembling PCR fragments obtained using OR435/OR436 and OR439/OR446 from each vector to the cDNA encoding resistance to puromycin generated by PCR amplification from OM181, a retroviral vector derived from pMSCV-Puro, resulting in the pCR3-Puro-hDR4-Fc (OM1450) and pCR3-Puro-hDR5-Fc (OM1449) constructs.

The pCR3-based plasmids encoding DR4 or DR5 full length (pCR3-DR4 and pCR3-DR5) under the control of the CMV promoter were kindly given by Dr Pascal Schneider. The CAG promoter-derivative plasmid encoding WPRE and GM-CSF full length, pCAGGS-GM-CSF (OM1463) was obtained by PCR, using the pCAGGS plasmid described by Niwa et al.²⁸, a WPRE containing vector synthesized from Genscript (OM567), a plasmid encoding hGM-CSF cDNA obtained from Riken (RDB 1687, OM1438) and a bGH Poly(A) signal containing vector obtained from genscript (GenEZ ORF clone OMU22984D, OM1459) and the following primers OR504 5'-CGC-CTC-CCC-GCC-CTG-TGC-CTT-CTA-GTT-GCC-AGC-3'; OR505 5'-GGC-TTC-ATG-ATG-TCC-CCA-TAA-TTT-TTG-GCA-GAG-GGA-AAA-AGA-TCT-CCA-TAG-AGC-CCA-CCG-CAT-C-3'; OR506 5'-AAA-CCA-AGC-CAA-AAA-TGA-GAA-TTC-GAA-TCA-ACC-TCT-GGA-TTA-CAA-AAT-TTG-TGA-AAG-A-3'; OR507 5'-AGG-GGC-AAA-CAA-CAG-ATG-GCT-GGC-AAC-TAG-AAG-GCA-CAG-GGC-GGG-GAG-GCG-3'; OR 510 5'-AAC-GTG-CTG-GTT-ATT-GTG-CTG-TCT-CAT-CAT-TTT-GGC-AAA-GAA-TTC-AAA-TGT-GGC-TGC-AGA-ATT-TAC-TTT-TCC-T-3'; OR511 5'-AAT-TTT-GTA-ATC-CAG-AGG-TTG-ATT-CGA-ATT-CTC-ATT-TTT-GGC-TTG-GTT-TTT-TGC-ATT-CAA-AGG-GGA-3'. Briefly, pCAGGS was digested using EcoRI and BglIII and ligated using the In-Fusion method with PCR products amplified from OM1459 using OR504/505, OM567 using OR506/507 and OM1438 using OR510/511. The CAG promoter plasmid encoding WPRE and DR5 full length (pCAGGS-DR5) was obtained by digesting OM1463 with EcoRI, to replace hGM-CSF by the full length sequence of DR5, as above using the PCR fragments obtained from the pCR3-DR5 plasmid using OR548 5'- AAC-GTG-CTG-GTT-ATT-GTG-CTG-TCT-CAT-CAT-TTT-GGC-AAA-GAA-TTC-ATG-GAA-CAA-CGG-GGA-CAG-AAC-3'and OR549 5'- GTC-AAT-CTT-TCA-CAA-ATT-TTG-TAA-TCC-AGA-GGT-TGA-TTC-GAA-TTC-AGG-AGG-ACA-TGG-CAG-AGT-CT -3'. After bacterial transformation, all final constructs were

confirmed by sequencing. When sequencing had been confirmed, LPS-Free MAXI plasmid preparations were performed (Macherey-Nagel, NucleoBond® Xtra Maxi EF).

Cell lines

293-T cells and the colorectal and breast cancer cell lines, HCT-116 and MDA-MB-231, respectively, were cultured in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM, Lonza, Levallois-Perret, France) supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS, Lonza). The lung carcinoma cell line H1703, was cultured in RPMI medium (Lonza) completed with 10% of FCS. 293-T expressing stably hDR4-Fc and hDR5-Fc (described below) and MDA-MB-231 isogenic derivatives, deficient for TRAIL receptors (DKO), DKO reconstituted with DR4 (DKO-DR4^{rec}), DR5 (DKO-DR5^{rec})^{12, 29} were cultured as above in DMEM. For cell maintenance, adherent cells were washed with HBSS (Lonza), detached with trypsin and diluted 1/10th with complete medium three times a week. The Burkitt Lymphoma cell line BL2 was cultured in RPMI medium completed with 10% of foetal calf serum.

Recombinant protein production

DR4-Fc and DR5-Fc expressing stable cell lines (293T-DR4-Fc and 293T-DR5-Fc respectively) were obtained by transfections of the pCR3-DRs-Fc plasmids (OM1449 or OM1450) into 293T cells cultured in a 10-cm tissue culture dish at 60% confluence. Transfections were performed using the Lipofectamin 3000, according to the provider's recommendations (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Transfected cells were grown in culture medium for 24 h, then treated with DMEM supplemented with 2.5 µg/mL of Puromycin. After selection, 293T-DR4-Fc and 293T-DR5-Fc cells were cultured in T175 mm² culture flasks. When the confluence reached 80%, the medium was changed to a synthetic medium, OptiMEM Glutamax (Thermo Fisher Scientific) to boost protein production. After 5 days of incubation, the supernatant was harvested and proteins were

purified as follows. Supernatant containing recombinant DRs-Fc protein was passed onto a high-performance protein-A column, washed twice with cold PBS 1X, then recombinant proteins were eluted with a 0.1M citrate NaOH pH2.5 solution, buffered with a 1 M Tris-HCl pH9. 0.2 microns filtration membranes and concentrated with Centricon (Millipore) to reach the concentration of 1 or 2 mg/mL. Cleavage receptors, devoid of Fc, cDR4 and cDR5 recombinant proteins were obtained using IdeZ enzyme following the manufacturer's recommendations.

DNA immunizations protocol

Balb/c mice were immunized with either 50 µg pCR3-DR4 or 50 µg pCAGGS-DR5 and 2,5 µg pCAGGS-GMCSF diluted in saline buffer via hydrodynamic tail vein (HTV) injection as previously described³¹. DR4 DNA injections were performed once a week during 4 weeks whereas DR5 DNA injections were performed every 14 days during 8 weeks. To follow up the production of antibodies, blood samples were taken after the third HTV immunization and serums were tested by ELISA.

Detection of human anti-DRs antibodies titration by ELISA

Determination of anti-DR4 or anti-DR5 antibody titers from mice sera, hybridoma supernatants or purified antibodies was assessed by ELISA. Sera from Balb/c mice were taken during immunization, hybridoma supernatants and purified antibodies were tested during monoclonal antibody development. They were screened on recombinant cleaved soluble receptors, cDR4 and cDR5, respectively. ELISA have been performed as follow. Recombinant cDR4 and cDR5 were coated to 96-well EIA/RIA flat bottom microtiter plates (Corning, Costar 3590, Thermo Fisher Scientific). Hybridoma supernatant samples were diluted by half, sera and purified antibodies were serially diluted by half. After binding for 1 h at 37° C on a rotating plate and incubation with the secondary antibody, reactivity was

measured at 450 nm using a microplate reader (Labsystems Multiskan Ascent, Bradenton, U.S.A.). Samples were considered positive when the optical density was above 0.3 for supernatant of hybridomas. Titers of purified antibodies were evaluated as the highest dilution (in ng/mL) where optical density is ≥ 1 .

Production of monoclonal antibodies

Fusions were performed from the most responsive mice. Briefly, spleens were harvested and splenocytes were extracted then fused to Sp2 mouse myeloma cells using PEG³⁰. 2×10^5 cells/mL were then put into 96-well plate with medium containing 20% SVF, HAT (hypoxanthine-aminopterin-thymidine) and HCS (hybridoma cloning supplement). Three weeks post-fusion, supernatants were screened for antibody production by ELISA. All antibodies-secreting hybridomas demonstrating significant positivity by flow cytometry underwent two rounds of sub-cloning. Selected sub-clones were then expanded for large-scale production. Twenty-one clonal hybridoma supernatants were then purified by Protein-A affinity chromatography.

Flow cytometry

Determination of selectivity was performed by flow cytometry using isogenic cell lines originating from MDA-MB-231 cells, expressing either DR4 or DR5 or none (DKO) of these receptors¹². Flow cytometric analyses were performed using either hybridoma supernatants or purified antibodies. Hybridoma supernatants were screened on parental HCT116 and HCT116-DKO cells. Purified antibodies were screened on MDA-MB-231-DKO, MDA-MB-231-DKO^{recDR4} and MDA-MB-231-DKO^{recDR5} cells. Cells were collected from culture flasks, washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS, Sigma), and dispatched in FACS tubes at 10^5 cells per condition. Hybridoma supernatants were screened neat, and purified

antibodies were diluted 1/100th in PBS containing 3% FBS (foetal bovin serum). Samples were added to cells and incubated at 4°C for 30-60 min. Tubes were then centrifuges and washed with PBS. Cells were then incubated at 4°C for 30-40 min with AF488-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) diluted 1/200th in PBS containing 3% FBS and washed prior analysis by flow cytometry using a FACS-CANTO flow cytometer (BD Bioscience). Analysis were next performed using the FlowJo software.

Affinity determination

The affinity and cross-reactivity were determined using an Octet Red system and anti-human IgG quantification (AHQ) biosensors (FortéBIO, St Germain en Laye, France). All reagents were prepared in binding buffer (TRIS-NaOH 0.1 M, pH7,4). Recombinant DR4-Fc and DR5-Fc were prepared at 5 µg/mL in binding buffer, fixed to the biosensor then put in contact with the antibody of interest. The assay plate was agitated at 1000 rpm at 30°C. Two columns (8 each) of biosensors were pre-hydrated in binding buffer for 10 min. Anti-hIgG biosensors were baselined for 180 s before and after loading of recombinant DR4-Fc or DR5-Fc (800 s). The binding kinetics were measured by dipping loaded biosensors (120 s) in varying concentrations of mAbs (from 500 nM to 15 nM). Next, dissociation was recorded for an additional 600 s. Interactions were monitored during association and dissociation period. Biosensors were then regenerated with three cycles of 5 secs in regeneration buffer (citrate-NaOH pH2.5) followed by neutralization in binding buffer. The data were fit to a 1:1 binding stoichiometric model. All octet experiments were designed and analysed with FortéBio data acquisition software (7.1) and Data Analysis Software version 7.1.0.36 with Savitsky-Golay filtering to reduce noise. The data were adjusted with the version 5 of the GraphPad software.

Viability and apoptosis assays

Effects of mAbs of interest were measured on HCT116, MDA-MB-231 and BL2 cells. Viability was determined using Methylene Blue assay as described earlier³¹. HCT116 or MDA-MB-231 (5×10^4) in combination with cascade dilutions of treatments (mAbs alone, TRAIL alone and an isoconcentrations of combined mAbs and TRAIL) starting from 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were plated into 96-well plates and allowed to overnight incubation at 37°C. Supernatants containing or not dead cells were discarded, wells were washed with PBS and remaining adherent cells were fixed with methanol. After 15 min incubation, methanol was discarded, dried, and cells were stained using methylene blue for 15 min at room temperature. Stained cells were extensively washed, and plates were dried for 2 h at 37°C. Subsequently, methylene blue was eluted with HCl 0.1 M and absorbance was measured at 630 nm using the Asys UVM 340 microplate reader from Biochrom (Cambridge, UK). Percentage of cell viability versus medium was calculated relative to non-stimulated cells, corresponding to 100% survival. Apoptosis induced by mAbs combined or not to TRAIL was quantified by allophycocyanin Annexin V-FITC and 7-AAD staining, according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences), and analysed by flow cytometry (FACS LSRII). BL2 cells were plated at 2×10^5 cells/mL in 24-well plates and incubated with mAbs at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ alone or in combination with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TRAIL for 20 h. Prior treatments, corresponding wells were treated with 10 μM of Q-VD-Oph (Selleckchem), a caspase inhibitor, for 30 min at 37°C. MDA-MB-231 cells were plated at 2×10^6 cells/mL in T25 mm² flasks and incubated with mAbs at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ alone or combined to 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TRAIL for 8 h. To test the activity of mAb-C#16, in human cancer cell lines, BL2, H1703, HCT116 and MDA-MB-231 cells were plated at 2×10^5 cells/mL in 24-well plates and incubated with a dilution of mAb-C#16 ranging from 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h. All above mentioned experiments were repeated at least three times.

Immunoblot analyses

Dot blots were performed using purified recombinant DR4 and DR5. Soluble receptors, denatured or not in the presence of DTT for 5 min at 95°C, were deposited onto nitrocellulose membranes and dried for 15 min. Membranes were then blocked in PBS-T (PBS, 0.5% Tween 20) containing 5% non-fat dry milk (PTM) for 1 hour and incubated with anti-DR4 and anti-DR5 antibodies diluted 1/1000th overnight at 4°C. The next day after, the membranes were washed three times with PBS-T and the binding was detected with an anti-mouse IgG (H+L) – HRP antibody. For immunoblots, BL2, H1703, HCT116 or MDA-MB-231 cells were put at 1×10^6 cells/mL in 25 cm² flasks and incubated with mAbs at 5 µg/mL or 1 µg/mL alone or in combination with 1 µg/mL of TRAIL for a final volume of 10 mL. Supernatants and cells were collected 8h later and cell lysates were prepared using NP40 lysis buffer containing 1% NP40, 20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol and a proteinase inhibitor cocktail (Roche, Meylan, France). Cell extracts were run on 12% SDS PAGE gels. Proteins were transferred to nitrocellulose membrane (Bio-Rad) by liquid electro-blotting using the criterion blotter apparatus (Bio-Rad). Membranes were next saturated using PTM for 1 hour and incubated with primary antibodies in PTM overnight at 4°C on a rotating machine. Washed three times with PBS-T before incubation for 1 h with horseradish peroxidase (HRP) - conjugated secondary antibodies diluted 1/10 000th in PTM, membranes were then washed three times with PBS-T and immunoreactivity detected using the chemiluminescence detection kit Western BrightQuantum kit from Advansta (Menlo Park, CA, USA).

***In vivo* assays**

Female athymic nude mice (Balb/c nu/nu) aged between seven and eight weeks were injected subcutaneously (s.c.) in the lower right flank with 1×10^7 Burkitt Lymphoma 2 cells (BL2) mixed with Matrigel (Corning). After randomization, 5 to 6 mice were injected i.p. with mAb-C#16 (10 mg/kg) or vehicle control (PBS). For pre-established xenograft tumour model, when tumour reached approximately 100 mm^3 , mice were injected with mAb-C#16 (10 mg/kg) or vehicle control (PBS) on days 16, 20, 24, 28 and 32 post BL2 inoculation. For *de novo* model, mice were injected with mAbs-C1 (10 mg/kg) or vehicle control (PBS) on days 4, 8, 12, 16, 20 and 24 post BL2 inoculation. For all groups, tumour size was measured on two axes with digital callipers every 2 days. The values were transformed into tumour volumes using the following formula: tumour volume (mm^3) = (Length x Width²)/2. Mice were euthanized when the tumour reached 1500 mm^3 or at the end of the experiment (day 34).

Statistical analysis

Unless specified, statistical analyses were conducted with GraphPad software by comparing two group by paired-t test and all the groups with each other using analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's post-test. For all tests, only data resulting in P values < 0.05 were regarded as statistically significant.

Results

Generation of anti-DR4 and -DR5 antibodies by DNA immunization

DNA immunizations were performed using a proprietary CovalAb protocol, based on previous studies³². Mice were immunized with DR4 or DR5 plasmids and immune reactivity was evaluated by ELISA on mice serum. When a good titer was obtained, spleens of selected mice were fused to obtain hybridoma cells. After 3 weeks of culture, the supernatants from the resulting hybridomas were screened by ELISA (Figure S1A). Out of this screening, several antibody-secreting clones were analysed by dot-blot and FACS analysis to determine their potential ability to bind to recombinant DR4 and/or DR5 or native receptors on parental HCT116 or isogenic MDA-MB-231 cells expressing solely DR5¹², as indicated. All antibodies targeting DR4 (Figure S1B) or DR5 (Figure S1C) exhibited positive signal for their corresponding targets. None bound MDA-MB-231-DKO cells deficient for DR4 and DR5 (Figure S1C and not shown). Of these a limited number of them was next chosen for antibody production and purification.

Characterization of purified anti-DR4 and anti-DR5 antibodies by ELISA, Dot-blot and flow cytometry

As demonstrated by ELISA, 19 hybridomas produced antibodies displaying good to excellent immune-reactivity with titers ranging from 4 to 80 ng/mL (Figure S2A). Dot blot analysis performed using recombinant DR4 or DR5, denatured or not with DTT, indicated that all antibodies generated by the DNA approach recognized specifically the native form of the protein target (Figure S2B). Consistent with this finding, analysis of their binding selectivity by flow cytometry, using MDA-MB-231-DKO, deficient for both receptors (grey histograms), as compared to isogenic cells reconstituted with either DR4 (MDA-MB-231-DKO-DR4^{rec}, bleu histograms) or DR5 (MDA-MB-231-DKO-DR5^{rec}, red histograms),

demonstrated that all these monoclonal antibodies were highly specific for their corresponding targets, namely DR4 (Figure 1A) or DR5 (Figure 1B).

Analysis of the pro-apoptotic potential of DR4 and DR5 antibodies

Given that the antibodies recognize the native form of TRAIL agonist receptors, we next investigated whether some of them might display pro-apoptotic functions. To address this question 5 anti-DR4 and 4 anti-DR5 antibodies, clones C#1, C#2, C#5, C#11, C#16 and C#21, C#22, C#23, C#24, respectively, were produced in larger quantities and evaluated, by methylene blue or annexin V staining, for their ability to induce the loss of cell viability or apoptosis in a panel of human tumour cell lines sensitive or resistant to TRAIL-induced cell death^{12, 33, 34, 35}. Remarkably, from this rather limited panel of antibodies, the monoclonal antibody targeting DR4, C#16 and the anti-DR5, C#22 were both able to inhibit, alone, in a dose dependent manner, the cell viability of the sensitive colorectal cancer cell line HCT116 (Figure 2A). This finding is particularly remarkable for such a screen, as agonist monoclonal antibodies developed, so far, against DR4 and DR5, with a few exceptions^{36, 37}, often require cross-linking agents^{13, 38, 39, 40, 41} or sensitizing drugs such as the proteasome inhibitor bortezomib⁴² to unmask their pro-apoptotic potential. None of them, however, appeared to inhibit the cell viability of the resistant breast carcinoma triple negative cell line MDA-MB-231, albeit at the highest concentrations C#16 and C#22 had a tendency to reduce the cell viability of these cells (Figure 2A). Nonetheless, and consistent with the results obtained in HCT116 cells, C#16 and C#22 were, alone and without cross-linking nor enhancer, able to induce more than 75% and 35% apoptosis respectively, in BL2 cells (Figure 2B). As expected, cell death-induced by these two antibodies in BL2 cells was selectively and significantly inhibited by the pan-caspase inhibitor Q-VD-Oph (Figure 2B). Since C#16 is the most potent antibody identified in our screen, its apoptosis inducing properties were

monitored by Annexin V staining in a larger panel of cell lines. Interestingly, C#16 induced apoptosis in a dose-dependent manner in HCT116, BL2 and the lung carcinoma H1703 cell lines, but also, although to a lesser extent, in MDA-MB-231 cells (Figure 2C). Consistent with these findings, the immunoblot analysis of caspase activation, caspase substrate cleavage or cleaved products, clearly demonstrated that C#16, through binding to DR4 is able to induce activation of the canonical extrinsic pathway (Figure 2D). Likewise, disappearance of caspase-8 proform, as well as appearance of cleaved PARP products occur in BL2, H1703 or HCT116 cells, as efficiently as cells stimulated with TRAIL (Figure 2D). The anti-DR4 monoclonal antibody C#1 was used, here, as a negative control, as even at the highest concentration, and contrary to C#16, C#1 was not able to induce the caspase cascade, nor the cleavage of endpoint products such as PARP (Figure 2D). Because C#16 was as efficient as Mapatumumab in inducing apoptosis in BL2 cells (Figure 2E), its ability to inhibit tumour growth *in vivo* was assessed in NUDE mice. For this purpose, BL2 lymphoma cells mixed with Matrigel were implanted in the right flank of NUDE mice and xenografted animals were treated or not with 5 to 6 injections of mAb-C#16 at 10 mg/kg, every 4 days, either when the tumour reached approximately 100 mm³ or 4 days after tumour implantation and randomization. The effect of C#16 in pre-established BL2 tumours was significant, leading to 30% loss of tumour growth (Figure 3A). When the antibody was injected 4 days after implantation, referred as the *de novo* experiment, the growth rate of BL2 cells was nearly 4-fold lower in mice treated with C#16 (Figure 3B). It should be noted that this anti-DR4 antibody exerted no apparent side cytotoxicity at this concentration, as the animal weight kept increasing during the experiment, irrespective of C#16 injections (Figure 3).

Both DR4- and DR5- antibodies can synergize with TRAIL to induce apoptosis

The use of recombinant TRAIL or agonist antibodies targeting DR4 or DR5 alone to treat patients suffering from cancer is unlikely to translate to the clinic due to the poor ability of these agents to trigger sufficient apoptosis alone^{3,4}. However, increasing evidence suggest that it may be possible to combine TRAIL with antibodies targeting DR4 or DR5 to induce efficient apoptosis^{13,43,44,45}. Indeed, several of the antibodies that we have produced here in this study are able to enhance TRAIL-induced apoptosis. Accordingly, and as assessed by methylene blue, combined treatments in HCT116 and MDA-MB-231 cells lines with varying concentration of TRAIL and mAbs for 16 hours revealed that 4 out of the 9 monoclonal antibodies were able to synergize with TRAIL to inhibit the cell viability of these tumour cell lines (Figure 4). More specifically, in MDA-MB-231, a TRAIL resistant cell line, two anti-DR4 (mAb C#2 and C#11) and two anti-DR5 monoclonal antibodies (mAb C#22 and C#24), potentiated apoptosis induced by TRAIL (Figure 4B). Their synergistic potential, with the exception of mAb C#11, was not observed in the TRAIL sensitive HCT116 cell line, but was also clearly evidenced in the lymphoma cell line BL2, as monitored by annexin V staining (Figure 4C, to compare with Figure 2A). TRAIL-induced apoptosis sensitizing potential of mAbs C#2, C#11, C#22 and C#24 was also confirmed in MDA-MB-231 cells by annexin V staining (Figure 4D). As shown for BL2 cells, agonist antibodies strictly enhanced apoptosis induced by TRAIL as Q-VD-Oph totally inhibited activation of the apoptotic machinery, as assessed by flow cytometry (Figure 4C). Consistent with these observations, cleavage of the effector caspase-3, as well as its substrate PARP or its cleaved products were all increased in cells stimulated with the combination as compared to cells stimulated with TRAIL or the antibodies alone (Figure 4E). Taken together, these results substantiate the finding that TRAIL-mediated cell death can significantly be enhanced both by anti-DR4 and -DR5

monoclonal antibodies, which are in the present screen mAb-C#2 and C#11, as well as mAb-C#22 and C#24, respectively.

Characterization of the antibody binding characteristics by BioLayer Interference

(BLI)

In order to assess whether it may be possible to predict the biological activity of the main DR4 and DR5 antibodies solely based on their binding characteristics, and define their affinity for their target, Bio-Layer Interferometry (BLI) was performed using DR4-Fc and DR5-Fc. The experimental curves were fitted using a 1:1 binding model to calculate the association and dissociation constant rates and K_d. All tested antibodies bound specifically to their corresponding receptor in a dose-dependent manner (Figure 5A) and, irrespective of whether they target DR4 or DR5, they displayed high affinity with K_Ds ranging from 20 pM to ~2 nM (Figure 5B). Despite the fact that the affinity of some of the generated antibodies is stronger than TRAIL affinity for its cognate receptors²⁹, such as C#16, C#21 and C#24, none of them exhibited inhibitory activity, suggesting that their binding likely involves distinct amino acids as compared to TRAIL. The anti-DR4 antibody C#5, is probably an exception as it was found experimentally to be able to inhibit, albeit to a low extent, TRAIL-induced cell death (not shown). Its poor efficacy may be explained by its lower binding affinity to DR4, as compared to TRAIL, 130 vs 50 pM²⁹, respectively. The biological activity (agonist vs enhancer) of the remaining antibodies could not be predicted solely based on their binding constants. Albeit, the agonist antibody C#16 displayed the lowest association and dissociation rates, amongst all the antibodies analysed in this study (Table 1), as illustrated with the on-off rate map (Figure 5B), neither the association and dissociation constants, nor overall affinity for a specific target could be associated with specific biological activity of DR4 or DR5 targeting antibodies. Likewise, antibodies exhibiting TRAIL-induced

apoptosis enhancing activity, were found to display substantial differences of affinity for their target, ranging from 20 to 1740 pM (Table 1, and Figure 5B). The biological properties of these antibodies are more likely due to specific recognition of the target in its native form. Whatsoever, our work provides strong evidence that DNA immunisation is a method of choice for the generation of therapeutic antibodies.

Discussion

Given that cancer cells generally overexpress DR4 and DR5^{46, 47, 48, 49} and that, for a reason that still needs to be defined, signal transduction of apoptosis induced by these receptors appears to be fairly selective for tumour cells^{1, 8, 50}, targeting TRAIL agonist receptors remains an interesting strategy in current anticancer drug development⁵¹. Because these receptors represent easy to reach targets, a number of TRAIL derivatives, including, recombinant TRAIL, peptidomimetics and agonistic monoclonal antibodies (mAbs) targeting TRAIL receptors, have been generated and found to be able induce apoptosis in tumour cells in preclinical models^{4, 50}. However, whereas TRAIL or its derivatives, including anti-DR4 or anti-DR5 mAbs have been reported to be safe in all animal models and well tolerated in humans, their clinical efficacy has, so far, proven to be rather limited^{3, 4, 52}.

Development of additional anti-DR4 and anti-DR5 mAbs exhibiting potent pro-apoptotic or TRAIL sensitizing activity potential could nonetheless be interesting to cure patients suffering from cancer. To achieve such an aim, we chose the genetic immunization method, that, to our knowledge has never been used to generate anti-DR4 or anti-DR5 antibodies. This approach, allowed us to generate anti-DR4 and anti-DR5 antibodies displaying high affinity and specificity for their target, respectively, with high titers. Generated antibodies were not only almost all directed against the native conformational forms of DR4 or DR5, but a high proportion of them displayed therapeutic potential, ranging from agonistic to TRAIL-enhancing activities.

Most TRAIL receptor-targeting agonist antibodies require cross-linking or immobilization of protein A or G^{53, 54}, or immunoglobulin class switch⁵⁵ to unveil their pro-apoptotic potential⁴. Indeed, albeit the vast majority of the antibodies that we have produced here

required cross-linking to trigger apoptosis (not shown), the anti-DR4 mAb C#16 or the anti-DR5 mAb C#22, could induce cell death in HCT116 and BL2, a colorectal cancer and a B cell lymphoma cell line, respectively, in the absence of cross-linking. This result is particularly interesting given the limited number of screened hybridomas. These agonist antibodies were found to trigger apoptosis selectively through DR4 or DR5 in a conventional caspase-dependent manner as demonstrated by western blot analysis.

In the breast carcinoma cell line MDA-MB-231, however, C#16 (anti-DR4) and C#22 (anti-DR5) were, alone, less efficient, due to the fact that this cell line is naturally resistant to TRAIL-induced apoptosis owing to the fact that it expresses high expression levels of the caspase-8 inhibitor cFLIP⁵⁶. It should be added here, that Mapatumumab, the only anti-DR4 assessed in the clinic, albeit as efficient as C#16 in inducing apoptosis in the BL2 cells, was also found previously to be poorly efficient in triggering apoptosis in MDA-MB-231 cells¹².

However, and consistent with recent findings highlighting the ability of anti-DR4 and anti-DR5 antibodies to increase TRAIL-apoptosis signalling^{13, 43, 55}, the anti-DR5 C#22 antibody was found to be able to enhance apoptosis induced by TRAIL in the resistant MDA-MB-231 cell line³⁴. Importantly, besides C#22, another anti-DR5 antibody C#24, as well as two anti-DR4 antibodies C#2 and mAbs-C#11, were also found to be effective in enhancing apoptosis, in the sensitive BL2 lymphoma and the MDA-MB-231 resistant cancer cell lines, when combined with TRAIL.

While it will be required to determine how these antibodies cooperate with TRAIL to increase apoptosis, these results demonstrate that genetic immunization is a method of choice to generate antibodies displaying therapeutic properties.

All of the produced anti-DR4 and anti-DR5 antibodies specifically bound to DR4 or DR5, respectively, and recognised specifically their target in a conformational manner. Consistent with a recent study showing that the antitumor effect of DR4 agonist antibodies was not correlated with affinity, *per se*, but epitope recognition⁵⁵, the kinetic parameters of the different antibodies produced and analysed in our study were not predictive of their biological properties, suggesting that they might recognize different epitopes. Henceforth, while all our antibodies bound their target with high affinity, ranging from 20 pM to 2 nM, and albeit their association constants were fairly similar, with the exception of C#16, their dissociation characteristics differed substantially from 7×10^{-7} to 4×10^{-4} (S^{-1}). Whereas clone

C#16 bound with less avidity to its target, its overall affinity was high due to its low dissociation rate. On the other hand, DR4 enhancers (mAbs-C#2 and mAbs-C#11) both associated and dissociated very rapidly to and from their target while displaying a 100-fold lower affinity as compared to C#16, respectively. On the other hand, the kinetic parameters of the anti-DR5 enhancers, mAbs C#24 and C#22 were clearly dissimilar. With a lower association constant rate as well as a lower dissociation rate these enhancers displayed a 10 to 100-fold increase in affinity as compared to DR4 enhancers. Although it remains to be determined whether C#2 and C#11 may be able to bind to the same epitope, due to their affinity constant, C#24 and C#22 are unlikely to share the same epitope since C#24, contrary to C#22, displays both agonistic and synergistic properties.

Antibodies generated here by genetic immunization are likely to be of therapeutic value. Accordingly, C#16, one of the most potent antibodies found from this screen, inhibited, alone, both pre-established and *de-novo* tumour growth *in vivo*.

Conclusion

Genetic immunization, unlike conventional approaches, is more likely to preserve the shape of the protein of interest but also their post-translational modifications, allowing not only the generation of antibodies recognizing hard to produce transmembrane proteins, but also antibodies displaying pharmacological properties. To our knowledge, this is the first time that genetic immunization has been used to generate antibodies against death receptors. Anti-DR4 and anti-DR5 antibodies generated using this DNA approach, as demonstrated here not only displayed, as expected, high affinity to their native targets, but remarkably, amongst the limited number of purified clones, 5 of them also displayed agonist or enhancing activities. Beyond TRAIL, this proof-of-concept clearly opens novel opportunities for the use of genetic immunization to generate therapeutic antibodies.

Acknowledgments: Olivier Micheau is supported by grants from the ANR (Agence Nationale de la Recherche) program “Investissements d’Avenir” Labex LipSTIC (ANR-11-LABX-0021-01), ANR grants (07-PCV-0031 and SphingoDR), the Conseil Regional de Bourgogne, the European commission FEDER (Fonds Européen de Développement Régional, BG0004892) and RISE (DISCOVER, 777995), and the foundation ARC (Association pour la Recherche sur le cancer). Agathe Dubuisson was supported by a grant from the FEDER (BG0004892).

Figures et legends

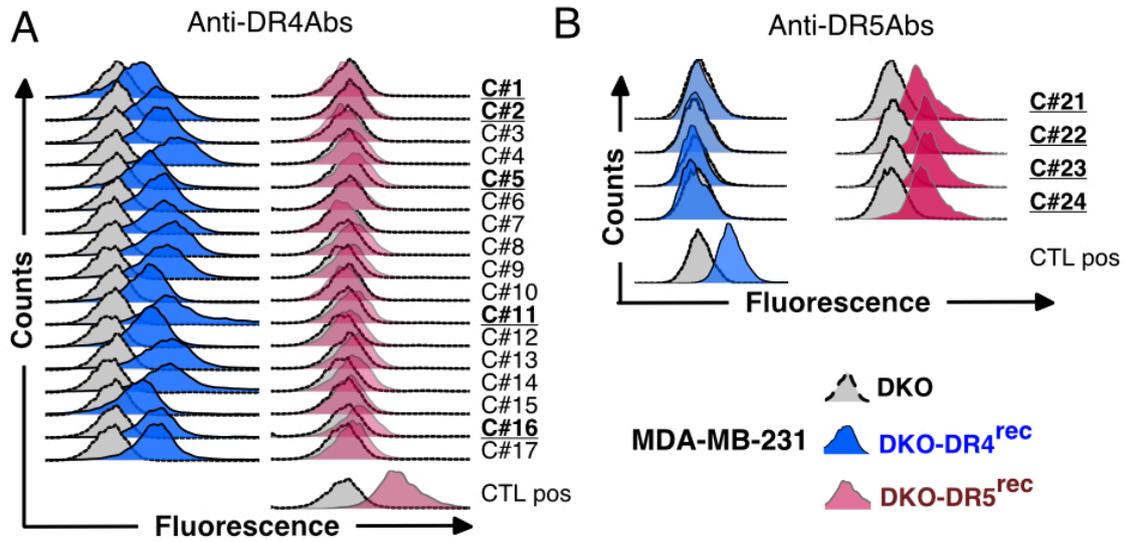


Figure 1: Cell surface receptor recognition of the produced anti-DR4 and anti-DR5 antibodies. MDA-MB-231 DKO (grey curve) and MDA-MB-231 DKO reconstituted with either DR4 (bleu curve) or DR5 (red curve) were stained with (A) anti-DR4 antibodies or (B) anti-DR5 antibodies. Primary antibodies were then detected using a AF488-conjugated mouse-specific IgG (H+L) secondary antibody and analysed by flow cytometry.

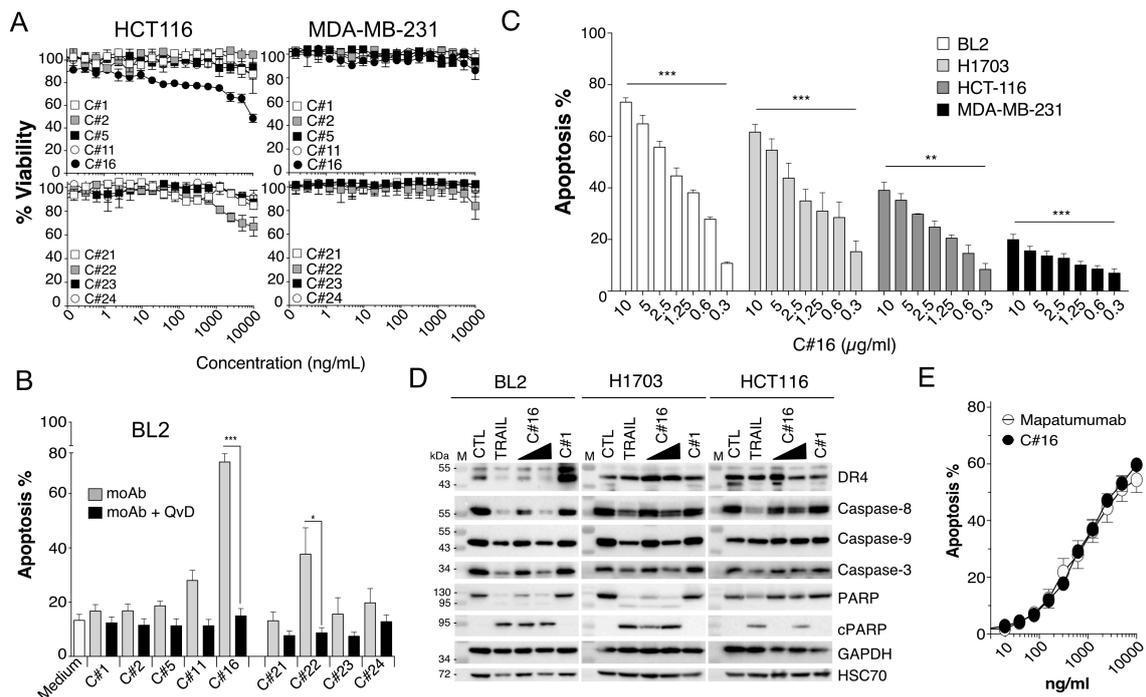


Figure 2: Apoptosis induced by anti-DR4 or -DR5 antibodies. (A) Viability of HCT-116 and MDA-MB-231 were determined using methylen blue, 16 h after treatment with increasing concentrations of anti-DR4 (mAb-C#1, C#2, C#5, C#11 and C#16) or anti-DR5 mAbs (mAb-C#21, C#22, C#23 and C#24). Values are means \pm SD (n=3). (B) The B lymphoma cell line, BL2, was pre-incubated or not for 30 min at 37°C with 10 μ M of Q-VD-Oph prior treated for 20 h with 10 μ g/mL of mAbs. Cells were then stained with Annexin V / 7AAD and apoptosis was quantified by flow cytometry. (C) BL2, H1703, HCT116 and MDA-MB-231 cell lines were treated with increasing concentrations of mAb C#16, and apoptosis was quantified as above by flow cytometry. (D) BL2, H1703 and HCT116 cells were stimulated with 1 μ g/mL of TRAIL, 1 μ g/mL of mAbs C#16, 5 μ g/mL mAbs C#16 or 5 μ g/mL mAbs C#1 for 8 h and corresponding cell extracts were analysed by immunoblot. (E) The BL2 lymphoma cell line was treated with increasing concentration of mAb C#16 or Mapatumumab, and apoptosis was quantified with Annexin V / 7AAD staining by flow cytometry. All values are presented here \pm SD (n=3). Significance was evaluated by ANOVA tests. ** p < 0.05, *** p < 0.01.

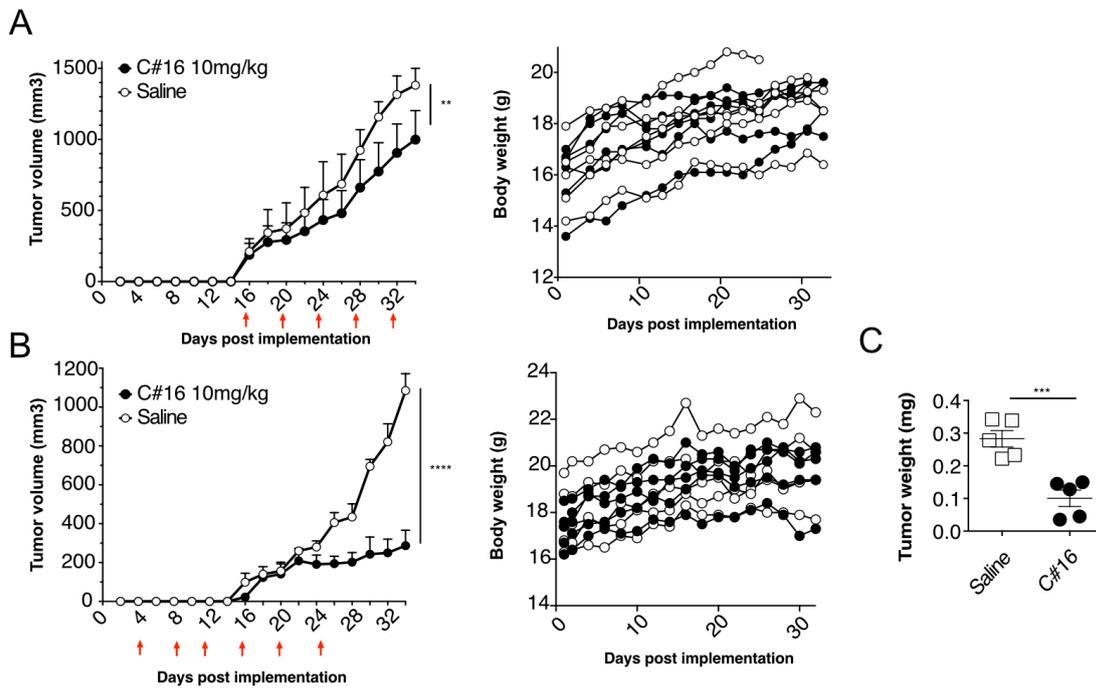


Figure 3: mAbs C#16 reduces tumour growth in xenograft models. BL2 cells mixed with Matrigel were inoculated into the right flank of mice s.c. at day 0. Mice were then randomized into groups of five to six mice and were injected i.p. with mAb-C#16 (10 mg/kg) or vehicle control (PBS) at the indicated times (red arrows). Each time point represents the mean value (+/- s.e.m) of the tumour sizes on the day of measurement. The animals were sacrificed 34 days post inoculation. **(A)** Pre-established xenograft tumour growth and corresponding mouse body weight. Significativity was evaluated by ANOVA tests. ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$. **(B)** *De-novo* model tumor growth and corresponding mouse body weight. Significativity was evaluated by ANOVA tests. ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$. **(C)** Comparison of tumour weights from *de-novo* model between mice injected with saline and mice injected with mAb-C#16 (10 mg/kg). Significance was tested using unpaired t-test.

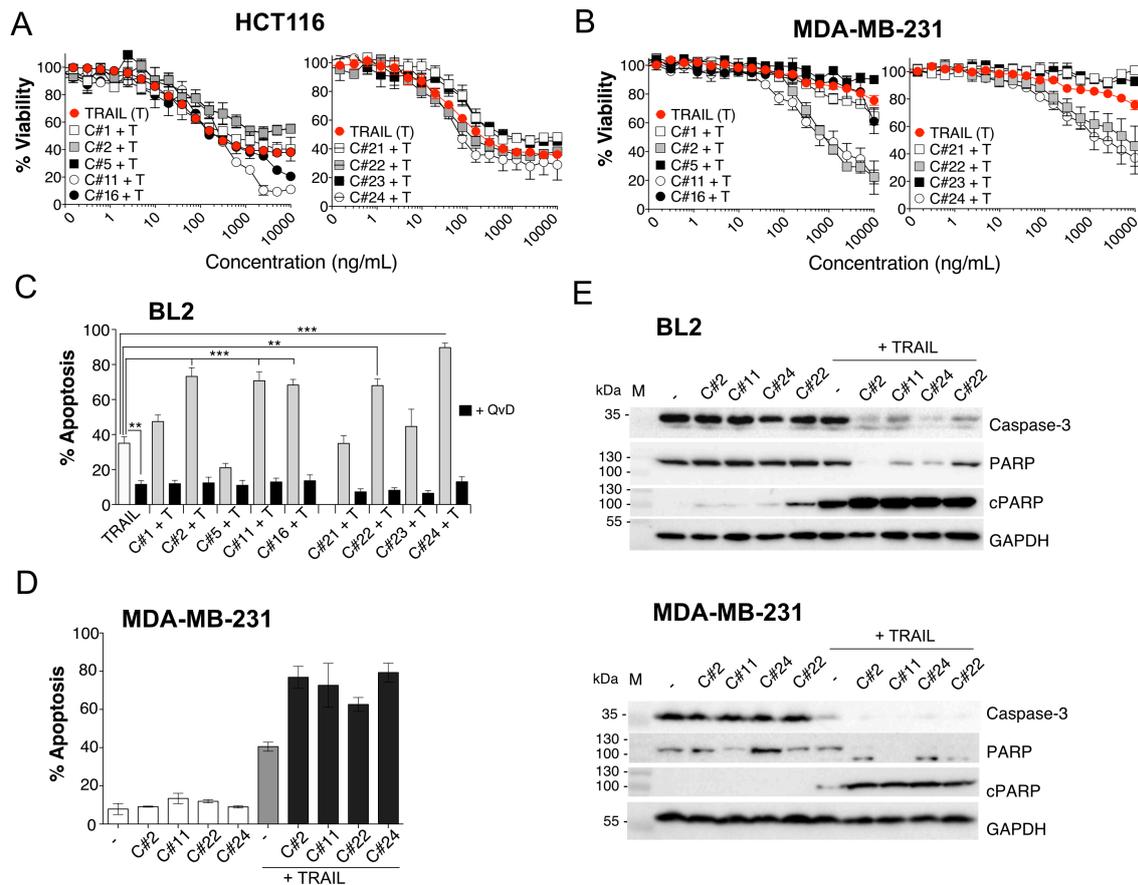


Figure 4: mAbs treatments can potentiate TRAIL action. Viability of (A) HCT-116 and (B) MDA-MB-231 were determined using methylen blue tests. Cell lines were treated for 16h with indicated concentration of DR4-mAbs (above) or DR5-mAbs (below) in combination with soluble TRAIL. Values are means \pm SD (n=3). (C) BL2 cell line was treated in 24-well plates for 20h with 1 μ g/mL of soluble TRAIL or with a combination of 10 μ g/mL of mAbs and 1 μ g/mL of soluble TRAIL. When indicated, 10 nM of Q-VD-Oph was added prior treatment for 30 min at 37°C. Supernatant and cells were harvested and apoptosis was detected via Annexin V – FITC / 7AAD binding by flow cytometry. Significativity was evaluated by ANOVA tests with the means values \pm SD (n=3) ** p < 0.05, *** p<0.01 (D) MDA-MB-231 cell line was treated with 5 μ g/mL of mAbs C#2, mAbs C#11, mAbs C#22 and mAbs C#23 and in combination with 1 μ g/mL of TRAIL. Supernatant and cells were harvested and apoptosis was detected via Annexin V – APC / 7AAD binding by flow cytometry. Significativity was evaluated by ANOVA tests and p > 0,05. (E) BL2 and MDA-MB-231 stimulated for 8h with 5 μ g/mL of mAbs C#2, mAbs C#11, mAbs C#22 and mAbs C#23 and in combination with 1 μ g/mL of TRAIL were used for western blot investigation. Cleavage of effector caspase-3 and PARP-1 were analyzed in whole-cell lysates by western-blot. GaPDH and HSC-70 were used as a gel-loading control.

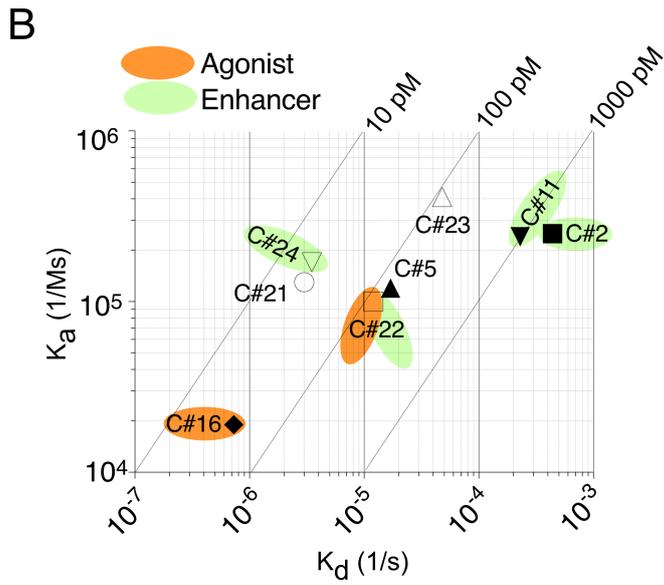
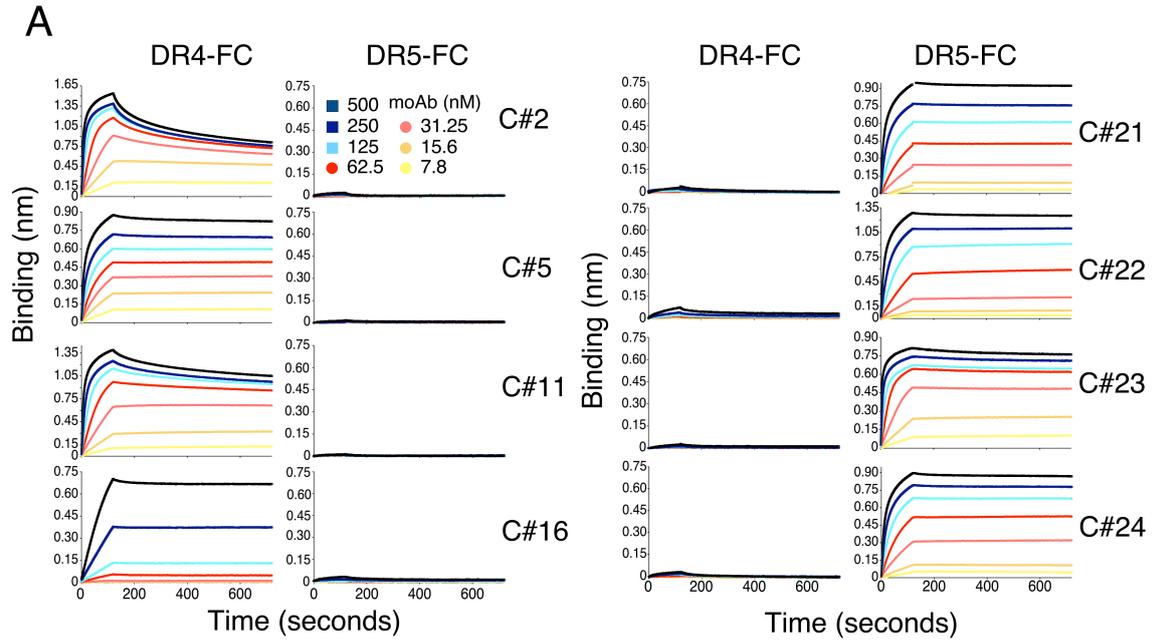
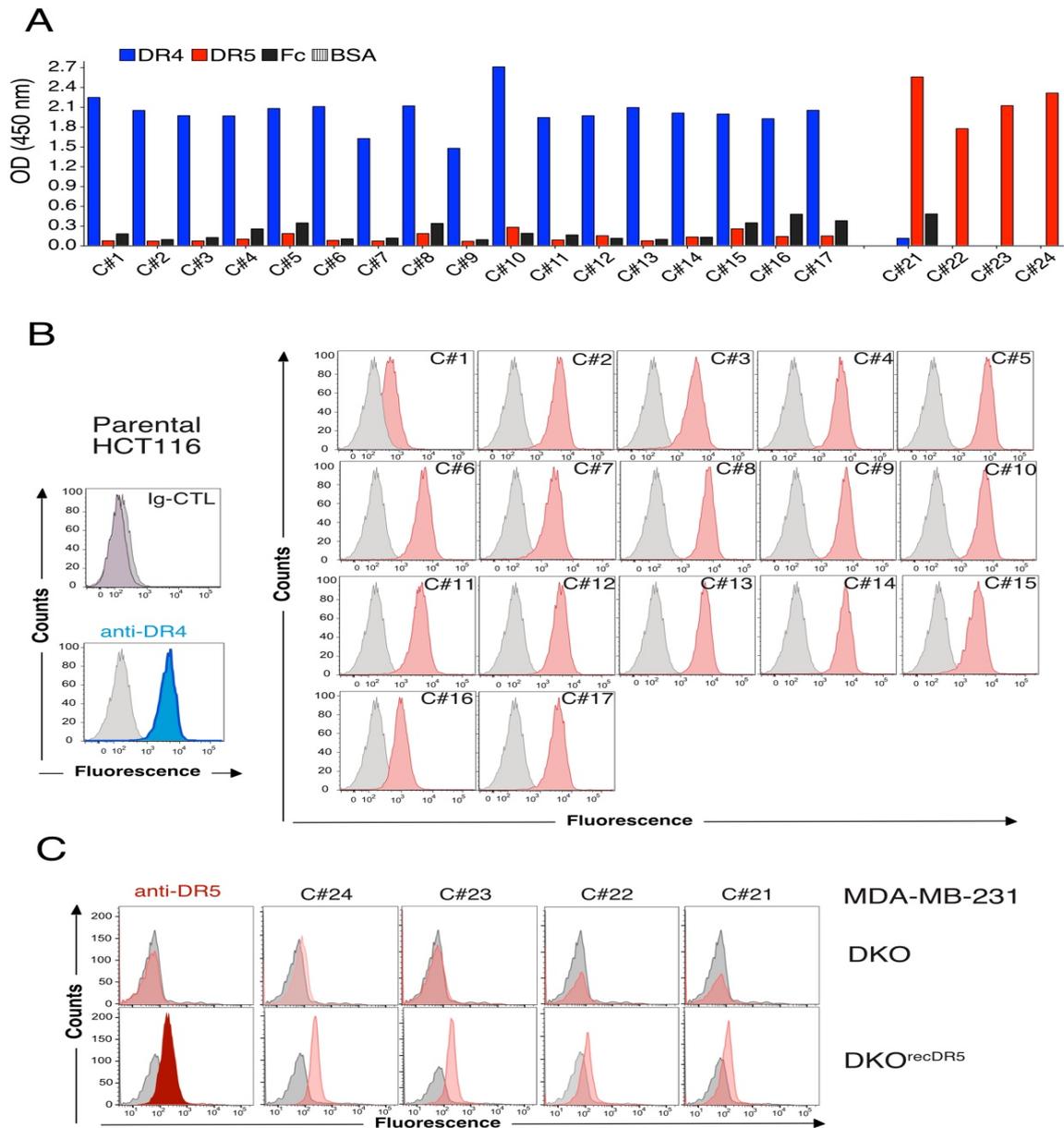


Figure 5 : Affinity evaluation of mAbs. (A) The binding profile of mAbs towards DR4-Fc and DR5-Fc was determined by biolayer interferometry (BLI) assay. The colored lines represent the binding response signal at various mAbs concentration (from 500 nM to 7.8 nM) against DR4-Fc or DR5-Fc. Binding of mAbs were monitored in real time to obtain on (Ka) and off (Koff) rates. Association was measured for 120 sec while dissociation was measured for 600 sec. The equilibrium constant (Kd) was calculated as K_{off}/K_a using 1:1 binding stoichiometric model. (B) On-off rate map indicating the binding kinetics parameters of anti-DR4 and anti-DR5 antibodies. The association rate constant (Ka) is plotted against the dissociation rate constant (Kd). The diagonal lines indicate the equilibrium dissociation constant (KD). Agonists antibodies (mAbs-C#16 and mAbs-C22) are shown in orange and enhancers (mAbs-C#2, mAbs-C#11, mAbs-C22 and mAbs-C24) are shown in green.

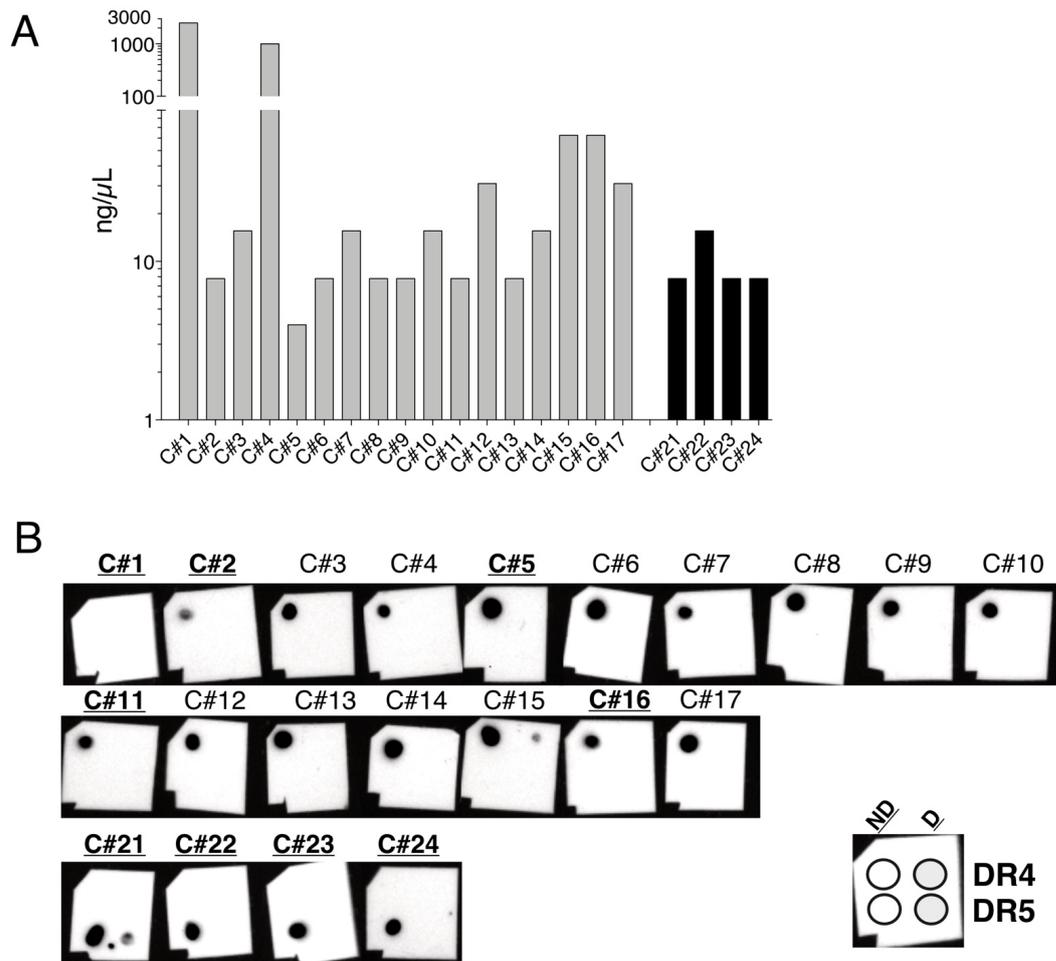
Table 1: Kinetics parameters of DR4- and DR5- antibodies towards DR4-Fc and DR5-Fc using BLI. Equilibrium binding constants (KD), and association (kon) and dissociation (koff) rates were determined using Bio-Layer Interferometry (BLI) using 1:1 binding kinetics, for binding of agonistics antibodies (mAbs-C#16 and mAbs-C22) and enhancers antibodies (mAbs-C#2, mAbs-C#11, mAbs-C22 and mAbs-C24) to soluble recombinant versions of DR4 or DR5 fused to the constant fraction of human gamma-immunoglobulin.

	C#2	C#5	C#11	C#16	C#21	C#22	C#23	C#24
KD	1,74E-09	1,3E-10	9,32E-10	3,8E-11	2,3E-11	1,01E-10	1,18E-10	2,05E-11
Kon	2,5E+05	2,4E+05	1,2E+05	1,9E+04	1,3E+05	1E+05	4,1E+05	1,7E+05
Koff	4,4E-04	2,2E-04	2,3E-06	7,3E-07	3E-06	1,2E-06	4,8E-05	3,5E-06
X2	1,12	0,637	0,629	0,035	0,116	0,507	0,223	0,204
R2	0,99216	0,99872	0,99644	0,99997	0,99928	0,99934	0,99896	0,99903

Supplementary figures:



Supplementary Figure 1: Screening of hybridomas supernatants and produced monoclonal antibodies (A) ELISA results for hybridomas supernatant. Hybridomas supernatant were diluted half and tested on recombinant cDR4, cDR5, Fc and BSA. Higher dilutions represent better titer. HCT116 WT were stained with (B) supernatants of selected anti-DR4 (red curve) and (C) supernatants of selected anti-DR5 (red curve) compare to control isotype (grey curve). Hybridoma supernatants were then detected using a AF488-conjugated mouse-specific IgG (H+L) secondary antibody and analysed by flow cytometry.



Supplementary Figure 2 : Characterisation of produced monoclonal anti-DR4 and anti-DR5 (A) ELISA results for purified antibody titers. Purified antibodies were diluted in cascade from 500 ng/mL on recombinant DR, Fc and BSA. Titer correspond to the last dilution with a DO equal or above 1. The lowest concentration represents thus best titer. (B) Recognition of purified antibodies of non-denaturated form (left) and denaturated forms (right) of recombinant cDR4 (above) and cDR5 (below) were evaluated by dot blot. 150 ng/μl of cDR4 and cDR5 were denaturated using 10% of 1M DTT (dithiothreitol) and heated at 95°C for 5 min. 1μl of resulted non-denaturated and denaturated recombinant proteins were adhered to nitrocellulose membrane. After blocking with milk, 1μg/mL of purified antibody were added and, after secondary anti-mouse IgG (H+L) – HRP (1/10 000) binding, recognition was evaluated by chemoluminescence.

Bibliography

1. French LE, Tschopp J. The TRAIL to selective tumor death. *Nat Med* 1999, **5**(2): 146-147.
2. Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, *et al.* Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 1999, **5**(2): 157-163.
3. Micheau O, Shirley S, Dufour F. Death receptors as targets in cancer. *Br J Pharmacol* 2013, **169**(8): 1723-1744.
4. Dubuisson A, Micheau O. Antibodies and Derivatives Targeting DR4 and DR5 for Cancer Therapy. *Antibodies* 2017, **6**(4).
5. Leng Y, Hou J, Jin J, Zhang M, Ke X, Jiang B, *et al.* Circularly permuted TRAIL plus thalidomide and dexamethasone versus thalidomide and dexamethasone for relapsed/refractory multiple myeloma: a phase 2 study. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2017, **79**(6): 1141-1149.
6. Leng Y, Qiu L, Hou J, Zhao Y, Zhang X, Yang S, *et al.* Phase II open-label study of recombinant circularly permuted TRAIL as a single-agent treatment for relapsed or refractory multiple myeloma. *Chin J Cancer* 2016, **35**(1): 86.
7. Berg D, Lehne M, Muller N, Siegmund D, Munkel S, Sebald W, *et al.* Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L. *Cell Death Differ* 2007, **14**(12): 2021-2034.
8. Pavet V, Beyrath J, Pardin C, Morizot A, Lechner M-C, Briand J-P, *et al.* Multivalent DR5 peptides activate the TRAIL death pathway and exert tumoricidal activity. *Cancer research* 2010, **70**: 1101-1110.
9. Zakaria AB, Picaud F, Rattier T, Pudlo M, Saviot L, Chassagnon R, *et al.* Nanovectorization of TRAIL with Single Wall Carbon Nanotubes Enhances Tumor Cell Killing. *Nano letters* 2015, **15**(2): 891-895.
10. Bodmer JL, Holler N, Reynard S, Vinciguerra P, Schneider P, Juo P, *et al.* TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nature cell biology* 2000, **2**(4): 241-243.
11. Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. *The Journal of biological chemistry* 1998, **273**(5): 2926-2930.
12. Dufour F, Rattier T, Constantinescu AA, Zischler L, Morle A, Ben Mabrouk H, *et al.* TRAIL receptor gene editing unveils TRAIL-R1 as a master player of

apoptosis induced by TRAIL and ER stress. *Oncotarget* 2017, **8**(6): 9974-9985.

13. Graves JD, Kordich JJ, Huang TH, Piasecki J, Bush TL, Sullivan T, *et al.* Apo2L/TRAIL and the Death Receptor 5 Agonist Antibody AMG 655 Cooperate to Promote Receptor Clustering and Antitumor Activity. *Cancer Cell* 2014, **26**(2): 177-189.
14. Piao X, Ozawa T, Hamana H, Shitaoka K, Jin A, Kishi H, *et al.* TRAIL-receptor 1 IgM antibodies strongly induce apoptosis in human cancer cells in vitro and in vivo. *Oncoimmunology* 2016, **5**(5): e1131380.
15. Dimitrov DS, Marks JD. Therapeutic antibodies: current state and future trends--is a paradigm change coming soon? *Methods in molecular biology* 2009, **525**: 1-27, xiii.
16. Peng H, Nerreter T, Chang J, Qi J, Li X, Karunadharm P, *et al.* Mining Naive Rabbit Antibody Repertoires by Phage Display for Monoclonal Antibodies of Therapeutic Utility. *J Mol Biol* 2017, **429**(19): 2954-2973.
17. Shim H. Therapeutic Antibodies by Phage Display. *Current pharmaceutical design* 2016, **22**(43): 6538-6559.
18. Yang DH, Makhmoudova A, Arif BM, Feng Q, Retnakaran A, Palli SR, *et al.* DNA versus protein immunisation for production of monoclonal antibodies against *Choristoneura fumiferana* ecdysone receptor (CfEcR). *Vaccine* 2006, **24**(16): 3115-3126.
19. Chow MKM, Amin AA, Fulton KF, Fernando T, Kamau L, Batty C, *et al.* The REFOLD database: a tool for the optimization of protein expression and refolding. *Nucleic acids research* 2006, **34**(Database issue): D207-212.
20. Zhang C, Jin K, Xiao Y, Cheng Y, Huang Z, Wang S, *et al.* Potent monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxin A elicited by DNA immunization. *Human vaccines & immunotherapeutics* 2013, **9**(10): 2157-2164.
21. Acsadi G, Dickson G, Love DR, Jani A, Walsh FS, Gurusinghe A, *et al.* Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* 1991, **352**(6338): 815-818.
22. Nabel EG, Plautz G, Nabel GJ. Site-specific gene expression in vivo by direct gene transfer into the arterial wall. *Science (New York, N Y)* 1990, **249**(4974): 1285-1288.
23. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, *et al.* Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993, **259**(5102): 1745-1749.

24. Tang DC, DeVit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992, **356**(6365): 152-154.
25. Ni Y, Ma K, Ni J, Zheng X, Wang Y, Xiong S. A rapid and simple approach to preparation of monoclonal antibody based on DNA immunization. *Cellular & molecular immunology* 2004, **1**(4): 295-299.
26. Schneider P. Production of recombinant TRAIL and TRAIL receptor: Fc chimeric proteins. *Methods Enzymol* 2000, **322**: 325-345.
27. Lalaoui N, Morle A, Merino D, Jacquemin G, Iessi E, Morizot A, *et al.* TRAIL-R4 promotes tumor growth and resistance to apoptosis in cervical carcinoma HeLa cells through AKT. *PLoS One* 2011, **6**(5): e19679.
28. Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 1991, **108**(2): 193-199.
29. Dufour F, Rattier T, Shirley S, Picarda G, Constantinescu AA, Morle A, *et al.* N-glycosylation of mouse TRAIL-R and human TRAIL-R1 enhances TRAIL-induced death. *Cell Death Differ* 2017, **24**(3): 500-510.
30. Galfre G, Howe SC, Milstein C, Butcher GW, Howard JC. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 1977, **266**(5602): 550-552.
31. Dimanche-Boitrel MT, Pelletier H, Genne P, Petit JM, Le Grimellec C, Canal P, *et al.* Confluence-dependent resistance in human colon cancer cells: role of reduced drug accumulation and low intrinsic chemosensitivity of resting cells. *Int J Cancer* 1992, **50**(5): 677-682.
32. Hazen M, Bhakta S, Vij R, Randle S, Kallop D, Chiang V, *et al.* An improved and robust DNA immunization method to develop antibodies against extracellular loops of multi-transmembrane proteins. *MAbs* 2014, **6**(1): 95-107.
33. Toscano F, El Fajoui Z, Gay F, Lalaoui N, Parmentier B, Chayvialle J-A, *et al.* p53-mediated upregulation of DcR1 impairs oxaliplatin/TRAIL-induced synergistic anti-tumour potential in colon cancer cells. *Oncogene* 2008, **27**(30): 4161-4171.
34. Morle A, Garrido C, Micheau O. Hyperthermia restores apoptosis induced by death receptors through aggregation-induced c-FLIP cytosolic depletion. *Cell death & disease* 2015, **6**.
35. Morizot A, Merino D, Lalaoui N, Jacquemin G, Granci V, Iessi E, *et al.* Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level. *Cell death and differentiation* 2011, **18**(4): 700-711.

36. Sung ES, Park KJ, Lee SH, Jang YS, Park SK, Park YH, *et al.* A novel agonistic antibody to human death receptor 4 induces apoptotic cell death in various tumor cells without cytotoxicity in hepatocytes. *Mol Cancer Ther* 2009, **8**(8): 2276-2285.
37. Motoki K, Mori E, Matsumoto A, Thomas M, Tomura T, Humphreys R, *et al.* Enhanced apoptosis and tumor regression induced by a direct agonist antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2. *Clin Cancer Res* 2005, **11**(8): 3126-3135.
38. Kang Z, Chen JJ, Yu Y, Li B, Sun SY, Zhang B, *et al.* Drozitumab, a human antibody to death receptor 5, has potent antitumor activity against rhabdomyosarcoma with the expression of caspase-8 predictive of response. *Clin Cancer Res* 2011, **17**(10): 3181-3192.
39. Piechocki MP, Wu GS, Jones RF, Jacob JB, Gibson H, Ethier SP, *et al.* Induction of proapoptotic antibodies to triple-negative breast cancer by vaccination with TRAIL death receptor DR5 DNA. *Int J Cancer* 2012, **131**(11): 2562-2572.
40. Huet HA, Growney JD, Johnson JA, Li J, Bilic S, Ostrom L, *et al.* Multivalent nanobodies targeting death receptor 5 elicit superior tumor cell killing through efficient caspase induction. *mAbs* 2014, **6**(6): 1560-1570.
41. Nagane M, Shimizu S, Mori E, Kataoka S, Shiokawa Y. Predominant antitumor effects by fully human anti-TRAIL-receptor 2 (DR5) monoclonal antibodies in human glioma cells in vitro and in vivo. *Neuro-oncology* 2010, **12**(7): 687-700.
42. Luster TA, Carrell JA, McCormick K, Sun D, Humphreys R. Mapatumumab and lexatumumab induce apoptosis in TRAIL-R1 and TRAIL-R2 antibody-resistant NSCLC cell lines when treated in combination with bortezomib. *Mol Cancer Ther* 2009, **8**(2): 292-302.
43. Tuthill MH, Montinaro A, Zinngrebe J, Prieske K, Draber P, Prieske S, *et al.* TRAIL-R2-specific antibodies and recombinant TRAIL can synergise to kill cancer cells. *Oncogene* 2015, **34**(16): 2138-2144.
44. Hao Z, Han X, Sun X, Shen M, Huang J, Li Y, *et al.* Fully human monoclonal antibodies to TRAIL-R1 enhance TRAIL-induced apoptosis via activation of caspase-8 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2016, **475**(2): 238-244.
45. Guo L, Sun X, Hao Z, Huang J, Han X, You Y, *et al.* Identification of Novel Epitopes with Agonistic Activity for the Development of Tumor Immunotherapy Targeting TRAIL-R1. *J Cancer* 2017, **8**(13): 2542-2553.
46. Ganten TM, Sykora J, Koschny R, Batke E, Aulmann S, Mansmann U, *et al.* Prognostic significance of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing

ligand (TRAIL) receptor expression in patients with breast cancer. *J Mol Med* 2009, **87**(10): 995-1007.

47. Macher-Goeppinger S, Aulmann S, Tagscherer KE, Wagener N, Haferkamp A, Penzel R, *et al.* Prognostic value of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors in renal cell cancer. *Clin Cancer Res* 2009, **15**(2): 650-659.
48. Min YJ, Lee JH, Choi SJ, Chi HS, Lee JS, Kim WK, *et al.* Prognostic significance of Fas (CD95) and TRAIL receptors (DR4/DR5) expression in acute myelogenous leukemia. *Leukemia research* 2004, **28**(4): 359-365.
49. Bavi P, Prabhakaran SE, Abubaker J, Qadri Z, George T, Al-Sanea N, *et al.* Prognostic significance of TRAIL death receptors in Middle Eastern colorectal carcinomas and their correlation to oncogenic KRAS alterations. *Molecular cancer* 2010, **9**: 203.
50. Ashkenazi A, Holland P, Eckhardt SG. Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *J Clin Oncol* 2008, **26**(21): 3621-3630.
51. Wajant H. Principles of antibody-mediated TNF receptor activation. *Cell death and differentiation* 2015, **22**(11): 1727-1741.
52. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, *et al.* Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 1999, **104**(2): 155-162.
53. Kaplan-Lefko PJ, Graves JD, Zoog SJ, Pan Y, Wall J, Branstetter DG, *et al.* Conatumumab, a fully human agonist antibody to death receptor 5, induces apoptosis via caspase activation in multiple tumor types. *Cancer Biology & Therapy* 2010, **9**(8): 618-631.
54. Takeda K, Yamaguchi N, Akiba H, Kojima Y, Hayakawa Y, Tanner JE, *et al.* Induction of Tumor-specific T Cell Immunity by Anti-DR5 Antibody Therapy. *J Exp Med* 2004, **199**(4): 437-448.
55. Piao XH, Ozawa T, Hamana H, Shitaoka K, Jin AS, Kishi H, *et al.* TRAIL-receptor 1 IgM antibodies strongly induce apoptosis in human cancer cells in vitro and in vivo. *Oncoimmunology* 2016, **5**(5).
56. Morle A, Garrido C, Micheau O. Hyperthermia restores apoptosis induced by death receptors through aggregation-induced c-FLIP cytosolic depletion. *Cell death & disease* 2015, **6**: e1633.

Annexe I

Curriculum Vitae

AGATHE DUBUISSON

Ingénieure-Doctorante en Immuno-oncologie



PROFIL

Passionnée de R&D en immuno-oncologie, je suis à la recherche active d'un poste.

Disponibilité : fin d'année 2018

Mon objectif : Chef de Projet R&D ou Chercheur.

 dubuisson.agathe91@gmail.com

 0033671376699

 1 place du Rosoir 21000

 01/10/1991 (26 ans)

 Française

COMPETENCES

Anticorps (AcMs)	● ● ● ● ●
Recherche <i>in-vitro</i>	● ● ● ● ●
Recherche <i>in-vivo</i>	● ● ● ● ●
Adaptabilité	● ● ● ● ●
Communication	● ● ● ● ●
Equipe	● ● ● ● ●

LANGUES

Français	Maternelle
Anglais	Bilingue
Espagnol	Courant
Russe	Notions

INTERETS

Musique, voyages, sport

EXPERIENCES

Doctorante en développement d'anticorps monoclonaux thérapeutiques (AcMs)

INSERM U1231 – Université de Bourgogne Franche-Comté (Dijon) / Covalab | 2015 – aujourd'hui
Développement d'AcMs anticancéreux induisant l'apoptose. Développement *in-vitro* et *in-vivo*.

- Immunisation par ADN et screening d'anticorps à partir d'hybridomes.
- Tests caractéristiques et fonctionnels (reconnaissance, affinité, évaluation de l'apoptose).
- Sélection et caractérisation de 5 anticorps d'intérêt.

Revue : Dubuisson, A. Micheau, O; Antibodies and Derivatives Targeting DR4 and DR5 for Cancer Therapy. *Antibodies* **2017**, 6, 16.

Article : en révision dans la revue *Cell Death and Disease*

Stagiaire Recherche sur la caractérisation d'anticorps anti-CD160-TM

INSERM U976 – Hôpital Saint Louis (Paris) | Janvier – Juillet 2015

Recherche et caractérisation d'anticorps ciblant le CD160-TM, cible potentielle pour le traitement des lymphômes NK/T.

- Screening d'anticorps à partir de cellules transfectées.
- Analyse par Western Blot (WB), cytométrie en flux (FACS) et PCR.

Stagiaire Analyse des différents modes de R&D des nouveaux agents pharmaceutiques

Institute of Pharmaceutical Science – King's College London (Londres) | Avril – Juillet 2014

- Recherche bibliographique, synthèse et analyse des différentes méthodes de R&D de nouveaux agents pharmaceutiques commercialisés au cours des 5 années précédentes.
- Classification et analyse de chaque méthode selon le temps, le coût et la probabilité d'aboutir à une AMM.

CONFERENCES

Forum des Jeunes Chercheurs ED ES - Dijon - Juin 2017

European Association for Cancer Research (EACR) conference - Amsterdam - Fev 2018

A matter of Life and Death : from basic cell death mechanisms to novel cancer treatments

Prix : EMBO Reports Poster Presentation Prize – Amsterdam Février 2018

CRI - CIMT - EATI - AACR Immunotherapy Conference - New York - Sept/Oct 2018

4th International Immunotherapy Conference : Translating Science into Survival

FORMATIONS

Dispositif Jeune Chercheur Entrepreneur

BSB / IAE – Université de Bourgogne Franche-Comté / PREMICE (Dijon) | 2015 - 2018

Thèse en collaboration avec une entreprise, avec suivi d'un MAE et formation entrepreneuriale.

Master 2 de Recherche en Immunothérapie Innovante et Vaccination

Université de Pierre & Marie-Curie (UPMC, Paris 6) | 2014 - 2015

Production et application des AcMs, immunothérapie, immunomodulation et vaccination

Master 2 de spécialisation en R&D de Biopharmaceutiques (MSc Biopharmaceuticals)

King's College London (3ème au classement 2014 QS World Ranking by Subject) | 2013 - 2014

Analyse et délivrance de biomolécules, R&D des biopharmaceutiques. Mention « Distinction »

Diplôme d'ingénieur en Biologie Industrielle

Ecole de Bio-Industrie (EBI, Cergy-Pontoise) | 2009 - 2014

Outils d'ingénieur, R&D, Qualité, Procédé, Management et Marketing des Sciences Biologiques

Septième partie

BIBLIOGRAPHIE

- [RN4, 2017] (2017). *cancer therapeutic targets*. Springer Nature, New York.
- [Acsadi et al., 1991] Acsadi, G., Dickson, G., Love, D. R., Jani, A., Walsh, F. S., Gurusinghe, A., Wolff, J. A., and Davies, K. E. (1991). Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature*, 352(6338) :815–8.
- [Adams et al., 2008] Adams, C., Totpal, K., Lawrence, D., Marsters, S., Pitti, R., Yee, S., Ross, S., Deforge, L., Koeppen, H., Sagolla, M., Compaan, D., Lowman, H., Hymowitz, S., and Ashkenazi, A. (2008). Structural and functional analysis of the interaction between the agonistic monoclonal antibody apomab and the proapoptotic receptor DR5. *Cell Death and Differentiation*, 15(4) :751–761.
- [Adams et al., 1998] Adams, G. P., Schier, R., Marshall, K., Wolf, E. J., McCall, A. M., Marks, J. D., and Weiner, L. M. (1998). Increased affinity leads to improved selective tumor delivery of single-chain fv antibodies. *Cancer Res*, 58(3) :485–90.
- [Ahmad et al., 2012] Ahmad, Z. A., Yeap, S. K., Ali, A. M., Ho, W. Y., Alitheen, N. B., and Hamid, M. (2012). scFv antibody : principles and clinical application. *Clin Dev Immunol*, 2012 :980250.
- [Akazawa et al., 2009] Akazawa, Y., Mott, J. L., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., Kahrman, A., Guicciardi, M. E., Meng, X. W., Kohno, S., Shah, V. H., Kaufmann, S. H., McNiven, M. A., and Gores, G. J. (2009). Death receptor 5 internalization is required for lysosomal permeabilization by TRAIL in malignant liver cell lines. *Gastroenterology*, 136(7) :2365–2376.
- [Alexandrenne et al., 2009] Alexandrenne, C., Wijkhuisen, A., Dkhissi, F., Hanoux, V., Creminon, C., Boquet, D., and Couraud, J. Y. (2009). Generating antibodies against the native form of the human prion protein (hPrP) in wild-type animals : a comparison between DNA and protein immunizations. *Journal of Immunological Methods*, 341(1-2) :41–9.
- [Allard, 2012] Allard, B. (2012). *Production et caractérisation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux ciblant les récepteurs des endothélines en vue d'une immunothérapie des cancers*. Thesis.
- [Alt et al., 1987] Alt, F. W., Blackwell, T. K., and Yancopoulos, G. D. (1987). Development of the primary antibody repertoire. *Science*, 238(4830) :1079–87.
- [Andersson et al., 2000] Andersson, C., Liljestrom, P., Stahl, S., and Power, U. F. (2000). Protection against respiratory syncytial virus (RSV) elicited in mice by plasmid DNA immunisation encoding a secreted RSV G protein-derived antigen. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 29(4) :247–53.
- [Anees et al., 2015] Anees, M., Horak, P., Schiefer, A. I., Vanhara, P., El-Gazzar, A., Perco, P., Kiesewetter, B., Mullauer, L., Streubel, B., Raderer, M., and Krainer, M. (2015). The potential evasion of immune surveillance in mucosa associated lymphoid tissue lymphoma by DcR2-mediated up-regulation of nuclear factor-kappaB. *Leuk Lymphoma*, 56(5) :1440–9.

- [Arnold et al., 2007] Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M., and Dwek, R. A. (2007). The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annual Review of Immunology*, 25 :21–50.
- [Ashkenazi, 2002] Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*, 2(6) :420–30.
- [Ashkenazi, 2015] Ashkenazi, A. (2015). Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer : lessons learned and future directions. *Journal of Clinical Investigation*, 125(2) :487–489.
- [Ashkenazi and Herbst, 2008] Ashkenazi, A. and Herbst, R. S. (2008). To kill a tumor cell : the potential of proapoptotic receptor agonists. *J Clin Invest*, 118(6) :1979–90.
- [Ashkenazi et al., 1999] Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D. A., Masters, S. A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A. E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I. L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J., Koeppen, H., Shahrokhi, Z., and Schwall, R. H. (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *Journal of Clinical Investigation*, 104(2) :155–162.
- [Ashkenazi et al., 1996] Ashkenazi, A., Pitti, R., Marsters, S., Ruppert, S., Donahue, C., Moore, A., and Roberts, P. (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the TNF cytokine family. *Faseb Journal*, 10(6) :1600–1600.
- [Austin et al., 2006] Austin, C. D., Lawrence, D. A., Peden, A. A., Varfolomeev, E. E., Totpal, K., De Maziere, A. M., Klumperman, J., Arnott, D., Pham, V., Scheller, R. H., and Ashkenazi, A. (2006). Death-receptor activation halts clathrin-dependent endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27) :10283–10288.
- [Azijli et al., 2013] Azijli, K., Weyhenmeyer, B., Peters, G. J., de Jong, S., and Kruyt, F. A. E. (2013). Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells : discord in the death receptor family. *Cell Death and Differentiation*, 20(7) :858–868.
- [Azijli et al., 2012] Azijli, K., Yuvaraj, S., Peppelenbosch, M. P., Wurdinger, T., Dekker, H., Joore, J., van Dijk, E., Quax, W. J., Peters, G. J., de Jong, S., and Kruyt, F. A. E. (2012). Kinome profiling of non-canonical TRAIL signaling reveals RIP1-Src-STAT3-dependent invasion in resistant non-small cell lung cancer cells. *Journal of Cell Science*, 125(19) :4651–4661.
- [Badovinac et al., 2006] Badovinac, V. P., Messingham, K. A. N., Griffith, T. S., and Harty, J. T. (2006). TRAIL deficiency delays, but does not prevent, erosion in the quality of "helpless" memory CD8 T cells. *Journal of Immunology*, 177(2) :999–1006.
- [Barbas et al., 1994] Barbas, C. F., r., Hu, D., Dunlop, N., Sawyer, L., Cababa, D., Hendry, R. M., Nara, P. L., and Burton, D. R. (1994). In vitro evolution of a neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(9) :3809–13.
- [Baron et al., 2011] Baron, A. D., O'Bryant, C. L., Choi, Y., Royer-Joo, S., and Portera, C. C. (2011). Phase Ib study of Drozitumab combined with Cetuximab (CET) plus Irinotecan (IRI) or with FOLFIRI with or without Bevacizumab (BV) in previously treated patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). *Journal of Clinical Oncology*, 29(4).
- [Baselga, 2001] Baselga, J. (2001). The EGFR as a target for anticancer therapy - focus on Cetuximab. *European Journal of Cancer*, 37 :S16–S22.

- [Bates et al., 2006] Bates, M. K., Zhang, G., Sebestyen, M. G., Neal, Z. C., Wolff, J. A., and Herweijer, H. (2006). Genetic immunization for antibody generation in research animals by intravenous delivery of plasmid DNA. *Biotechniques*, 40(2) :199–208.
- [Beck et al., 2017] Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C., and Corvaia, N. (2017). Strategies and challenges for the next generation of antibody drug conjugates. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(5) :315–337.
- [Belkahla et al., 2017] Belkahla, H., Herlem, G., Picaud, F., Gharbi, T., Hemadi, M., Ammarb, S., and Micheau, O. (2017). TRAIL-NP hybrids for cancer therapy : a review. *Nanoscale*, 9(18) :5755–5768.
- [Belyanskaya et al., 2007] Belyanskaya, L. L., Marti, T. M., Hopkins-Donaldson, S., Kurtz, S., Felley-Bosco, E., and Stahel, R. A. (2007). Human agonistic TRAIL receptor antibodies Mapatumumab and Lexatumumab induce apoptosis in malignant mesothelioma and act synergistically with cisplatin. *Molecular Cancer*, 6.
- [Ben-David et al., 2018] Ben-David, U., Siranosian, B., Ha, G., Tang, H., Oren, Y., Hinohara, K., Strathdee, C. A., Dempster, J., Lyons, N. J., Burns, R., Nag, A., Kugener, G., Cimini, B., Tsvetkov, P., Maruvka, Y. E., O’Rourke, R., Garrity, A., Tubelli, A. A., Bandopadhyay, P., Tsherniak, A., Vazquez, F., Wong, B., Birger, C., Ghandi, M., Thorner, A. R., Bittker, J. A., Meyerson, M., Getz, G., Beroukhim, R., and Golub, T. R. (2018). Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature*, 560(7718) :325–330.
- [Bengtén et al., 2000] Bengtén, E., Wilson, M., Miller, N., Clem, L. W., Pilstrom, L., and Warr, G. W. (2000). Immunoglobulin isotypes : Structure, function, and genetics. *Origin and Evolution of the Vertebrate Immune System*, 248 :189–219.
- [Benhar, 2001] Benhar, I. (2001). Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol Adv*, 19(1) :1–33.
- [Berg et al., 2007] Berg, D., Lehne, M., Muller, N., Siegmund, D., Munkel, S., Sebald, W., Pfizenmaier, K., and Wajant, H. (2007). Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L. *Cell Death Differ*, 14(12) :2021–34.
- [Berglund et al., 2000] Berglund, H., Olerenshaw, D., Sankar, A., Federwisch, M., McDonald, N. Q., and Driscoll, P. C. (2000). The three-dimensional solution structure and dynamic properties of the human FADD death domain. *Journal of Molecular Biology*, 302(1) :171–188.
- [Bergmann and Steller, 2010] Bergmann, A. and Steller, H. (2010). Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. *Sci Signal*, 3(145) :re8.
- [Bernasconi et al., 2002] Bernasconi, N. L., Traggiai, E., and Lanzavecchia, A. (2002). Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*, 298(5601) :2199–202.
- [Better et al., 1988] Better, M., Chang, C. P., Robinson, R. R., and Horwitz, A. H. (1988). Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science*, 240(4855) :1041–3.
- [Billadeau and Leibson, 2002] Billadeau, D. D. and Leibson, P. J. (2002). ITAMs versus ITIMs : striking a balance during cell regulation. *J Clin Invest*, 109(2) :161–8.
- [Bird et al., 1988] Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S., and Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 242(4877) :423–6.

- [Black et al., 1997] Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., and Cerretti, D. P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature*, 385(6618) :729–733.
- [Boatright et al., 2003] Boatright, K. M., Renatus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., Ricci, J. E., Edris, W. A., Sutherlin, D. P., Green, D. R., and Salvesen, G. S. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Molecular Cell*, 11(2) :529–541.
- [Bodmer et al., 2000a] Bodmer, J. L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., Blenis, J., and Tschopp, J. (2000a). TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nature Cell Biology*, 2(4) :241–243.
- [Bodmer et al., 2000b] Bodmer, J. L., Meier, P., Tschopp, J., and Schneider, P. (2000b). Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27) :20632–20637.
- [Bodmer et al., 2002] Bodmer, J. L., Schneider, P., and Tschopp, J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci*, 27(1) :19–26.
- [Boross and Leusen, 2012] Boross, P. and Leusen, J. H. (2012). Mechanisms of action of CD20 antibodies. *Am J Cancer Res*, 2(6) :676–90.
- [Boulianne et al., 1984] Boulianne, G. L., Hozumi, N., and Shulman, M. J. (1984). Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature*, 312(5995) :643–6.
- [Bratton et al., 2002] Bratton, S. B., Lewis, J., Butterworth, M., Duckett, C., and Cohen, G. M. (2002). XIAP inhibition of caspase-3 preserves its association with the Apaf-1 apoptosome and prevents CD95-and Bax-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 9(9) :881–892.
- [Bremer et al., 2005] Bremer, E., Samplonius, D. F., van Genne, L., Dijkstra, M. H., Kroesen, B. J., de Leij, L. F., and Helfrich, W. (2005). Simultaneous inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling and enhanced activation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor-mediated apoptosis induction by an scFv : sTRAIL fusion protein with specificity for human EGFR. *J Biol Chem*, 280(11) :10025–33.
- [Brezski et al., 2014] Brezski, R. J., Kinder, M., Grugan, K. D., Soring, K. L., Carton, J., Greenplate, A. R., Petley, T., Capaldi, D., Brosnan, K., Emmell, E., Watson, S., and Jordan, R. E. (2014). A monoclonal antibody against hinge-cleaved IgG restores effector function to proteolytically-inactivated IgGs in vitro and in vivo. *MAbs*, 6(5) :1265–73.
- [Brincks et al., 2008] Brincks, E. L., Katewa, A., Kucaba, T. A., Griffith, T. S., and Legge, K. L. (2008). CD8 T cells utilize TRAIL to control influenza virus infection. *Journal of Immunology*, 181(7) :4918–4925.
- [Bruhns, 2012] Bruhns, P. (2012). Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*, 119(24) :5640–5649.
- [Bruhns et al., 2009] Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D. A., Fernandez, N., Jorieux, S., and Daeron, M. (2009). Specificity and affinity of human Fc gamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, 113(16) :3716–3725.
- [Brunker et al., 2016] Brunker, P., Wartha, K., Friess, T., Grau-Richards, S., Waldhauer, I., Koller, C. F., Weiser, B., Majety, M., Runza, V., Niu, H. F., Packman, K., Feng,

- N. P., Daouti, S., Hosse, R. J., Mossner, E., Weber, T. G., Herting, F., Scheuer, W., Sade, H., Shao, C. Y., Liu, B., Wang, P., Xu, G., Vega-Harring, S., Klein, C., Bosslet, K., and Umama, P. (2016). RG7386, a novel tetravalent FAP-DR5 antibody, effectively triggers FAP-dependent, avidity-driven DR5 hyperclustering and tumor cell apoptosis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(5) :946–957.
- [Buchsbaum et al., 2003] Buchsbaum, D. J., Zhou, T., Grizzle, W. E., Oliver, P. G., Hammond, C. J., Zhang, S., Carpenter, M., and LoBuglio, A. F. (2003). Antitumor efficacy of TRA-8 anti-DR5 monoclonal antibody alone or in combination with chemotherapy and/or radiation therapy in a human breast cancer model. *Clinical Cancer Research*, 9(10) :3731–3741.
- [Budker et al., 1996] Budker, V., Zhang, G., Knechtle, S., and Wolff, J. A. (1996). Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes. *Gene Therapy*, 3(7) :593–598.
- [Burnet, 1957] Burnet, F. M. (1957). A modification of jerne’s theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Australian J. Sci.*, 20(3) :67–9.
- [Burns and El-Deiry, 2001] Burns, T. F. and El-Deiry, W. S. (2001). Identification of inhibitors of TRAIL-induced death (ITIDs) in the TRAIL-sensitive colon carcinoma cell line SW480 using a genetic approach. *Journal of Biological Chemistry*, 276(41) :37879–37886.
- [Burvenich et al., 2016] Burvenich, I. J., Lee, F. T., Guo, N., Gan, H. K., Rigopoulos, A., Parslow, A. C., O’Keefe, G. J., Gong, S. J., Tochon-Danguy, H., Rudd, S. E., Donnelly, P. S., Kotsuma, M., Ohtsuka, T., Senaldi, G., and Scott, A. M. (2016). In vitro and in vivo evaluation of (89)Zr-DS-8273a as a theranostic for anti-death receptor 5 therapy. *Theranostics*, 6(12) :2225–2234.
- [Camidge, 2008] Camidge, D. R. (2008). Apomab : An agonist monoclonal antibody directed against Death Receptor 5/TRAIL-Receptor 2 for use in the treatment of solid tumors. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 8(8) :1167–1176.
- [Carswell et al., 1975] Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(9) :3666–70.
- [Carter and Lazar, 2018] Carter, P. J. and Lazar, G. A. (2018). Next generation antibody drugs : pursuit of the ‘high-hanging fruit’. *Nat Rev Drug Discov*, 17(3) :197–223.
- [Cartron et al., 2002] Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., and Watier, H. (2002). Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*, 99(3) :754–8.
- [Casi and Neri, 2012] Casi, G. and Neri, D. (2012). Antibody-drug conjugates : Basic concepts, examples and future perspectives. *Journal of Controlled Release*, 161(2) :422–428.
- [Chai et al., 2001] Chai, J. J., Wu, Q., Shiozaki, E., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., and Shi, Y. G. (2001). Crystal structure of a procaspase-7 zymogen : Mechanisms of activation and substrate binding. *Cell*, 107(3) :399–407.
- [Chan, 2007] Chan, F. K. M. (2007). Three is better than one : Pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. *Cytokine*, 37(2) :101–107.
- [Chan et al., 2000] Chan, F. K. M., Chun, H. J., Zheng, L. X., Siegel, R. M., Bui, K. L., and Lenardo, M. J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, 288(5475) :2351–2354.

- [Chapman, 2002] Chapman, A. P. (2002). Pegylated antibodies and antibody fragments for improved therapy : a review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(4) :531–545.
- [Charpentier et al., 1991] Charpentier, B., Hiesse, C., Ferran, C., Lantz, O., Fries, D., Bach, J. F., and Chatenoud, L. (1991). Acute clinical syndrome associated with Otk3 administration - prevention by single injection of an anti-human TNF monoclonal-antibody. *Presse Medicale*, 20(40) :2009–2011.
- [Chawla et al., 2010] Chawla, S. P., Tabernero, J., Kindler, H. L., Chiorean, E. G., Lo-Russo, P., Hsu, M., Haddad, V., Bach, B. A., and Baselga, J. (2010). Phase I evaluation of the safety of Conatumumab (AMG 655) in combination with ARM 479 in patients (pts) with advanced, refractory solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 28(15).
- [Chawla-Sarkar et al., 2004] Chawla-Sarkar, M., Bae, S. I., Reu, F. J., Jacobs, B. S., Lindner, D. J., and Borden, E. C. (2004). Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 11(8) :915–923.
- [Cheah et al., 2015] Cheah, C. Y., Belada, D., Fanale, M. A., Janikova, A., Czucman, M. S., Flinn, I. W., Kapp, A. V., Ashkenazi, A., Kelley, S., Bray, G. L., Holden, S., and Seymour, J. F. (2015). Dulanermin with rituximab in patients with relapsed indolent B-cell lymphoma : an open-label phase 1b/2 randomised study. *Lancet Haematology*, 2(4) :E166–E174.
- [Cheetham et al., 1998] Cheetham, G. M. T., Hale, G., Waldmann, H., and Bloomer, A. C. (1998). Crystal structures of a rat anti-cd52 (campath-1) therapeutic antibody fab fragment and its humanized counterpart. *Journal of Molecular Biology*, 284(1) :85–99.
- [Chen et al., 2003] Chen, J. S., Lan, K., and Hung, M. C. (2003). Strategies to target her2/neu overexpression for cancer therapy. *Drug Resistance Updates*, 6(3) :129–136.
- [Chen and Cerutti, 2011] Chen, K. and Cerutti, A. (2011). The function and regulation of immunoglobulin D. *Curr Opin Immunol*, 23(3) :345–52.
- [Chen et al., 2017] Chen, L., Qiu, Y., Hao, Z., Cai, J., Zhang, S., Liu, Y., and Zheng, D. (2017). A novel humanized anti-tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-R2 monoclonal antibody induces apoptotic and autophagic cell death. *IUBMB Life*, 69(9) :735–744.
- [Chen and Murawsky, 2018] Chen, W. C. and Murawsky, C. M. (2018). Strategies for generating diverse antibody repertoires using transgenic animals expressing human antibodies. *Front Immunol*, 9 :460.
- [Chen et al., 2012] Chen, W. M., Qiu, L. G., Hou, J., Zhao, Y. H., Pan, L., Yang, S. F., Leng, Y., Xi, H., Zhang, X. J., Cui, J. S., and Wei, N. (2012). Recombinant circularly permuted TRAIL (CPT) for the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma : An open-label, multicenter phase II clinical trial. *Blood*, 120(21).
- [Cheng et al., 2015] Cheng, A. L., Kang, Y. K., He, A. R., Lim, H. Y., Ryoo, B. Y., Hung, C. H., Sheen, I. S., Izumi, N., Austin, T., Wang, Q., Greenberg, J., Shiratori, S., Beckman, R. A., Kudo, M., and Grp, I. S. (2015). Safety and efficacy of Tigatuzumab plus sorafenib as first-line therapy in subjects with advanced hepatocellular carcinoma : A phase 2 randomized study. *Journal of Hepatology*, 63(4) :896–904.
- [Cheng et al., 2001] Cheng, E. H., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T., and Korsmeyer, S. J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing Bax- and Bak-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, 8(3) :705–11.

- [Cheng et al., 2016] Cheng, X., Meng, Q., Gao, C., Zhuang, G., Huang, X., Zhang, J., Liu, B., Fan, X., and Zhang, M. (2016). Analysis of aDR5scFv with specific identification and function. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 35(1) :25–31.
- [Chinnaiyan, 1999] Chinnaiyan, A. M. (1999). The apoptosome : heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*, 1(1) :5–15.
- [Choi et al., 2009] Choi, Y. E., Butterworth, M., Malladi, S., Duckett, C. S., Cohen, G. M., and Bratton, S. B. (2009). The E3 ubiquitin ligase cIAP1 binds and ubiquitinates caspase-3 and-7 via unique mechanisms at distinct steps in their processing. *Journal of Biological Chemistry*, 284(19) :12772–12782.
- [Chow et al., 2006a] Chow, L. Q., Eckhardt, S. G., Gustafson, D. L., O’Bryant, C., Hariharan, S., Diab, S., Fox, N. L., Corey, A., Padavic, K., Brown, M., and Cohen, R. B. (2006a). HGS-ETR1, an antibody targeting TRAIL-R1, in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced solid malignancies : Results of a phase I and PK study. *Journal of Clinical Oncology*, 24(18) :103s–103s.
- [Chow et al., 2006b] Chow, M. K. M., Amin, A. A., Fulton, K. F., Fernando, T., Kamau, L., Batty, C., Louca, M., Ho, S., Whisstock, J. C., Bottomley, S. P., and Buckle, A. M. (2006b). The refold database : a tool for the optimization of protein expression and refolding. *Nucleic Acids Research*, 34 :D207–D212.
- [Chowdhury and Pastan, 1999] Chowdhury, P. S. and Pastan, I. (1999). Improving antibody affinity by mimicking somatic hypermutation in vitro. *Nature Biotechnology*, 17(6) :568–572.
- [Chu et al., 2008] Chu, S. Y., Vostiar, I., Karki, S., Moore, G. L., Lazar, G. A., Pong, E., Joyce, P. F., Szymkowski, D. E., and Desjarlais, J. R. (2008). Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcγRIIb with Fc-engineered antibodies. *Mol Immunol*, 45(15) :3926–33.
- [Chua et al., 2008] Chua, K. Y., Ramos, J. D., and Cheong, N. (2008). Production of monoclonal antibody by DNA immunization with electroporation. *Methods Mol Biol*, 423 :509–20.
- [Chuntharapai et al., 2001] Chuntharapai, A., Dodge, K., Grimmer, K., Schroeder, K., Marsters, S. A., Koeppen, H., Ashkenazi, A., and Kim, K. J. (2001). Isotype-dependent inhibition of tumor growth in vivo by monoclonal antibodies to death receptor 4. *J Immunol*, 166(8) :4891–8.
- [Ciuleanu et al., 2016] Ciuleanu, T., Bazin, I., Lungulescu, D., Miron, L., Bondarenko, I., Deptala, A., Rodriguez-Torres, M., Giantonio, B., Fox, N. L., Wissel, P., Egger, J., Ding, M., Kalyani, R. N., Humphreys, R., Gribbin, M., and Sun, W. (2016). A randomized, double-blind, placebo-controlled phase II study to assess the efficacy and safety of Mapatumumab with sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol*, 27(4) :680–7.
- [Clancy et al., 2005] Clancy, L., Mruk, K., Archer, K., Woelfel, M., Mongkolsapaya, J., Screaton, G., Lenardo, M. J., and Chan, F. K. M. (2005). Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50) :18099–18104.
- [Clark, 2000] Clark, M. (2000). Antibody humanization : a case of the ‘emperor’s new clothes’? *Immunol Today*, 21(8) :397–402.

- [Clementi et al., 2012] Clementi, N., Mancini, N., Solfrosi, L., Castelli, M., Clementi, M., and Burioni, R. (2012). Phage display-based strategies for cloning and optimization of monoclonal antibodies directed against human pathogens. *Int J Mol Sci*, 13(7) :8273–92.
- [Clohessy et al., 2006] Clohessy, J. G., Zhuang, J. G., de Boer, J., Gil-Gomez, G., and Brady, H. J. M. (2006). Mcl-1 interacts with truncated bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9) :5750–5759.
- [Clynes et al., 2000] Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., and Ravetch, J. V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*, 6(4) :443–6.
- [Cohn et al., 2012] Cohn, A. L., Tabernero, J., Maurel, J., Nowara, E., Dubey, S., Baker, N., Hei, Y. J., and Galimi, F. (2012). Conatumumab (CON) plus FOLFIRI (F) or ganitumab (GAN) plus F for second-line treatment of mutant (MT) KRAS metastatic colorectal cancer (mCRC). *Journal of Clinical Oncology*, 30(4).
- [Cooley et al., 1999] Cooley, S., Burns, L. J., Repka, T., and Miller, J. S. (1999). Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against lfa-3 and her2/neu. *Experimental Hematology*, 27(10) :1533–1541.
- [Cretney et al., 2002] Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J. J., and Smyth, M. J. (2002). Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol*, 168(3) :1356–61.
- [Cunningham et al., 2004] Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., Chau, I., and Van Cutsem, E. (2004). Cetuximab monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 351(4) :337–345.
- [Czajkowsky et al., 2012] Czajkowsky, D. M., Hu, J., Shao, Z. F., and Pleass, R. J. (2012). Fc-fusion proteins : new developments and future perspectives. *Embo Molecular Medicine*, 4(10) :1015–1028.
- [Dall’Acqua et al., 2006] Dall’Acqua, W. F., Kiener, P. A., and Wu, H. R. (2006). Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *Journal of Biological Chemistry*, 281(33) :23514–23524.
- [Dall’Acqua et al., 2002] Dall’Acqua, W. F., Woods, R. M., Ward, E. S., Palaszynski, S. R., Patel, N. K., Brewah, Y. A., Wu, H., Kiener, P. A., and Langermann, S. (2002). Increasing the affinity of a human IgG1, for the neonatal Fc receptor : Biological consequences. *Journal of Immunology*, 169(9) :5171–5180.
- [Dan Inbar, 1972] Dan Inbar, Jacob Hochman, D. G. (1972). Localization of antibody-combining sites within the variable portions of heavy and light chains. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 69(9) :2659–2662.
- [Danial and Korsmeyer, 2004] Danial, N. N. and Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death : critical control points. *Cell*, 116(2) :205–19.
- [Daniels et al., 2005] Daniels, R. A., Turley, H., Kimberley, F. C., Liu, X. S., Mongkol-sapaya, J., Ch’en, P., Xu, X. N., Jin, B. Q., Pezzella, F., and Screaton, G. R. (2005). Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues. *Cell Research*, 15(6) :430–438.

- [Davies and Chacko, 1993] Davies, D. R. and Chacko, S. (1993). Antibody structure. *Accounts of Chemical Research*, 26(8) :421–427.
- [de Miguel et al., 2016] de Miguel, D., Lemke, J., Anel, A., Walczak, H., and Martinez-Lostao, L. (2016). Onto better TRAILs for cancer treatment. *Cell Death Differ*, 23(5) :733–47.
- [De Silva and Klein, 2015] De Silva, N. S. and Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nature Reviews Immunology*, 15(3) :137–148.
- [Dechant et al., 2008] Dechant, M., Weisner, W., Berger, S., Peipp, M., Beyer, T., Schneider-Merck, T., van Bueren, J. J. L., Bleeker, W. K., Parren, P. W. H. I., van de Winkel, J. G. J., and Valerius, T. (2008). Complement-dependent tumor cell lysis triggered by combinations of epidermal growth factor receptor antibodies. *Cancer Research*, 68(13) :4998–5003.
- [Dekkers et al., 2016] Dekkers, G., Plomp, R., Koeleman, C. A. M., Visser, R., von Horsten, H. H., Sandig, V., Rispens, T., Wuhrer, M., and Vidarsson, G. (2016). Multi-level glyco-engineering techniques to generate IgG with defined Fc-glycans. *Scientific Reports*, 6.
- [Demetri et al., 2012] Demetri, G. D., Le Cesne, A., Chawla, S. P., Brodowicz, T., Maki, R. G., Bach, B. A., Smethurst, D. P., Bray, S., Hei, Y. J., and Blay, J. Y. (2012). First-line treatment of metastatic or locally advanced unresectable soft tissue sarcomas with Conatumumab in combination with doxorubicin or doxorubicin alone : A phase I/II open-label and double-blind study. *European Journal of Cancer*, 48(4) :547–563.
- [Deng et al., 2002] Deng, Y. B., Lin, Y. H., and Wu, X. W. (2002). TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondria release of Smac/DIABLO. *Genes and Development*, 16(1) :33–45.
- [DeRosier et al., 2007] DeRosier, L. C., Buchsbaum, D. J., Oliver, P. G., Huang, Z. Q., Sellers, J. C., Grizzle, W. E., Wang, W., Zhou, T., Zinn, K. R., Long, J. W., and Vickers, S. M. (2007). Combination treatment with TRA-8 anti-Death receptor 5 antibody and CPT-11 induces tumor regression in an orthotopic model of pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, 13(18) :5535s–5543s.
- [Deveraux et al., 1998] Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1998). Iaps block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo Journal*, 17(8) :2215–2223.
- [DeVita and Chu, 2008] DeVita, V. T., J. and Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res*, 68(21) :8643–53.
- [Di Gaetano et al., 2003] Di Gaetano, N., Cittera, E., Nota, R., Vecchi, A., Grieco, V., Scanziani, E., Botto, M., Introna, M., and Golay, J. (2003). Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *Journal of Immunology*, 171(3) :1581–1587.
- [Dickens et al., 2012] Dickens, L. S., Boyd, R. S., Jukes-Jones, R., Hughes, M. A., Robinson, G. L., Fairall, L., Schwabe, J. W. R., Cain, K., and MacFarlane, M. (2012). A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. *Molecular Cell*, 47(2) :291–305.
- [Diebolder et al., 2014] Diebolder, C. A., Beurskens, F. J., de Jong, R. N., Koning, R. I., Strumane, K., Lindorfer, M. A., Voorhorst, M., Ugurlar, D., Rosati, S., Heck, A. J. R., van de Winkel, J. G. J., Wilson, I. A., Koster, A. J., Taylor, R. P., Saphire, E. O.,

- Burton, D. R., Schuurman, J., Gros, P., and Parren, P. W. H. I. (2014). Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science*, 343(6176) :1260–1263.
- [Dillman et al., 1994] Dillman, R. O., Shawler, D. L., McCallister, T. J., and Halpern, S. E. (1994). Human anti-mouse antibody-response in cancer-patients following single low-dose injections of radiolabeled murine monoclonal-antibodies. *Cancer Biotherapy*, 9(1) :17–28.
- [Dimanche Boitrel et al., 1992] Dimanche Boitrel, M., Pelletier, H., Genne, P., Petit, J., Legrimellec, C., Canal, P., Ardiet, C., Bastian, G., and Chauffert, B. (1992). Confluence-dependent resistance in human colon cancer-cells - role of reduced drug accumulation and low intrinsic chemosensitivity of resting cells. *International Journal of Cancer*, 50(5) :677–682.
- [Dinnis and James, 2005] Dinnis, D. M. and James, D. C. (2005). Engineering mammalian cell factories for improved recombinant monoclonal antibody production : lessons from nature? *Biotechnol Bioeng*, 91(2) :180–9.
- [Dobson et al., 2009] Dobson, C. L., Main, S., Newton, P., Chodorge, M., Cadwallader, K., Humphreys, R., Albert, V., Vaughan, T. J., Minter, R. R., and Edwards, B. M. (2009). Human monomeric antibody fragments to TRAIL-R1 and TRAIL-R2 that display potent in vitro agonism. *MAbs*, 1(6) :552–62.
- [Doi et al., 2011] Doi, T., Murakami, H., Ohtsu, A., Fuse, N., Yoshino, T., Yamamoto, N., Boku, N., Onozawa, Y., Hsu, C. P., Gorski, K. S., Friberg, G., Kawaguchi, T., and Sasaki, T. (2011). Phase 1 study of Conatumumab, a pro-apoptotic death receptor 5 agonist antibody, in japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 68(3) :733–741.
- [Dominguez et al., 2017] Dominguez, G. A., Condamine, T., Mony, S., Hashimoto, A., Wang, F., Liu, Q., Forero, A., Bendell, J., Witt, R., Hockstein, N., Kumar, P., and Gabrilovich, D. I. (2017). Selective targeting of myeloid-derived suppressor cells in cancer patients using DS-8273a, an agonistic TRAIL-R2 antibody. *Clinical Cancer Research*, 23(12) :2942–2950.
- [Du et al., 2000] Du, C. Y., Fang, M., Li, Y. C., Li, L., and Wang, X. D. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102(1) :33–42.
- [Dubuisson and Micheau, 2017] Dubuisson, A. and Micheau, O. (2017). Antibodies and derivatives targeting DR4 and DR5 for cancer therapy. *Antibodies*, 6(4).
- [Dudley et al., 2005] Dudley, D. D., Chaudhuri, J., Bassing, C. H., and Alt, F. W. (2005). Mechanism and control of v(d)j recombination versus class switch recombination : similarities and differences. *Adv Immunol*, 86 :43–112.
- [Dufour et al., 2017a] Dufour, F., , T., Constantinescu, A. A., Zischler, L., Morle, A., Ben Mabrouk, H., Humblin, E., Jacquemin, G., Szegezdi, E., Delacote, F., Marrakchi, N., Guichard, G., Pellat-Deceunynck, C., Vacher, P., Legembre, P., Garrido, C., and Micheau, O. (2017a). TRAIL receptor gene editing unveils TRAIL-R1 as a master player of apoptosis induced by TRAIL and ER stress. *Oncotarget*, 8(6) :9974–9985.
- [Dufour et al., 2017b] Dufour, F., Rattier, T., Shirley, S., Picarda, G., Constantinescu, A. A., Morle, A., Zakaria, A. B., Marcion, G., Causse, S., Szegezdi, E., Zajonc, D. M., Seigneuric, R., Guichard, G., Gharbi, T., Picaud, F., Herlem, G., Garrido, C., Schneider, P., Benedict, C. A., and Micheau, O. (2017b). N-glycosylation of mouse TRAIL-R and human TRAIL-R1 enhances TRAIL-induced death. *Cell Death Differ*, 24(3) :500–510.

- [Duncan and Winter, 1988] Duncan, A. R. and Winter, G. (1988). The binding site for C1q on IgG. *Nature*, 332(6166) :738–40.
- [Duncan et al., 1988] Duncan, A. R., Woof, J. M., Partridge, L. J., Burton, D. R., and Winter, G. (1988). Localization of the binding site for the human high-affinity fc receptor on IgG. *Nature*, 332(6164) :563–4.
- [Dunn et al., 2002] Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting : from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3(11) :991–8.
- [Ecker et al., 2015] Ecker, D. M., Jones, S. D., and Levine, H. L. (2015). The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs*, 7(1) :9–14.
- [Edelman, 1959] Edelman, G. M. (1959). Dissociation of γ -globulin. *Journal of the American Chemical Society*, 81(12) :3155–3156.
- [Edelmann et al., 2011] Edelmann, B., Bertsch, U., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Perrotta, C., Jakob, M., Adam-Klages, S., Kabelitz, D., and Schutze, S. (2011). Caspase-8 and caspase-7 sequentially mediate proteolytic activation of acid sphingomyelinase in TNF-R1 receptors. *Embo Journal*, 30(2) :379–394.
- [Ehlich et al., 1993] Ehlich, A., Schaal, S., Gu, H., Kitamura, D., Muller, W., and Rajewsky, K. (1993). Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at early stages of B-Cell development. *Cell*, 72(5) :695–704.
- [Ehrenstein and Notley, 2010] Ehrenstein, M. R. and Notley, C. A. (2010). The importance of natural iGM : scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol*, 10(11) :778–86.
- [Ehrlich et al., 2003] Ehrlich, S., Infante-Duarte, C., Seeger, B., and Zipp, F. (2003). Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes. *Cytokine*, 24(6) :244–253.
- [El-Mesery et al., 2013] El-Mesery, M., Trebing, J., Schafer, V., Weisenberger, D., Siegmund, D., and Wajant, H. (2013). CD40-directed scFv-TRAIL fusion proteins induce CD40-restricted tumor cell death and activate dendritic cells. *Cell Death Dis*, 4 :e916.
- [Elmore, 2007] Elmore, S. (2007). Apoptosis : a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4) :495–516.
- [Emery et al., 1998] Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E. R., Eichman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R. A., James, I. E., Rosenberg, M., Lee, J. C., and Young, P. R. (1998). Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Journal of Biological Chemistry*, 273(23) :14363–14367.
- [Emmons C, 1987] Emmons C, H. L. (1987). Muromonab-cd3 (orthoclone okt3) : the first monoclonal antibody approved for therapeutic use. *Iowa Med*, 77(2) :78–82.
- [Encke et al., 2006] Encke, J., Bernardin, J., Geib, J., Barbakadze, G., Bujdoso, R., and Stremmel, W. (2006). Genetic vaccination with FLT3-L and GM-CSF as adjuvants : Enhancement of cellular and humoral immune responses that results in protective immunity in a murine model of hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology*, 12(44) :7118–7125.
- [Eng et al., 2016] Eng, J. W. L., Mace, T. A., Sharma, R., Twum, D. Y. F., Peng, P., Gibbs, J. F., Pitoniak, R., Reed, C. B., Abrams, S. I., Repasky, E. A., and Hylander, B. L. (2016). Pancreatic cancer stem cells in patient pancreatic xenografts are sensitive

- to Drozitumab, an agonistic antibody against DR5. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 4.
- [Engesaeter et al., 2012] Engesaeter, B., Engebraaten, O., Florenes, V. A., and Maelandsmo, G. M. (2012). Dacarbazine and the agonistic TRAIL receptor-2 antibody Lexatumumab induce synergistic anticancer effects in melanoma. *PLoS One*, 7(9) :e45492.
- [Estornes et al., 2018] Estornes, Y., Dondelinger, Y., Weber, K., Bruggeman, I., Peall, A., MacFarlane, M., Lebecque, S., Vandenabeele, P., and Bertrand, M. J. M. (2018). N-glycosylation of mouse TRAIL-R restrains TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death & Disease*, 9.
- [Ettinger, 2006] Ettinger, D. S. (2006). Clinical implications of EGFR expression in the development and progression of solid tumors : Focus on non-small cell lung cancer. *Oncologist*, 11(4) :358–373.
- [Feng et al., 2010] Feng, Y., Xiao, X., Zhu, Z., and Dimitrov, D. S. (2010). Identification and characterization of a novel agonistic anti-DR4 human monoclonal antibody. *MAbs*, 2(5) :565–70.
- [Feoktistova et al., 2011] Feoktistova, M., Geserick, P., Kellert, B., Dimitrova, D. P., Langlais, C., Hupe, M., Cain, K., MacFarlane, M., Hacker, G., and Leverkus, M. (2011). cIAPs Block Ripoptosome Formation, a RIP1/Caspase-8 Containing Intracellular Cell Death Complex Differentially Regulated by cFLIP Isoforms. *Molecular Cell*, 43(3) :449–463.
- [Ferguson, 2004] Ferguson, K. M. (2004). Active and inactive conformations of the epidermal growth factor receptor. *Biochemical Society Transactions*, 32 :742–745.
- [Ferrara et al., 2006] Ferrara, C., Stuart, F., Sondermann, P., Brukner, P., and Umama, P. (2006). The carbohydrate at Fc gamma RIIIa Asn-162 - an element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 281(8) :5032–5036.
- [Ferrara et al., 2004] Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H. P., and Novotny, W. (2004). Discovery and development of Bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(5) :391–400.
- [Fesik, 2000] Fesik, S. W. (2000). Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell*, 103(2) :273–282.
- [Finlay et al., 2014] Finlay, D., Vamos, M., Gonzalez-Lopez, M., Ardecky, R. J., Ganji, S. R., Yuan, H. B., Su, Y., Cooley, T. R., Hauser, C. T., Welsh, K., Reed, J. C., Cosford, N. D. P., and Vuori, K. (2014). Small-molecule IAP antagonists sensitize cancer cells to TRAIL-induced apoptosis : Roles of XIAP and cIAPs. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(1) :5–15.
- [Fischer, 1894] Fischer, E. (1894). Einfluss der configuration auf die wirkung der enzyme. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 27(3) :2985–2993.
- [Fischer et al., 2003] Fischer, U., Janicke, R. U., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin : a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation*, 10(1) :76–100.
- [Forero et al., 2017] Forero, A., Bendell, J. C., Kumar, P., Janisch, L., Rosen, M., Wang, Q., Copigneaux, C., Desai, M., Senaldi, G., and Maitland, M. L. (2017). First-in-human study of the antibody DR5 agonist DS-8273a in patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs*, 35(3) :298–306.

- [Forero-Torres et al., 2013] Forero-Torres, A., Infante, J. R., Waterhouse, D., Wong, L., Vickers, S., Arrowsmith, E., He, A. R., Hart, L., Trent, D., Wade, J., Jin, X. P., Wang, Q., Austin, T., Rosen, M., Beckman, R., von Roemeling, R., Greenberg, J., and Saleh, M. (2013). Phase 2, multicenter, open-label study of Tigatuzumab (CS-1008), a humanized monoclonal antibody targeting death receptor 5, in combination with gemcitabine in chemotherapy-naive patients with unresectable or metastatic pancreatic cancer. *Cancer Medicine*, 2(6) :925–932.
- [Forero-Torres et al., 2010] Forero-Torres, A., Shah, J., Wood, T., Posey, J., Carlisle, R., Copigneaux, C., Luo, F., Wojtowicz-Praga, S., Percent, I., and Saleh, M. (2010). Phase I trial of weekly Tigatuzumab, an agonistic humanized monoclonal antibody targeting death receptor 5 (DR5). *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 25(1) :13–19.
- [Fujimoto et al., 2012] Fujimoto, A., Kosaka, N., Hasegawa, H., Suzuki, H., Sugano, S., and Chiba, J. (2012). Enhancement of antibody responses to native G protein-coupled receptors using E-coli GroEL as a molecular adjuvant in DNA immunization. *Journal of Immunological Methods*, 375(1-2) :243–251.
- [Fulda, 2015] Fulda, S. (2015). Safety and tolerability of TRAIL receptor agonists in cancer treatment. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 71(5) :525–527.
- [Fulda and Debatin, 2006] Fulda, S. and Debatin, K. M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34) :4798–4811.
- [Fulda et al., 2002] Fulda, S., Meyer, E., and Debatin, K. M. (2002). Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene*, 21(15) :2283–94.
- [Fynan et al., 1993] Fynan, E. F., Webster, R. G., Fuller, D. H., Haynes, J. R., Santoro, J. C., and Robinson, H. L. (1993). DNA vaccines : protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(24) :11478–82.
- [Galluzzi, 2018] Galluzzi, L. e. a. (2018). Molecular mechanisms of cell death : recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. *Cell Death Differ*, 25(3) :486–541.
- [Ganten et al., 2009] Ganten, T. M., Sykora, J., Koschny, R., Batke, E., Aulmann, S., Mansmann, U., Stremmel, W., Sinn, H. P., and Walczak, H. (2009). Prognostic significance of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in patients with breast cancer. *J Mol Med (Berl)*, 87(10) :995–1007.
- [Gasparian et al., 2015] Gasparian, M. E., Bychkov, M. L., Yagolovich, A. V., Dolgikh, D. A., and Kirpichnikov, M. P. (2015). Mutations enhancing selectivity of antitumor cytokine TRAIL to DR5 receptor increase its cytotoxicity against tumor cells. *Biochemistry-Moscow*, 80(8) :1080–1091.
- [Geng et al., 2014] Geng, C., Hou, J., Zhao, Y., Ke, X., Wang, Z., Qiu, L., Xi, H., Wang, F., Wei, N., Liu, Y., Yang, S., Wei, P., Zheng, X., Huang, Z., Zhu, B., and Chen, W. M. (2014). A multicenter, open-label phase II study of recombinant CPT (circularly permuted TRAIL) plus thalidomide in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Am J Hematol*, 89(11) :1037–42.
- [Geserick et al., 2008] Geserick, P., Drewniok, C., Hupe, M., Haas, T. L., Diessenbacher, P., Sprick, M. R., Schon, M. P., Henkler, F., Gollnick, H., Walczak, H., and Leverkus, M. (2008). Suppression of cFLIP is sufficient to sensitize human melanoma cells to TRAIL- and CD95L-mediated apoptosis. *Oncogene*, 27(22) :3211–3220.
- [Gieffers et al., 2013] Gieffers, C., Kluge, M., Merz, C., Sykora, J., Thiemann, M., Schaal, R., Fischer, C., Branschadel, M., Abhari, B. A., Hohenberger, P., Fulda, S., Fricke, H.,

- and Hill, O. (2013). APG350 induces superior clustering of TRAIL receptors and shows therapeutic antitumor efficacy independent of cross-linking via Fcγ receptors. *Mol Cancer Ther*, 12(12) :2735–47.
- [Goldstein et al., 1986] Goldstein, G., Fuccello, A. J., Norman, D. J., Shield, C. F., r., Colvin, R. B., and Cosimi, A. B. (1986). Okt3 monoclonal antibody plasma levels during therapy and the subsequent development of host antibodies to okt3. *Transplantation*, 42(5) :507–11.
- [Golstein, 1997] Golstein, P. (1997). Cell death : TRAIL and its receptors. *Current Biology*, 7(12) :R750–R753.
- [Gottwald et al., 2013] Gottwald, L., Piekarski, J., Kubiak, R., Szwalski, J., Pasz-Walczak, G., Sek, P., Spych, M., Suzin, J., Tyliniski, W., and Jeziorski, A. (2013). Membrane expression of TRAIL receptors DR4, DR5, DcR1 and DcR2 in the normal endometrium, atypical endometrial hyperplasia and endometrioid adenocarcinoma : a tissue microarray study. *Arch Gynecol Obstet*, 288(4) :889–99.
- [Graves et al., 2014] Graves, J. D., Kordich, J. J., Huang, T. H., Piasecki, J., Bush, T. L., Sullivan, T., Foltz, I. N., Chang, W., Douangpanya, H., Dang, T., O’Neil, J. W., Mallari, R., Zhao, X. N., Branstetter, D. G., Rossi, J. M., Long, A. M., Huang, X., and Holland, P. M. (2014). Apo2L/TRAIL and the death receptor 5 agonist antibody AMG 655 cooperate to promote receptor clustering and antitumor activity. *Cancer Cell*, 26(2) :177–189.
- [Greco et al., 2008] Greco, F. A., Bonomi, P., Crawford, J., Kelly, K., Oh, Y., Halpern, W., Lo, L., Gallant, G., and Klein, J. (2008). Phase 2 study of Mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody which targets and activates the TRAIL receptor-1, in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 61(1) :82–90.
- [Green et al., 1994] Green, L. L., Hardy, M. C., Maynard-Currie, C. E., Tsuda, H., Louie, D. M., Mendez, M. J., Abderrahim, H., Noguchi, M., Smith, D. H., Zeng, Y., David, N. E., Sasai, H., Garza, D., Brenner, D. G., Hales, J. F., McGuinness, R. P., Capon, D. J., Klapholz, S., and Jakobovits, A. (1994). Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human ig heavy and light chain yacs. *Nat Genet*, 7(1) :13–21.
- [Griffith et al., 1999a] Griffith, T. S., Rauch, C. T., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Lynch, D. H., Smith, C. A., Goodwin, R. G., and Kubin, M. Z. (1999a). Functional analysis of TRAIL receptors using monoclonal antibodies. *Journal of Immunology*, 162(5) :2597–2605.
- [Griffith et al., 1999b] Griffith, T. S., Wiley, S. R., Kubin, M. Z., Sedger, L. M., Maliszewski, C. R., and Fanger, N. A. (1999b). Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *Journal of Experimental Medicine*, 189(8) :1343–1353.
- [Gross et al., 1999] Gross, A., Yin, X. M., Wang, K., Wei, M. C., Jockel, J., Millman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Korsmeyer, S. J. (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-X-L prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *Journal of Biological Chemistry*, 274(2) :1156–1163.
- [Gross et al., 1989a] Gross, G., Gorochoy, G., Waks, T., and Eshhar, Z. (1989a). Generation of effector T cells expressing chimeric T cell receptor with antibody type-specificity. *Transplant Proc*, 21(1 Pt 1) :127–30.

- [Gross et al., 1989b] Gross, G., Waks, T., and Eshhar, Z. (1989b). Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(24) :10024–8.
- [Gul and van Egmond, 2015] Gul, N. and van Egmond, M. (2015). Antibody-dependent phagocytosis of tumor cells by macrophages : A potent effector mechanism of monoclonal antibody therapy of cancer. *Cancer Research*, 75(23) :5008–5013.
- [Guo et al., 2017] Guo, L., Sun, X., Hao, Z. C., Huang, J. J., Han, X. J., You, Y. J., Li, Y. Y., Shen, M. Y., Ozawa, T., Kishi, H., Muraguchi, A., and Jin, A. S. (2017). Identification of novel epitopes with agonistic activity for the development of tumor immunotherapy targeting TRAIL-R1. *Journal of Cancer*, 8(13) :2542–2553.
- [Guo et al., 2005] Guo, Y. B., Chen, C. F., Zheng, Y., Zhang, J. C., Tao, X. H., Liu, S. L., Zheng, D. X., and Liu, Y. X. (2005). A novel anti-human DR5 monoclonal antibody with tumoricidal activity induces caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 280(51) :41940–41952.
- [Guseva et al., 2008] Guseva, N. V., Rokhlin, O. W., Taghiyev, A. F., and Cohen, M. B. (2008). Unique resistance of breast carcinoma cell line T47D to TRAIL but not anti-Fas is linked to p43cFLIP(L). *Breast Cancer Research and Treatment*, 107(3) :349–357.
- [Halaas et al., 2000] Halaas, O., Vik, R., Ashkenazi, A., and Espevik, T. (2000). Lipopolysaccharide induces expression of Apo2 ligand/TRAIL in human monocytes and macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*, 51(3) :244–250.
- [Hanahan and Weinberg, 2000] Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1) :57–70.
- [Hanahan and Weinberg, 2011] Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer : The next generation. *Cell*, 144(5) :646–674.
- [Hao et al., 2016] Hao, Z. C., Han, X. J., Sun, X., Shen, M. Y., Huang, J. J., Li, Y. Y., Ozawa, T., Pang, D., Jin, S. D., Kishi, H., Muraguchi, A., and Jin, A. S. (2016). Fully human monoclonal antibodies to TRAIL-R1 enhance TRAIL-induced apoptosis via activation of caspase-8 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 475(2) :238–244.
- [Hazen et al., 2014] Hazen, M., Bhakta, S., Vij, R., Randle, S., Kallop, D., Chiang, V., Hotzel, I., Jaiswal, B. S., Ervin, K. E., Li, B., Weimer, R. M., Polakis, P., Scheller, R. H., Junutula, J. R., and Hongo, J. A. (2014). An improved and robust DNA immunization method to develop antibodies against extracellular loops of multi-transmembrane proteins. *MAbs*, 6(1) :95–107.
- [He et al., 2016] He, Y., Hendriks, D., van Ginkel, R., Samplonius, D., Bremer, E., and Helfrich, W. (2016). Melanoma-directed activation of apoptosis using a bispecific antibody directed at MCSP and TRAIL Receptor-2/Death Receptor-5. *J Invest Dermatol*, 136(2) :541–4.
- [Hendriks et al., 2017] Hendriks, D., Choi, G., de Bruyn, M., Wiersma, V. R., and Bremer, E. (2017). Antibody-based cancer therapy : Successful agents and novel approaches. *Int Rev Cell Mol Biol*, 331 :289–383.
- [Hendriks et al., 2016] Hendriks, D., He, Y., Koopmans, I., Wiersma, V. R., van Ginkel, R. J., Samplonius, D. F., Helfrich, W., and Bremer, E. (2016). Programmed death ligand 1 (PD-L1)-targeted TRAIL combines PD-L1-mediated checkpoint inhibition with TRAIL-mediated apoptosis induction. *Oncoimmunology*, 5(8).

- [Herbst et al., 2010] Herbst, R. S., Kurzrock, R., Hong, D. S., Valdivieso, M., Hsu, C. P., Goyal, L., Juan, G., Hwang, Y. C., Wong, S., Hill, J. S., Friberg, G., and LoRusso, P. M. (2010). A first-in-human study of Conatumumab in adult patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 16(23) :5883–5891.
- [Herbst et al., 2006] Herbst, R. S., Mendolson, D. S., Ebbinghaus, S., Gordon, M. S., O'Dwyer, P., Lieberman, G., Ing, J., Kurzrock, R., Novotny, W., and Eckhardt, G. (2006). A phase I safety and pharmacokinetic (PK) study of recombinant Apo2L/TRAIL, an apoptosis-inducing protein in patients with advanced cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 24(18) :124s–124s.
- [Hernandez et al., 2018] Hernandez, I., Bott, S. W., Patel, A. S., Wolf, C. G., Hospodar, A. R., Sampathkumar, S., and Shrank, W. H. (2018). Pricing of monoclonal antibody therapies : higher if used for cancer? *Am J Manag Care*, 24(2) :109–112.
- [Herter et al., 2014] Herter, S., Birk, M. C., Klein, C., Gerdes, C., Umana, P., and Bacac, M. (2014). Glycoengineering of therapeutic antibodies enhances monocyte/macrophage-mediated phagocytosis and cytotoxicity. *Journal of Immunology*, 192(5) :2252–2260.
- [Herweijer and Wolff, 2007] Herweijer, H. and Wolff, J. A. (2007). Gene therapy progress and prospects : Hydrodynamic gene delivery. *Gene Therapy*, 14(2) :99–107.
- [Hezareh et al., 2001] Hezareh, M., Hessel, A. J., Jensen, R. C., van de Winkel, J. G. J., and Parren, P. W. H. I. (2001). Effector function activities of a panel of mutants of a broadly neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, 75(24) :12161–12168.
- [Hinton et al., 2004] Hinton, P. R., Johlfs, M. G., Xiong, J. M., Hanestad, K., Ong, K. C., Bullock, C., , S., Tang, M. T., Tso, J. Y., V squez, M., and Tsurushita, N. (2004). Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8) :6213–6216.
- [Hinz et al., 2000] Hinz, S., Trauzold, A., Boenicke, L., Sandberg, C., Beckmann, S., Bayer, E., Walczak, H., Kalthoff, H., and Ungefroren, H. (2000). Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene*, 19(48) :5477–86.
- [Ho et al., 2005] Ho, M., Kreitman, R. J., Onda, M., and Pastan, I. (2005). In vitro antibody evolution targeting germline hot spots to increase activity of an anti-cd22 immunotoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 280(1) :607–617.
- [Holland, 2014] Holland, P. M. (2014). Death receptor agonist therapies for cancer, which is the right TRAIL? *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 25(2) :185–193.
- [Hoogenboom, 2005] Hoogenboom, H. R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol*, 23(9) :1105–16.
- [Hoogenboom et al., 1998] Hoogenboom, H. R., de Bruine, A. P., Hufton, S. E., Hoet, R. M., Arends, J. W., and Roovers, R. C. (1998). Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*, 4(1) :1–20.
- [Hoogwater et al., 2010] Hoogwater, F. J. H., Nijkamp, M. W., Smakman, N., Steller, E. J. A., Emmink, B. L., Westendorp, B. F., Raats, D. A. E., Sprick, M. R., Schaefer, U., Van Houdt, W. J., De Bruijn, M. T., Schackmann, R. C. J., Derksen, P. W. B., Medema, J. P., Walczak, H., Rinkes, I. H. M. B., and Kranenburg, O. (2010). Oncogenic K-Ras Turns Death Receptors Into Metastasis-Promoting Receptors in Human and Mouse Colorectal Cancer Cells. *Gastroenterology*, 138(7) :2357–2367.

- [Horenstein et al., 2017] Horenstein, A. L., Chillemi, A., Quarona, V., Zito, A., Mariani, V., Faini, A. C., Morandi, F., Schiavoni, I., Ausiello, C. M., and Malavasi, F. (2017). Antibody mimicry, receptors and clinical applications. *Hum Antibodies*, 25(3-4) :75–85.
- [Hotte et al., 2008] Hotte, S. J., Hirte, H. W., Chen, E. X., Siu, L. L., Le, L. H., Corey, A., Iacobucci, A., MacLean, M., Lo, L., Fox, N. L., and Oza, A. M. (2008). A phase 1 study of Mapatumumab (fully human monoclonal antibody to TRAIL-R1) in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res*, 14(11) :3450–5.
- [Huang, 2009] Huang, C. C. (2009). Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MIME-TIBODY (TM) technology. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6) :692–699.
- [Hudis, 2007] Hudis, C. A. (2007). Drug therapy : Trastuzumab - mechanism of action and use in clinical practice. *New England Journal of Medicine*, 357(1) :39–51.
- [Huet, 2014] Huet, H. A. e. a. (2014). Multivalent nanobodies targeting death receptor 5 elicit superior tumor cell killing through efficient caspase induction. *Mabs*, 6(6) :1560–1570.
- [Hughes et al., 2016] Hughes, M. A., Powley, I. R., Jukes-Jones, R., Horn, S., Feoktistova, M., Fairall, L., Schwabe, J. W., Leverkus, M., Cain, K., and MacFarlane, M. (2016). Co-operative and hierarchical binding of c-FLIP and caspase-8 : A unified model defines how c-FLIP isoforms differentially control cell fate. *Mol Cell*, 61(6) :834–49.
- [Huse et al., 1989] Huse, W. D., Sastry, L., Iverson, S. A., Kang, A. S., Alting-Mees, M., Burton, D. R., Benkovic, S. J., and Lerner, R. A. (1989). Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science*, 246(4935) :1275–81.
- [Hutt et al., 2017] Hutt, M., Marquardt, L., Seifert, O., Siegemund, M., Muller, I., Kulms, D., Pfizenmaier, K., and Kontermann, R. E. (2017). Superior properties of Fc-comprising scTRAIL fusion proteins. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(12) :2792–2802.
- [Hwang and Foote, 2005] Hwang, W. Y. and Foote, J. (2005). Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods*, 36(1) :3–10.
- [Ichikawa et al., 2001] Ichikawa, K., Liu, W. M., Zhao, L. M., Wang, Z., Liu, D., Ohtsuka, T., Zhang, H. G., Mountz, J. D., Koopman, W. J., Kimberly, R. P., and Zhou, T. (2001). Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nature Medicine*, 7(8) :954–960.
- [Idusogie et al., 2000] Idusogie, E. E., Presta, L. G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Wong, P. Y., Ultsch, M., Meng, Y. G., and Mulkerrin, M. G. (2000). Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *Journal of Immunology*, 164(8) :4178–4184.
- [Introna and Golay, 2009] Introna, M. and Golay, J. (2009). Complement in antibody therapy : friend or foe ? *Blood*, 114(26) :5247–5248.
- [Irmeler et al., 1997] Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, B., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E., and Tschopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388(6638) :190–195.
- [JA et al., 1990] JA, W., RW, M., P, W., W, C., G, A., A, J., and PL., F. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247 :1465–8.
- [Jackson et al., 2016] Jackson, H. J., Rafiq, S., and Brentjens, R. J. (2016). Driving CAR T-cells forward. *Nat Rev Clin Oncol*, 13(6) :370–83.

- [Jalah et al., 2014] Jalah, R., Kulkarni, V., Patel, V., Rosati, M., Alicea, C., Bear, J., Yu, L., Guan, Y., Shen, X., Tomaras, G. D., LaBranche, C., Montefiori, D. C., Prativipati, R., Pinter, A., Bess, J., J., Lifson, J. D., Reed, S. G., Sardesai, N. Y., Venzon, D. J., Valentin, A., Pavlakis, G. N., and Felber, B. K. (2014). DNA and protein co-immunization improves the magnitude and longevity of humoral immune responses in macaques. *PLoS One*, 9(3) :e91550.
- [Janeway CA Jr, 2001] Janeway CA Jr, Travers P, W. M.-e. a. (2001). *The interaction of the antibody molecule with specific antigen*. New York :, 5th edition edition.
- [Janssen et al., 2005] Janssen, E. M., Droin, N. M., Lemmens, E. E., Pinkoski, M. J., Bensinger, S. J., Ehst, B. D., Griffith, T. S., Green, D. R., and Schoenberger, S. P. (2005). CD4(+) T-cell help controls CD8(+) T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature*, 434(7029) :88–93.
- [Jefferis, 2007] Jefferis, R. (2007). Antibody therapeutics : isotype and glycoform selection. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7(9) :1401–1413.
- [Jefferis, 2009a] Jefferis, R. (2009a). Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(3) :226–234.
- [Jefferis, 2009b] Jefferis, R. (2009b). Glycosylation of antibody therapeutics : optimisation for purpose. *Methods Mol Biol*, 483 :223–38.
- [Jefferis, 2012] Jefferis, R. (2012). Isotype and glycoform selection for antibody therapeutics. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 526(2) :159–166.
- [Jevsevar et al., 2012] Jevsevar, S., Kusterle, M., and Kenig, M. (2012). Pegylation of antibody fragments for half-life extension. *Methods Mol Biol*, 901 :233–46.
- [Jin and El-Deiry, 2006] Jin, Z. and El-Deiry, W. S. (2006). Distinct signaling pathways in TRAIL- versus tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 26(21) :8136–8148.
- [Jones et al., 1986] Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., and Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 321(6069) :522–5.
- [Kang et al., 2004] Kang, Y. C., Kim, K. M., Lee, K. S., Namkoong, S., Lee, S. J., Han, J. A., Jeoung, D., Ha, K. S., Kwon, Y. G., and Kim, Y. M. (2004). Serum bioactive lysophospholipids prevent TRAIL-induced apoptosis via PI3K/Akt-dependent cFLIP expression and bad phosphorylation. *Cell Death and Differentiation*, 11(12) :1287–1298.
- [Kang et al., 2011] Kang, Z., Chen, J.-J., Yu, Y., Li, B., Sun, S.-Y., Zhang, B., and Cao, L. (2011). Drozitumab, a Human Antibody to Death Receptor 5, Has Potent Antitumor Activity against Rhabdomyosarcoma with the Expression of Caspase-8 Predictive of Response. *Clinical Cancer Research*, 17(10) :3181–3192.
- [Kantari and Walczak, 2011] Kantari, C. and Walczak, H. (2011). Caspase-8 and Bid : Caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1813(4) :558–563.
- [Kaplan-Lefko et al., 2010] Kaplan-Lefko, P. J., Graves, J. D., Zoog, S. J., Pan, Y., Wall, J., Branstetter, D. G., Moriguchi, J., Coxon, A., Huard, J. N., Xu, R., Peach, M. L., Juan, G., Kaufman, S., Chen, Q., Bianchi, A., Kordich, J. J., Ma, M., Foltz, I. N., and Gliniak, B. C. (2010). Conatumumab, a fully human agonist antibody to death receptor 5, induces apoptosis via caspase activation in multiple tumor types. *Cancer Biology and Therapy*, 9(8) :618–631.

- [Kaplun and Reichert, 2018] Kaplun, H. and Reichert, J. M. (2018). Antibodies to watch in 2018. *MAbs*, 10(2) :183–203.
- [Karapetis CS, 2010] Karapetis CS, Clingan PR, L. N. D.-J. B. O. V. S. D. (2010). Phase II study of PRO95780 plus paclitaxel, carboplatin, and Bevacizumab (PCB) in non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol*, 28((15s) : abstr 7535).
- [Kaufmann et al., 1993] Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E., and Poirier, G. G. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase - an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Research*, 53(17) :3976–3985.
- [Keir et al., 2008] Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J., and Sharpe, A. H. (2008). Pd-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual Review of Immunology*, 26 :677–704.
- [Keizer et al., 2010] Keizer, R. J., Huitema, A. D. R., Schellens, J. H. M., and Beijnen, J. H. (2010). Clinical pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. *Clinical Pharmacokinetics*, 49(8) :493–507.
- [Kerr et al., 1972] Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4) :239–57.
- [Khademi et al., 2017] Khademi, F., Mostafaie, A., Parvaneh, S., Rad, F. G., Mohammadi, P., and Bahrami, G. (2017). Construction and characterization of monoclonal antibodies against the extracellular domain of B-lymphocyte antigen CD20 using DNA immunization method. *International Immunopharmacology*, 43 :23–32.
- [Kim and Ashkenazi, 2013] Kim, J. M. and Ashkenazi, A. (2013). Fc gamma receptors enable anticancer action of proapoptotic and immune-modulatory antibodies. *J Exp Med*, 210(9) :1647–51.
- [Kim et al., 1993] Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S., and Ferrara, N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor-growth invivo. *Nature*, 362(6423) :841–844.
- [Kimura et al., 2007] Kimura, H., Sakai, K., Arao, T., Shimoyama, T., Tamura, T., and Nishio, K. (2007). Antibody-dependent cellular cytotoxicity of Cetuximab against tumor cells with wild-type or mutant epidermal growth factor receptor. *Cancer Sci*, 98(8) :1275–80.
- [Kinch and Griesenauer, 2018] Kinch, M. S. and Griesenauer, R. H. (2018). 2017 in review : Fda approvals of new molecular entities. *Drug Discov Today*.
- [Kindler et al., 2010] Kindler, H. L., Richards, D. A., Stephenson, J., Garbo, L. E., Lima, C. S. R., Safran, H., Wiezorek, J. S., Feigal, E. G., Bray, S., and Fuchs, C. (2010). A placebo-controlled, randomized phase II study of Conatumumab (C) or AMG 479 (A) or placebo (P) plus gemcitabine (G) in patients (pts) with metastatic pancreatic cancer (mPC). *Journal of Clinical Oncology*, 28(15).
- [Kischkel et al., 2000] Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K. J., and Ashkenazi, A. (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*, 12(6) :611–620.
- [Kiyoshi et al., 2014] Kiyoshi, M., Caaveiro, J. M. M., Miura, E., Nagatoishi, S., Nakakido, M., Soga, S., Shirai, H., Kawabata, S., and Tsumoto, K. (2014). Affinity improvement of a therapeutic antibody by structure-based computational design : Generation of electrostatic interactions in the transition state stabilizes the antibody-antigen complex. *Plos One*, 9(1).

- [Klee, 2000] Klee, G. G. (2000). Human anti-mouse antibodies. *Arch Pathol Lab Med*, 124(6) :921–3.
- [Klein et al., 1981] Klein, M., Haeffner-Cavaillon, N., Isenman, D. E., Rivat, C., Navia, M. A., Davies, D. R., and Dorrington, K. J. (1981). Expression of biological effector functions by immunoglobulin G molecules lacking the hinge region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(1) :524–8.
- [Kobayashi et al., 2014] Kobayashi, E., Kishi, H., Ozawa, T., Hamana, H., Nakagawa, H., Jin, A. S., Li, Z. Z., and Muraguchi, A. (2014). A chimeric antigen receptor for TRAIL-receptor 1 induces apoptosis in various types of tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(4) :798–803.
- [Kobayashi et al., 2009] Kobayashi, Y., Udagawa, N., and Takahashi, N. (2009). Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 19(1) :61–72.
- [Kohler and Milstein, 1975] Kohler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517) :495–7.
- [Kohrt et al., 2012] Kohrt, H. E., Houot, R., Weiskopf, K., Goldstein, M. J., Scheeren, F., Czerwinski, D., Colevas, A. D., Weng, W. K., Clarke, M. F., Carlson, R. W., Stockdale, F. E., Mollick, J. A., Chen, L., and Levy, R. (2012). Stimulation of natural killer cells with a CD137-specific antibody enhances trastuzumab efficacy in xenotransplant models of breast cancer. *J Clin Invest*, 122(3) :1066–75.
- [Kofschoten et al., 2007] Kofschoten, M. V., Schuurman, J., Losen, M., Bleeker, W. K., Martinez-Martinez, P., Vermeulen, E., den Bleker, T. H., Wiegman, L., Vink, T., Aarden, L. A., De Baets, M. H., van De Winkel, J. G. J., Aalberse, R. C., and Parren, P. W. H. I. (2007). Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic fab arm exchange. *Science*, 317(5844) :1554–1557.
- [Kono and Rock, 2008] Kono, H. and Rock, K. L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology*, 8(4) :279–289.
- [Kurbanov et al., 2005] Kurbanov, B. M., Geilen, C. C., Fecker, L. F., Orfanos, C. E., and Eberle, J. (2005). Efficient TRAIL-R1/DR4-mediated apoptosis in melanoma cells by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Journal of Investigative Dermatology*, 125(5) :1010–1019.
- [Labanieh et al., 2018] Labanieh, L., Majzner, R. G., and Mackall, C. L. (2018). Programming car-t cells to kill cancer. *Nature Biomedical Engineering*, 2(6) :377–391.
- [Labrijn et al., 2009] Labrijn, A. F., Buijsse, A. O., van den Bremer, E. T. J., Verwilligen, A. Y. W., Bleeker, W. K., Thorpe, S. J., Killestein, J., Polman, C. H., Aalberse, R. C., Schuurman, J., van de Winkel, J. G. J., and Parren, P. W. H. I. (2009). Therapeutic IgG4 antibodies engage in fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo. *Nature Biotechnology*, 27(8) :767–U122.
- [Lalaoui et al., 2011] Lalaoui, N., Morle, A., Merino, D., Jacquemin, G., Iessi, E., Morizot, A., Shirley, S., Robert, B., Solary, E., Garrido, C., and Micheau, O. (2011). TRAIL-R4 promotes tumor growth and resistance to apoptosis in cervical carcinoma HeLa cells through Akt. *Plos One*, 6(5).
- [Lambert and Morris, 2017] Lambert, J. M. and Morris, C. Q. (2017). Antibody-drug conjugates (ADCs) for personalized treatment of solid tumors : A review. *Advances in Therapy*, 34(5) :1015–1035.
- [Lazar et al., 2006] Lazar, G. A., Dang, W., Karki, S., Vafa, O., Peng, J. S., Hyun, L., Chan, C., Chung, H. S., Eivazi, A., Yoder, S. C., Vielmetter, J., Carmichael, D. F.,

- Hayes, R. J., and Dahiyat, B. I. (2006). Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(11) :4005–10.
- [Leach et al., 1996a] Leach, D. R., Krummel, M. F., and Allison, J. P. (1996a). Enhancement of antitumor immunity by ctla-4 blockade. *Science*, 271(5256) :1734–1736.
- [Leach et al., 1996b] Leach, J. L., Sedmak, D. D., Osborne, J. M., Rahill, B., Lairmore, M. D., and Anderson, C. L. (1996b). Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast : implications for maternal-fetal antibody transport. *J Immunol*, 157(8) :3317–22.
- [LeBlanc et al., 2002] LeBlanc, H., Lawrence, D., Varfolomeev, E., Totpal, K., Morlan, J., Schow, P., Fong, S., Schwall, R., Sinicropi, D., and Ashkenazi, A. (2002). Tumor-cell resistance to death receptor-induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nature Medicine*, 8(3) :274–281.
- [LeBlanc and Ashkenazi, 2003] LeBlanc, H. N. and Ashkenazi, A. (2003). Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ*, 10(1) :66–75.
- [Lee et al., 2016] Lee, H., Hong, B. J., Lee, J. H., Yeo, S., Jung, H. Y., Chung, J., Ahn, G. O., and Hahn, S. K. (2016). Hyaluronate-death receptor 5 antibody conjugates for targeted treatment of liver metastasis. *Biomacromolecules*, 17(9) :3085–93.
- [Lee et al., 2002] Lee, H. O., Herndon, J. M., Barreiro, R., Griffith, T. S., and Ferguson, T. A. (2002). TRAIL : A mechanism of tumor surveillance in an immune privileged site. *Journal of Immunology*, 169(9) :4739–4744.
- [Lehnert et al., 2014] Lehnert, C., Weiswange, M., Jeremias, I., Bayer, C., Grunert, M., Debatin, K. M., and Strauss, G. (2014). TRAIL-receptor costimulation inhibits proximal TCR signaling and suppresses human T Cell activation and proliferation. *Journal of Immunology*, 193(8) :4021–4031.
- [Lei et al., 2017] Lei, G., Xu, M., Xu, Z., Gu, L., Lu, C., Bai, Z., Wang, Y., Zhang, Y., Hu, H., Jiang, Y., Zhao, W., and Tan, S. (2017). A novel fully human agonistic single chain fragment variable antibody targeting death receptor 5 with potent antitumor activity in vitro and in vivo. *Int J Mol Sci*, 18(10).
- [Lei et al., 2018] Lei, G. X., Xu, M. L., Xu, Z. P., Lu, C. C., and Tan, S. H. (2018). Combination of novel DR5 targeting agonistic scFv antibody TR2-3 with cisplatin shows enhanced synergistic antitumor activity in vitro and in vivo. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 98 :271–279.
- [Lejeune et al., 1998] Lejeune, F. J., Ruegg, C., and Lienard, D. (1998). Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Curr Opin Immunol*, 10(5) :573–80.
- [Lemke et al., 2010] Lemke, J., Noack, A., Adam, D., Tchikov, V., Bertsch, U., Roder, C., Schutze, S., Wajant, H., Kalthoff, H., and Trauzold, A. (2010). TRAIL signaling is mediated by DR4 in pancreatic tumor cells despite the expression of functional DR5. *Journal of Molecular Medicine*, 88(7) :729–740.
- [Lemke et al., 2014a] Lemke, J., von Karstedt, S., Abd El Hay, M., Conti, A., Arce, F., Montinaro, A., Papenfuss, K., El-Bahrawy, M. A., and Walczak, H. (2014a). Selective CDK9 inhibition overcomes TRAIL resistance by concomitant suppression of cFLIP and Mcl-1. *Cell Death Differ*, 21(3) :491–502.
- [Lemke et al., 2014b] Lemke, J., von Karstedt, S., Zinngrebe, J., and Walczak, H. (2014b). Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death Differ*, 21(9) :1350–64.

- [Leng et al., 2017] Leng, Y., Hou, J., Jin, J., Zhang, M., Ke, X., Jiang, B., Pan, L., Yang, L., Zhou, F., Wang, J., Wang, Z., Liu, L., Li, W., Shen, Z., Qiu, L., Chang, N., Li, J., Liu, J., Pang, H., Meng, H., Wei, P., Jiang, H., Liu, Y., Zheng, X., Yang, S., and Chen, W. (2017). Circularly permuted TRAIL plus thalidomide and dexamethasone versus thalidomide and dexamethasone for relapsed/refractory multiple myeloma : a phase 2 study. *Cancer Chemother Pharmacol*, 79(6) :1141–1149.
- [Leong et al., 2009] Leong, S., Cohen, R. B., Gustafson, D. L., Langer, C. J., Camidge, D. R., Padavic, K., Gore, L., Smith, M., Chow, L. Q., von Mehren, M., O’Bryant, C., Hariharan, S., Diab, S., Fox, N. L., Miceli, R., and Eckhardt, S. G. (2009). Mapatumumab, an antibody targeting TRAIL-R1, in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced solid malignancies : Results of a phase I and pharmacokinetic study. *Journal of Clinical Oncology*, 27(26) :4413–4421.
- [Li and Ravetch, 2012] Li, F. and Ravetch, J. V. (2012). Apoptotic and antitumor activity of death receptor antibodies require inhibitory Fcγ receptor engagement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(27) :10966–71.
- [Li and Ravetch, 2013] Li, F. and Ravetch, J. V. (2013). Antitumor activities of agonistic anti-TNFR antibodies require differential FcγRIIB coengagement in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(48) :19501–6.
- [Li et al., 2008] Li, J., Knee, D. A., Wang, Y., Zhang, Q., Johnson, J. A., Cheng, J., He, H., Miller, C., Li, Z., Kowal, C., Eckman, III, J., Tang, B., Yuan, J., Chen, L., Deveraux, Q., Nasoff, M. S., and Stover, D. (2008). LBY135, a novel anti-DR5 agonistic antibody induces tumor cell-specific cytotoxic activity in human colon tumor cell lines and xenografts. *Drug Development Research*, 69(2) :69–82.
- [Li et al., 2016] Li, L., Wen, X. Z., Bu, Z. D., Cheng, X. J., Xing, X. F., Wang, X. H., Zhang, L. H., Guo, T., Du, H., Hu, Y., Fan, B., and Ji, J. F. (2016). Paclitaxel enhances tumoricidal potential of TRAIL via inhibition of MAPK in resistant gastric cancer cells. *Oncology Reports*, 35(5) :3009–3017.
- [Li et al., 2012] Li, M., Wu, Y., Qiu, Y., Yao, Z., Liu, S., Liu, Y., Shi, J., and Zheng, D. (2012). 2A peptide-based, lentivirus-mediated anti-death receptor 5 chimeric antibody expression prevents tumor growth in nude mice. *Mol Ther*, 20(1) :46–53.
- [Li et al., 1997] Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. D. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4) :479–489.
- [Li et al., 2013] Li, W., Wang, S., and Lu, S. (2013). Pilot study on the use of DNA priming immunization to enhance y. pestis LcrV-Specific B cell responses elicited by a recombinant LcrV protein vaccine. *Vaccines (Basel)*, 2(1) :36–48.
- [Lim et al., 2015] Lim, B., Allen, J. E., Prabhu, V. V., Talekar, M. K., Finnberg, N. K., and El-Deiry, W. S. (2015). Targeting TRAIL in the treatment of cancer : new developments. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 19(9) :1171–1185.
- [Lim and Levy, 2014] Lim, S. H. and Levy, R. (2014). Translational medicine in action : anti-CD20 therapy in lymphoma. *J Immunol*, 193(4) :1519–24.
- [Lin et al., 2015] Lin, C. W., Tsai, M. H., Li, S. T., Tsai, T. I., Chu, K. C., Liu, Y. C., Lai, M. Y., Wu, C. Y., Tseng, Y. C., Shivatare, S. S., Wang, C. H., Chao, P., Wang, S. Y., Shih, H. W., Zeng, Y. F., You, T. H., Liao, J. Y., Tu, Y. C., Lin, Y. S., Chuang, H. Y., Chen, C. L., Tsai, C. S., Huang, C. C., Lin, N. H., Ma, C., Wu, C. Y., and Wong, C. H. (2015). A common glycan structure on immunoglobulin g for enhancement of

- effector functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(34) :10611–10616.
- [Lin et al., 2018] Lin, G., Zhang, Y., Zhu, C., Chu, C., Shi, Y., Pang, X., Ren, E., Wu, Y., Mi, P., Xia, H., Chen, X., and Liu, G. (2018). Photo-excitable hybrid nanocomposites for image-guided photo/TRAIL synergistic cancer therapy. *Biomaterials*, 176 :60–70.
- [Lin et al., 2010] Lin, Z. H., Jin, A., Ozawa, T., Tajiri, K., Obata, T., Ishida, I., Jin, F., Kishi, H., and Muraguchi, A. (2010). Post-translational modification of TRAIL receptor type 1 on various tumor cells and the susceptibility of tumors to TRAIL-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 395(2) :251–257.
- [Ling et al., 2006] Ling, J., Herbst, R. S., Mendelson, D. S., Eckhardt, S. G., O’Dwyer, P., Ebbinghaus, S., Osborne, R., Cheu, M., Lieberman, G., and Lum, B. L. (2006). Apo2L/TRAIL pharmacokinetics in a phase 1a trial in advanced cancer and lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 24(18) :132s–132s.
- [Littlefield, 1964] Littlefield, J. W. (1964). Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science*, 145(3633) :709–10.
- [Liu et al., 2018] Liu, C. P., Tsai, T. I., Cheng, T., Shivatare, V. S., Wu, C. Y., Wu, C. Y., and Wong, C. H. (2018). Glycoengineering of antibody (herceptin) through yeast expression and in vitro enzymatic glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(4) :720–725.
- [Liu et al., 1999] Liu, F., Song, Y., and Liu, D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther*, 6(7) :1258–66.
- [Liu et al., 2006] Liu, H., Bulseco, G. G., and Sun, J. (2006). Effect of posttranslational modifications on the thermal stability of a recombinant monoclonal antibody. *Immunol Lett*, 106(2) :144–53.
- [Liu et al., 2013] Liu, H., Han, Y., Fu, H., Liu, M., Wu, J., Chen, X., Zhang, S., and Chen, Y. (2013). Construction and expression of sTRAIL-melittin combining enhanced anticancer activity with antibacterial activity in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97(7) :2877–84.
- [Liu et al., 2010] Liu, L., Tian, Y., Gao, N., Chen, Z., Zhang, H., and An, J. (2010). Application of antibodies against nonstructural protein 2b of dengue serotype 2 virus induced by DNA immunisation or recombinant protein NS 2B immunisation in BALB/c mice. *J Virol Methods*, 163(1) :10–6.
- [Liu et al., 2015a] Liu, S., Shi, D., Wang, H. C., Yu, Y. Z., Xu, Q., and Sun, Z. W. (2015a). Co-immunization with DNA and protein mixture : a safe and efficacious immunotherapeutic strategy for alzheimer’s disease in PDAPP mice. *Sci Rep*, 5 :7771.
- [Liu et al., 2001] Liu, S., Yu, Y., Zhang, M., Wang, W., and Cao, X. (2001). The involvement of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand in the enhanced cytotoxicity of IFN-beta-stimulated human dendritic cells to tumor cells. *J Immunol*, 166(9) :5407–15.
- [Liu et al., 2015b] Liu, S. D., Chalouni, C., Young, J. C., Junttila, T. T., Sliwkowski, M. X., and Lowe, J. B. (2015b). Afucosylated antibodies increase activation of Fc gamma RIIIa-dependent signaling components to intensify processes promoting ADCC. *Cancer Immunology Research*, 3(2) :173–183.
- [Liu et al., 2016] Liu, S. Y., Wang, S. X., and Lu, S. (2016). DNA immunization as a technology platform for monoclonal antibody induction. *Emerging Microbes and Infections*, 5.

- [Locksley et al., 2001] Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies : integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4) :487–501.
- [Lonberg, 2005] Lonberg, N. (2005). Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol*, 23(9) :1117–25.
- [Lopez et al., 2018] Lopez, T., Chuan, C., Ramirez, A., Chen, K. E., Lorenson, M. Y., Benitez, C., Mustafa, Z., Pham, H., Sanchez, R., Walker, A. M., and Ge, X. (2018). Epitope specific affinity maturation improved stability of potent protease inhibitory antibodies. *Biotechnol Bioeng*, 115(11) :2673–2682.
- [LoRusso, 2007] LoRusso, P.M.;Hong, D. E. R. D. M.-L. J. C. H. R. (2007). First-in-human study of AMG 655, a pro-apoptotic TRAIL receptor-2 agonist, in adult patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*, 25((18s) : abstr 3534).
- [Lub-de Hooge et al., 2005] Lub-de Hooge, M. N., de Vries, E. G. E., de Jong, S., and Bijl, M. (2005). Soluble TRAIL concentrations are raised in patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(6) :854–858.
- [Luo et al., 1998] Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. D. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94(4) :481–490.
- [Luster et al., 2009] Luster, T. A., Carrel, J. A., McCormick, K., Sun, D., and Humphreys, R. (2009). Mapatumumab and Lexatumumab induce apoptosis in TRAIL-R1 and TRAIL-R2 antibody-resistant NSCLC cell lines when treated in combination with bortezomib. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(2) :292–302.
- [Lyseng-Williamson and Robinson, 2006] Lyseng-Williamson, K. A. and Robinson, D. M. (2006). Spotlight on Bevacizumab in advanced colorectal cancer, breast cancer, and non-small cell lung cancer. *BioDrugs*, 20(3) :193–5.
- [Ma et al., 2012] Ma, R., Zhao, J., Du, H. C., Tian, S., and Li, L. W. (2012). Removing endotoxin from plasmid samples by Triton X-114 isothermal extraction. *Analytical Biochemistry*, 424(2) :124–126.
- [Maadi et al., 2018] Maadi, H., Nami, B., Tong, J., Li, G., and Wang, Z. (2018). The effects of Trastuzumab on HER2-mediated cell signaling in CHO cells expressing human HER2. *BMC Cancer*, 18(1) :238.
- [MacFarlane et al., 1997] MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G. M., and Alnemri, E. S. (1997). Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem*, 272(41) :25417–20.
- [MacFarlane et al., 2005] MacFarlane, M., Inoue, S., Kohlhaas, S. L., Majid, A., Harper, N., Kennedy, D. B. J., Dyer, M. J. S., and Cohen, G. M. (2005). Chronic lymphocytic leukemic cells exhibit apoptotic signaling via TRAIL-R1. *Cell Death and Differentiation*, 12(7) :773–782.
- [Macher-Goeppinger et al., 2009] Macher-Goeppinger, S., Aulmann, S., Tagscherer, K. E., Wagener, N., Haferkamp, A., Penzel, R., Brauckhoff, A., Hohenfellner, M., Sykora, J., Walczak, H., Teh, B. T., Autschbach, F., Herpel, E., Schirmacher, P., and Roth, W. (2009). Prognostic value of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors in renal cell cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(2) :650–659.
- [Maddipatla et al., 2007] Maddipatla, S., Hernandez-Ilizaliturri, F. J., Knight, J., and Czuczman, M. S. (2007). Augmented antitumor activity against b-cell lymphoma by a

- combination of monoclonal antibodies targeting TRAIL-R1 and CD20. *Clinical Cancer Research*, 13(15) :4556–4564.
- [Majkut et al., 2014] Majkut, J., Sgobba, M., Holohan, C., Crawford, N., Logan, A. E., Kerr, E., Higgins, C. A., Redmond, K. L., Riley, J. S., Stasik, I., Fennell, D. A., Van Schaeybroeck, S., Haider, S., Johnston, P. G., Haigh, D., and Longley, D. B. (2014). Differential affinity of FLIP and procaspase 8 for FADD’s DED binding surfaces regulates DISC assembly. *Nature Communications*, 5.
- [Maloney et al., 1997] Maloney, D. G., GrilloLopez, A. J., White, C. A., Bodkin, D., Schilder, R. J., Neidhart, J. A., Janakiraman, N., Foon, K. A., Liles, T. M., Dallaire, B. K., Wey, K., Royston, I., Davis, T., and Levy, R. (1997). Idec-c2b8 (rituximab) anti-cd20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-hodgkin’s lymphoma. *Blood*, 90(6) :2188–2195.
- [Marasco and Sui, 2007] Marasco, W. A. and Sui, J. (2007). The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nat Biotechnol*, 25(12) :1421–34.
- [Marconi et al., 2013] Marconi, M., Ascione, B., Ciarlo, L., Vona, R., Garofalo, T., Sorice, M., Gianni, A. M., Locatelli, S. L., Carlo-Stella, C., Malorni, W., and Matarrese, P. (2013). Constitutive localization of DR4 in lipid rafts is mandatory for TRAIL-induced apoptosis in B-cell hematologic malignancies. *Cell Death and Disease*, 4.
- [Marini et al., 2006] Marini, P., Denzinger, S., Schiller, D., Kauder, S., Welz, S., Humphreys, R., Daniel, P. T., Jendrossek, V., Budach, W., and Belka, C. (2006). Combined treatment of colorectal tumours with agonistic TRAIL receptor antibodies HGS-ETR1 and HGS-ETR2 and radiotherapy : enhanced effects in vitro and dose-dependent growth delay in vivo. *Oncogene*, 25(37) :5145–5154.
- [Marjaneh et al., 2018] Marjaneh, R. M., Hassanian, S. M., Ghobadi, N., Ferns, G. A., Karimi, A., Jazayeri, M. H., Nasiri, M., Avan, A., and Khazaei, M. (2018). Targeting the death receptor signaling pathway as a potential therapeutic target in the treatment of colorectal cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 233(10) :6538–6549.
- [Marsters et al., 1997] Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A. D., Godowski, P., and Ashkenazi, A. (1997). A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol*, 7(12) :1003–6.
- [Maude et al., 2014] Maude, S. L., Frey, N., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Bunin, N. J., Chew, A., Gonzalez, V. E., Zheng, Z., Lacey, S. F., Mahnke, Y. D., Melenhorst, J. J., Rheingold, S. R., Shen, A., Teachey, D. T., Levine, B. L., June, C. H., Porter, D. L., and Grupp, S. A. (2014). Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*, 371(16) :1507–17.
- [MCCANN et al., 1988] MCCANN, M., JAMES, K., and KUMPEL, B. (1988). Production and use of human monoclonal anti-D antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 115(1) :3–15.
- [Meek, 1990] Meek, K. (1990). Analysis of junctional diversity during b lymphocyte development. *Science*, 250(4982) :820–3.
- [Meijerink et al., 1998] Meijerink, J., Mensink, E., Wang, K., Sedlak, T., Sloetjes, A., de Witte, T., Waksman, G., and Korsmeyer, S. (1998). Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of Bax. *Blood*, 91(8) :2991–2997.
- [Melero et al., 2013] Melero, I., Hirschhorn-Cymerman, D., Morales-Kastresana, A., Sanmamed, M. F., and Wolchok, J. D. (2013). Agonist antibodies to TNFR molecules that costimulate T and NK cells. *Clinical Cancer Research*, 19(5) :1044–1053.

- [Meng et al., 2000] Meng, R. D., McDonald, E. R., Sheikh, M. S., Fornace, A. J., and El-Deiry, W. S. (2000). The TRAIL decoy receptor TRUNDD (DcR2, TRAIL-R4) is induced by adenovirus-p53 overexpression and can delay TRAIL-, p53-, and KILLER/DR5-dependent colon cancer apoptosis. *Molecular Therapy*, 1(2) :130–144.
- [Merchant et al., 2012] Merchant, M. S., Geller, J. I., Baird, K., Chou, A. J., Galli, S., Charles, A., Amaoko, M., Rhee, E. H., Price, A., Wexler, L. H., Meyers, P. A., Widemann, B. C., Tsokos, M., and Mackall, C. L. (2012). Phase I trial and pharmacokinetic study of Lexatumumab in pediatric patients with solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 30(33) :4141–4147.
- [Merino et al., 2006] Merino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E., and Micheau, O. (2006). Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Molecular and Cellular Biology*, 26(19) :7046–7055.
- [Michaelson et al., 2009] Michaelson, J. S., Demarest, S. J., Miller, B., Amatucci, A., Snyder, W. B., Wu, X. F., Huang, F., Phan, S., Gao, S., Doern, A., Farrington, G. K., Lugovskoy, A., Joseph, I., Bailly, V., Wang, X., Garber, E., Browning, J., and Glaser, S. M. (2009). Anti-tumor activity of stability-engineered IgG-like bispecific antibodies targeting TRAIL-R2 and LT beta R. *Mabs*, 1(2) :128–141.
- [Micheau, 2018] Micheau, O. (2018). Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand signaling by glycosylation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3).
- [Micheau et al., 2013] Micheau, O., Shirley, S., and Dufour, F. (2013). Death receptors as targets in cancer. *British Journal of Pharmacology*, 169(8) :1723–1744.
- [Micheau and Tschopp, 2003] Micheau, O. and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 114(2) :181–190.
- [Milani et al., 2003] Milani, D., Zauli, G., Rimondi, E., Celeghini, C., Marmiroli, S., Narducci, P., Capitani, S., and Secchiero, P. (2003). Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sequentially activates pro-survival and pro-apoptotic pathways in SK-N-MC neuronal cells. *Journal of Neurochemistry*, 86(1) :126–135.
- [Miller et al., 1982] Miller, R. A., Maloney, D. G., Warnke, R., and Levy, R. (1982). Treatment of b-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotype antibody. *N Engl J Med*, 306(9) :517–22.
- [Milutinovic et al., 2016] Milutinovic, S., Kashyap, A. K., Yanagi, T., Wimer, C., Zhou, S., O’Neil, R., Kurtzman, A. L., Faynboym, A., Xu, L., Hannum, C. H., Diaz, P. W., Matsuzawa, S., Horowitz, M., Horowitz, L., Bhatt, R. R., and Reed, J. C. (2016). Dual agonist surrobody simultaneously activates death receptors DR4 and DR5 to induce cancer cell death. *Mol Cancer Ther*, 15(1) :114–24.
- [Mimoto et al., 2013] Mimoto, F., Katada, H., Kadono, S., Igawa, T., Kuramochi, T., Muraoka, M., Wada, Y., Haraya, K., Miyazaki, T., and Hattori, K. (2013). Engineered antibody Fc variant with selectively enhanced FcRIIb binding over both FcRIIa(R131) and FcRIIa(H131). *Protein Engineering Design & Selection*, 26(10) :589–598.
- [Mirandola et al., 2004] Mirandola, P., Ponti, C., Gobbi, G., Sponzilli, I., Vaccarezza, M., Cocco, L., Zauli, G., Secchiero, P., Manzoli, F. A., and Vitale, M. (2004). Activated human NK and CD8(+) T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. *Blood*, 104(8) :2418–2424.

- [Mom et al., 2009] Mom, C. H., Verweij, J., Oldenhuis, C. N. A. M., Gietema, J. A., Fox, N. L., Miceli, R., Eskens, F. A. L. M., Loos, W. J., de Vries, E. G. E., and Sleijfer, S. (2009). Mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets TRAIL-R1, in combination with gemcitabine and cisplatin : a phase I study. *Clinical Cancer Research*, 15(17) :5584–5590.
- [Mongkolsapaya et al., 1999] Mongkolsapaya, J., Grimes, J. M., Chen, N., Xu, X. N., Stuart, D. I., Jones, E. Y., and Screaton, G. R. (1999). Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nat Struct Biol*, 6(11) :1048–53.
- [Moolten and Cooperband, 1970] Moolten, F. L. and Cooperband, S. R. (1970). Selective destruction of target cells by diphtheria toxin conjugated to antibody directed against antigens on the cells. *Science*, 169(3940) :68–70.
- [Morel et al., 2004] Morel, P. A., Falkner, D., Plowey, J., Larregina, A. T., and Falo, L. D. (2004). DNA immunisation : altering the cellular localisation of expressed protein and the immunisation route allows manipulation of the immune response. *Vaccine*, 22(3-4) :447–56.
- [Morizot et al., 2011] Morizot, A., Merino, D., Lalaoui, N., Jacquemin, G., Granci, V., Iessi, E., Lanneau, D., Bouyer, F., Solary, E., Chauffert, B., Saas, P., Garrido, C., and Micheau, O. (2011). Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level. *Cell Death and Differentiation*, 18(4) :700–711.
- [Morle et al., 2015] Morle, A., Garrido, C., and Micheau, O. (2015). Hyperthermia restores apoptosis induced by death receptors through aggregation-induced c-FLIP cytosolic depletion. *Cell Death Dis*, 6 :e1633.
- [Morrison et al., 1984] Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A., and Oi, V. T. (1984). Chimeric human antibody molecules : mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(21) :6851–5.
- [Motoki et al., 2005] Motoki, K., Mori, E., Matsumoto, A., Thomas, M., Tomura, T., Humphreys, R., Albert, V., Muto, M., Yoshida, H., Aoki, M., Tamada, T., Kuroki, R., Yoshida, H., Ishida, I., Ware, C., and Kataoka, S. (2005). Enhanced apoptosis and tumor regression induced by a direct agonist antibody to tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand receptor 2. *Clinical Cancer Research*, 11(8) :3126–3135.
- [Muhlenbeck et al., 2000] Muhlenbeck, F., Schneider, P., Bodmer, J. L., Schwenzer, R., Hauser, A., Schubert, G., Scheurich, P., Moosmayer, D., Tschopp, J., and Wajant, H. (2000). The tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have distinct cross-linking requirements for initiation of apoptosis and are non-redundant in JNK activation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(41) :32208–32213.
- [Mukai et al., 2010] Mukai, Y., Nakamura, T., Yoshikawa, M., Yoshioka, Y., Tsunoda, S., Nakagawa, S., Yamagata, Y., and Tsutsumi, Y. (2010). Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex. *Science Signaling*, 3(148).
- [Mundae and Ostor, 2010] Mundae, M. K. and Ostor, A. J. K. (2010). The long road of biopharmaceutical drug development : from inception to marketing. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*, 103(1) :3–7.
- [Murali and Greene, 2012] Murali, R. and Greene, M. I. (2012). Structure based antibody-like peptidomimetics. *Pharmaceuticals (Basel)*, 5(2) :209–35.

- [Nabel et al., 1990] Nabel, E. G., Plautz, G., and Nabel, G. J. (1990). Site-specific gene expression in vivo by direct gene transfer into the arterial wall. *Science*, 249(4974) :1285–8.
- [Nagane et al., 2010] Nagane, M., Shimizu, S., Mori, E., Kataoka, S., and Shiokawa, Y. (2010). Predominant antitumor effects by fully human anti-TRAIL-receptor2 (DR5) monoclonal antibodies in human glioma cells in vitro and in vivo. *Neuro-Oncology*, 12(7) :687–700.
- [Nagata, 1997] Nagata, S. (1997). Apoptosis induced by a death factor. *Faseb Journal*, 11(9) :A857–A857.
- [Nagata et al., 2003] Nagata, S., Salvatore, G., and Pastan, I. (2003). DNA immunization followed by a single boost with cells : a protein-free immunization protocol for production of monoclonal antibodies against the native form of membrane proteins. *Journal of Immunological Methods*, 280(1-2) :59–72.
- [Nagorsen et al., 2012] Nagorsen, D., Kufer, P., Baeuerle, P. A., and Bargou, R. (2012). Blinatumomab : A historical perspective. *Pharmacology & Therapeutics*, 136(3) :334–342.
- [Naismith et al., 1996] Naismith, J. H., Devine, T. Q., Kohno, T., and Sprang, S. R. (1996). Structures of the extracellular domain of the type I tumor necrosis factor receptor. *Structure*, 4(11) :1251–62.
- [Naoum et al., 2017] Naoum, G. E., Buchsbaum, D. J., Tawadros, F., Farooqi, A., and Arafat, W. O. (2017). Journey of TRAIL from bench to bedside and its potential role in immuno-oncology. *Oncology Reviews*, 11(1) :26–42.
- [Natoni et al., 2007] Natoni, A., MacFarlane, M., Inoue, S., Walewska, R., Majid, A., Knee, D., Stover, D. R., Dyer, M. J. S., and Cohen, G. M. (2007). TRAIL signals to apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells primarily through TRAIL-R1 whereas cross-linked agonistic TRAIL-R2 antibodies facilitate signalling via TRAIL-R2. *British Journal of Haematology*, 139(4) :568–577.
- [Nemazee, 2017] Nemazee, D. (2017). Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol*, 17(5) :281–294.
- [Neumann et al., 2012] Neumann, S., Bidon, T., Branschadel, M., Krippner-Heidenreich, A., Scheurich, P., and Doszczak, M. (2012). The transmembrane domains of TNF-Related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptors 1 and 2 co-regulate apoptotic signaling capacity. *Plos One*, 7(8).
- [Neumann et al., 2014] Neumann, S., Hasenauer, J., Pollak, N., and Scheurich, P. (2014). Dominant negative effects of tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor 4 on TRAIL receptor 1 signaling by formation of heteromeric complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 289(23) :16576–16587.
- [Ni et al., 2004] Ni, Y., Ma, K., Ni, J., Zheng, X., Wang, Y., and Xiong, S. (2004). A rapid and simple approach to preparation of monoclonal antibody based on DNA immunization. *Cell Mol Immunol*, 1(4) :295–9.
- [Nimmerjahn and Ravetch, 2008] Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. (2008). Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 8(1) :34–47.
- [Nimmerjahn and Ravetch, 2012] Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. (2012). Translating basic mechanisms of IgG effector activity into next generation cancer therapies. *Cancer Immunol*, 12 :13.

- [Niwa et al., 1991] Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 108(2) :193–199.
- [Niwa and Satoh, 2015] Niwa, R. and Satoh, M. (2015). The current status and prospects of antibody engineering for therapeutic use : Focus on glycoengineering technology. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(3) :930–941.
- [Oganesyan et al., 2008] Oganesyan, V., Gao, C., Shirinian, L., Wu, H., and Dall’Acqua, W. F. (2008). Structural characterization of a human Fc fragment engineered for lack of effector functions. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 64 :700–704.
- [Ogasawara et al., 1993] Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T., and Nagata, S. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*, 364(6440) :806–9.
- [O’Leary et al., 2016] O’Leary, L., van der Sloot, A. M., Reis, C. R., Deegan, S., Ryan, A. E., Dhimi, S. P. S., Murillo, L. S., Cool, R. H., de Sampaio, P. C., Thompson, K., Murphy, G., Quax, W. J., Serrano, L., Samali, A., and Szegezdi, E. (2016). Decoy receptors block TRAIL sensitivity at a supracellular level : the role of stromal cells in controlling tumour TRAIL sensitivity. *Oncogene*, 35(10) :1261–1270.
- [Omran and Ata, 2014] Omran, O. M. and Ata, H. S. (2014). Expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand death receptors DR4 and DR5 in human nonmelanoma skin cancer. *Am J Dermatopathol*, 36(9) :710–7.
- [Ouyang et al., 2018] Ouyang, X. N., Shi, M. Q., Jie, F. W., Bai, Y. X., Shen, P., Yu, Z., Wang, X. W., Huang, C., Tao, M., Wang, Z. H., Xie, C. H., Wu, Q., Shu, Y. Q., Han, B. H., Zhang, F. C., Zhang, Y. P., Hu, C. H., Ma, X. T., Liang, Y. J., Wang, A. L., Lu, B., Shi, Y., Chen, J. F., Zhuang, Z. X., Wang, J. J., Huang, J. J., Wang, C. H., Bai, C. X., Zhou, X., Li, Q., Chen, F., Yu, H., and Feng, J. F. (2018). Phase III study of dulanermin (recombinant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand) combined with vinorelbine and cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Investigational New Drugs*, 36(2) :315–322.
- [Palacios et al., 2006] Palacios, C., Yerbes, R., and Lopez-Rivas, A. (2006). Flavopiridol induces cellular FLICE-inhibitory protein degradation by the proteasome and promotes TRAIL-induced early signaling and apoptosis in breast tumor cells. *Cancer Research*, 66(17) :8858–8869.
- [Pammolli et al., 2011] Pammolli, F., Magazzini, L., and Riccaboni, M. (2011). The productivity crisis in pharmaceutical r&d. *Nat Rev Drug Discov*, 10(6) :428–38.
- [Pan et al., 1997] Pan, G. H., ORourke, K., Chinnaiyan, A. M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., and Dixit, V. M. (1997). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*, 276(5309) :111–113.
- [Pan et al., 2015] Pan, L. Q., Zhao, W. B., Lai, J., Ding, D., Wei, X. Y., Li, Y. Y., Liu, W. H., Yang, X. Y., Xu, Y. C., and Chen, S. Q. (2015). Hetero-modification of TRAIL trimer for improved drug delivery and in vivo antitumor activities. *Scientific Reports*, 5.
- [Paoletti et al., 2015] Paoletti, C., Li, Y. F., Muniz, M. C., Kidwell, K. M., Aung, K., Thomas, D. G., Brown, M. E., Abramson, V. G., Irvin, W. J., Lin, N. U., Liu, M. C., Nanda, R., Nangia, J. R., Storniolo, A. M., Traina, T. A., Vaklavas, C., Van Poznak, C. H., Wolff, A. C., Forero-Torres, A., Hayes, D. F., and Tbcrc (2015). Significance of circulating tumor cells in metastatic triple-negative breast cancer patients within a randomized, phase II trial : TBCRC 019. *Clinical Cancer Research*, 21(12) :2771–2779.

- [Papadopoulos et al., 2015] Papadopoulos, K. P., Isaacs, R., Bilic, S., Kentsch, K., Huet, H. A., Hofmann, M., Rasco, D., Kundamal, N., Tang, Z. W., Cooksey, J., and Mahipal, A. (2015). Unexpected hepatotoxicity in a phase I study of TAS266, a novel tetravalent agonistic nanobody(A (R)) targeting the DR5 receptor. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 75(5) :887–895.
- [Parlato et al., 2000] Parlato, S., Giammarioli, A. M., Logozzi, M., Lozupone, F., Matarrese, P., Luciani, F., Falchi, M., Malorni, W., and Fais, S. (2000). CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes : a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway. *Embo Journal*, 19(19) :5123–5134.
- [Pauling, 1940] Pauling, L. (1940). A theory of the structure and process of formation of antibodies. *Journal of the American Chemical Society*, 62(10) :2643–2657.
- [Pelletier et al., 1988] Pelletier, B., Dhainaut, F., Pauly, A., and Zahnd, J. (1988). Evaluation of growth rate in adhering cell-cultures using a simple colorimetric method. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 16(1) :63–73.
- [Pespeni et al., 2007] Pespeni, M. H., Hodnett, M., Abayasiriwardana, K. S., Roux, J., Howard, M., Broaddus, V. C., and Pittet, J. F. (2007). Sensitization of mesothelioma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by heat stress via the inhibition of the 3-phosphoinositide-dependent kinase 1/ Akt pathway. *Cancer Research*, 67(6) :2865–2871.
- [Peter and Krammer, 2003] Peter, M. E. and Krammer, P. H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death and Differentiation*, 10(1) :26–35.
- [Petkova et al., 2006] Petkova, S. B., Akilesh, S., Sproule, T. J., Christianson, G. J., Al Khabbaz, H., Brown, A. C., Presta, L. G., Meng, Y. G., and Roopenian, D. C. (2006). Enhanced half-life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized fern mouse model : potential application in humorally mediated autoimmune disease. *International Immunology*, 18(12) :1759–1769.
- [Piao et al., 2016] Piao, X. H., Ozawa, T., Hamana, H., Shitaoka, K., Jin, A. S., Kishi, H., and Muraguchi, A. (2016). TRAIL-receptor 1 IgM antibodies strongly induce apoptosis in human cancer cells in vitro and in vivo. *Oncoimmunology*, 5(5).
- [Piechocki et al., 2012] Piechocki, M. P., Wu, G. S., Jones, R. F., Jacob, J. B., Gibson, H., Ethier, S. P., Abrams, J., Yagita, H., Venuprasad, K., and Wei, W.-Z. (2012). Induction of proapoptotic antibodies to triple-negative breast cancer by vaccination with TRAIL death receptor DR5 DNA. *International Journal Of Cancer*, 131(11) :2562–2572.
- [Pieczykolan et al., 2014] Pieczykolan, J. S., Kubinski, K., Maslyk, M., Pawlak, S. D., Pieczykolan, A., Rozga, P. K., Szymanik, M., Galazka, M., Teska-Kaminska, M., Zerek, B., Bukato, K., Poleszak, K., Jaworski, A., Stozek, W., Swider, R., and Zielinski, R. (2014). AD-O53.2-a novel recombinant fusion protein combining the activities of TRAIL/Apo2L and Smac/Diablo, overcomes resistance of human cancer cells to TRAIL/Apo2L. *Investigational New Drugs*, 32(6) :1155–1166.
- [Plummer et al., 2007] Plummer, R., Attard, G., Pacey, S., Li, L., Razak, A., Perrett, R., Barrett, M., Judson, I., Kaye, S., Fox, N. L., Halpern, W., Corey, A., Calvert, H., and De Bono, J. (2007). Phase 1 and pharmacokinetic study of Lexatumumab in patients with advanced cancers. *Clinical Cancer Research*, 13(20) :6187–6194.
- [Polakis, 2016] Polakis, P. (2016). Antibody drug conjugates for cancer therapy. *Pharmacol Rev*, 68(1) :3–19.
- [Porter, 1959] Porter, R. R. (1959). The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J*, 73 :119–26.

- [Pukac et al., 2005] Pukac, L., Kanakaraj, P., Humphreys, R., Alderson, R., Bloom, M., Sung, C., Riccobene, T., Johnson, R., Fiscella, M., Mahoney, A., Carrell, J., Boyd, E., Yao, X. T., Zhang, L., Zhong, L., von Kerczek, A., Shepard, L., Vaughan, T., Edwards, B., Dobson, C., Salcedo, T., and Albert, V. (2005). HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types in vitro and in vivo. *British Journal of Cancer*, 92(8) :1430–1441.
- [Qiao et al., 2012] Qiao, C. X., Hu, M. Y., Guo, L. M., Lv, M., Lin, Z., Geng, J., Lang, X. L., Li, X. Y., Li, Y., Ma, Y. F., Feng, J. N., and Shen, B. F. (2012). Structural basis of LaDR5, a novel agonistic anti-death receptor 5 (DR5) monoclonal antibody, to inhibit DR5/TRAIL complex formation. *BMC Immunology*, 13(40).
- [Qiu et al., 2012] Qiu, Y. H., Zhang, Z. X., Shi, J., Liu, S. L., Liu, Y. X., and Zheng, D. X. (2012). A novel anti-DR5 chimeric antibody and epirubicin synergistically suppress tumor growth. *Iubmb Life*, 64(9) :757–765.
- [Quintavalle and Condorelli, 2012] Quintavalle, C. and Condorelli, G. (2012). Dulanermin in cancer therapy : still much to do. *Transl Lung Cancer Res*, 1(2) :158–9.
- [Raghunathan et al., 2012] Raghunathan, G., Smart, J., Williams, J., and Almagro, J. C. (2012). Antigen-binding site anatomy and somatic mutations in antibodies that recognize different types of antigens. *Journal of Molecular Recognition*, 25(3) :103–113.
- [Ramamurthy et al., 2015] Ramamurthy, V., Yamniuk, A. P., Lawrence, E. J., Yong, W., Schneeweis, L. A., Cheng, L., Murdock, M., Corbett, M. J., Doyle, M. L., and Sheriff, S. (2015). The structure of the death receptor 4-TNF-related apoptosis-inducing ligand (DR4-TRAIL) complex. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 71(Pt 10) :1273–81.
- [Rath et al., 2015] Rath, T., Baker, K., Dumont, J. A., Peters, R. T., Jiang, H. Y., Qiao, S. W., Lencer, W. I., Pierce, G. F., and Blumberg, R. S. (2015). Fc-fusion proteins and fern : structural insights for longer-lasting and more effective therapeutics. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(2) :235–254.
- [Rattier, 2017] Rattier, T. (2017). *Les rôles des récepteurs à domaines de mort à TRAIL dans l'initiation de l'apoptose et de la motilité induites par TRAIL*. Thesis.
- [Ravi and Bedi, 2002] Ravi, R. and Bedi, A. (2002). Potential methods to circumvent blocks in apoptosis in lymphomas. *Current Opinion in Oncology*, 14(5) :490–503.
- [Reck et al., 2013] Reck, M., Krzakowski, M., Chmielowska, E., Sebastian, M., Hadler, D., Fox, T., Wang, Q., Greenberg, J., Beckman, R. A., and von Pawel, J. (2013). A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 study of Tigatuzumab (CS-1008) in combination with carboplatin/paclitaxel in patients with chemotherapy-naïve metastatic/unresectable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 82(3) :441–448.
- [Redman et al., 2015] Redman, J. M., Hill, E. M., AlDeghaither, D., and Weiner, L. M. (2015). Mechanisms of action of therapeutic antibodies for cancer. *Mol Immunol*, 67(2 Pt A) :28–45.
- [Reff et al., 1994] Reff, M. E., Carner, K., Chambers, K. S., Chinn, P. C., Leonard, J. E., Raab, R., Newman, R. A., Hanna, N., and Anderson, D. R. (1994). Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to cd20. *Blood*, 83(2) :435–45.
- [Ricci et al., 2007] Ricci, M. S., Kim, S. H., Ogi, K., Plastaras, J. P., Ling, J. H., Wang, W., Jin, Z. Y., Liu, Y. Y. Q., Dicker, D. T., Chiao, P. J., Flaherty, K. T., Smith, C. D., and Ei-Deiry, W. S. (2007). Reduction of TRAIL-induced McI-1 and cIAP2 by c-Myc or sorafenib sensitizes resistant human cancer cells to TRAIL-induced death. *Cancer Cell*, 12(1) :66–80.

- [Richards et al., 2008] Richards, J. O., Karki, S., Lazar, G. A., Chen, H., Dang, W., and Desjarlais, J. R. (2008). Optimization of antibody binding to fcgammariia enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther*, 7(8) :2517–27.
- [Riley et al., 2013] Riley, J. S., Hutchinson, R., Mcart, D. G., Crawford, N., Holohan, C., Paul, I., Van Schaeuybroeck, S., Salto-Tellez, M., Johnston, P. G., Fennell, D. A., Gately, K., O’Byrne, K., Cummins, R., Kay, E., Hamilton, P., Stasik, I., and Longley, D. B. (2013). Prognostic and therapeutic relevance of FLIP and procaspase-8 overexpression in non-small cell lung cancer. *Cell Death and Disease*, 4.
- [Rogers et al., 2014] Rogers, L. M., Veeramani, S., and Weiner, G. J. (2014). Complement in monoclonal antibody therapy of cancer. *Immunologic Research*, 59(1-3, SI) :203–210.
- [Rubbo and Suri, 1962] Rubbo, S. D. and Suri, J. C. (1962). Passive immunization against tetanus with human immune globulin. *Br Med J*, 2(5297) :79–81.
- [Ruddle et al., 1990] Ruddle, N. H., Bergman, C. M., McGrath, K. M., Lingenheld, E. G., Grunnet, M. L., Padula, S. J., and Clark, R. B. (1990). An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med*, 172(4) :1193–200.
- [Sadelain et al., 2009] Sadelain, M., Brentjens, R., and Riviere, I. (2009). The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr Opin Immunol*, 21(2) :215–23.
- [Sadelain et al., 2017] Sadelain, M., RiviSre, I., and Riddell, S. (2017). Therapeutic T cell engineering. *Nature*, 545(7655) :423–431.
- [Sanlioglu et al., 2007] Sanlioglu, A. D., Korcum, A. F., Pestereli, E., Erdogan, G., Karaveli, S., Savas, B., Griffith, T. S., and Sanlioglu, S. (2007). TRAIL death receptor-4 expression positively correlates with the tumor grade in breast cancer patients with invasive ductal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 69(3) :716–23.
- [Sato et al., 2001] Sato, K., Hida, S., Takayanagi, H., Yokochi, T., Kayagaki, N., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K., Tanaka, N., Taniguchi, T., and Ogasawara, K. (2001). Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *European Journal of Immunology*, 31(11) :3138–3146.
- [Scaffidi et al., 1999] Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J. P., Korsmeyer, S. J., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1999). Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274(32) :22532–22538.
- [Schadendorf et al., 2015] Schadendorf, D., Hodi, F. S., Robert, C., Weber, J. S., Margolin, K., Hamid, O., Patt, D., Chen, T. T., Berman, D. M., and Wolchok, J. D. (2015). Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 33(17) :1889–94.
- [Schier et al., 1996] Schier, R., McCall, A., Adams, G. P., Marshall, K. W., Merritt, H., Yim, M., Crawford, R. S., Weiner, L. M., Marks, C., and Marks, J. D. (1996). Isolation of picomolar affinity Anti-c-erbB-2 single-chain fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *Journal of Molecular Biology*, 263(4) :551–567.
- [Schneider et al., 2010] Schneider, B., Munkel, S., Krippner-Heidenreich, A., Grunwald, I., Wels, W. S., Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Gerspach, J. (2010). Potent anti-tumoral activity of TRAIL through generation of tumor-targeted single-chain fusion proteins. *Cell Death and Disease*, 1.
- [Schneider, 2000] Schneider, P. (2000). Production of recombinant TRAIL and TRAIL receptor : Fc chimeric proteins. *Apoptosis*, 322 :325–345.

- [Schneider et al., 1997a] Schneider, P., Bodmer, J. L., Thome, M., Hofmann, K., Holler, N., and Tschopp, J. (1997a). Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Lett*, 416(3) :329–34.
- [Schneider et al., 2003] Schneider, P., Olson, D., Tardivel, A., Browning, B., Lugovskoy, A., Gong, D. H., Dobles, M., Hertig, S., Hofmann, K., Van Vlijmen, H., Hsu, Y. M., Burkly, L. C., Tschopp, J., and Zheng, T. S. (2003). Identification of a new murine tumor necrosis factor receptor locus that contains two novel murine receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Journal of Biological Chemistry*, 278(7) :5444–5454.
- [Schneider et al., 1997b] Schneider, P., Thome, M., Burns, K., Bodmer, J. L., Hofmann, K., Kataoka, T., Holler, N., and Tschopp, J. (1997b). TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity*, 7(6) :831–6.
- [Schneider-Brachert et al., 2004] Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschwander, M., Adam, D., Mentlein, R., Kabelitz, D., and Schutze, S. (2004). Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling : Internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity*, 21(3) :415–428.
- [Schroeder and Cavacini, 2010] Schroeder, H. W., J. and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2) :S41–52.
- [Schug et al., 2011] Schug, Z. T., Gonzalvez, F., Houtkooper, R. H., Vaz, F. M., and Gottlieb, E. (2011). BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane. *Cell Death and Differentiation*, 18(3) :538–548.
- [Schulz et al., 2018] Schulz, M. A., Tian, W. H., Mao, Y., Van Coillie, J., Sun, L. B., Larsen, J. S., Chen, Y. H., Kristensen, C., Vakhrushev, S. Y., Clausen, H., and Yang, Z. (2018). Glycoengineering design options for IgG1 in CHO cells using precise gene editing. *Glycobiology*, 28(7) :542–549.
- [Scott, 2015] Scott, L. J. (2015). Nivolumab : A review in advanced melanoma. *Drugs*, 75(12) :1413–1424.
- [Screaton et al., 1997] Screaton, G. R., Mongkolsapaya, J., Xu, X. N., Cowper, A. E., McMichael, A. J., and Bell, J. I. (1997). TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Current Biology*, 7(9) :693–696.
- [Seal et al., 2008] Seal, S., Hockenbery, D. M., Spaulding, E. Y., Kiem, H. P., Abbassi, N., and Deeg, H. J. (2008). Differential responses of FLIP(long) and FLIP(short)-overexpressing human myeloid leukemia cells to TNF-alpha and TRAIL-initiated apoptotic signals. *Experimental Hematology*, 36(12) :1660–1672.
- [Secchiero et al., 2004] Secchiero, P., Melloni, E., Heikinheimo, M., Mannisto, S., Di Pietro, R., Iacone, A., and Zauli, G. (2004). TRAIL regulates normal erythroid maturation through an ERK-dependent pathway. *Blood*, 103(2) :517–522.
- [Sedger et al., 2002] Sedger, L. M., Glaccum, M. B., Schuh, J. C. L., Kanaly, S. T., Williamson, E., Kayagaki, N., Yun, T., Smolak, P., Le, T., Goodwin, R., and Gliniak, B. (2002). Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. *European Journal of Immunology*, 32(8) :2246–2254.
- [Sedger et al., 1999] Sedger, L. M., Shows, D. M., Blanton, R. A., Peschon, J. J., Goodwin, R. G., Cosman, D., and Wiley, S. R. (1999). IFN-gamma mediates a novel antiviral

- activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *Journal of Immunology*, 163(2) :920–926.
- [Selvarajoo, 2017] Selvarajoo, K. (2017). A systems biology approach to overcome TRAIL resistance in cancer treatment. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 128 :142–154.
- [Sensel et al., 1997] Sensel, M. G., Kane, L. M., and Morrison, S. L. (1997). Amino acid differences in the N-terminus of C(H)2 influence the relative abilities of IgG2 and IgG3 to activate complement. *Molecular Immunology*, 34(14) :1019–1029.
- [Shan et al., 2000] Shan, D. M., Ledbetter, J. A., and Press, O. W. (2000). Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 48(12) :673–683.
- [Sharma and Allison, 2015] Sharma, P. and Allison, J. P. (2015). The future of immune checkpoint therapy. *Science*, 348(6230) :56–61.
- [Sharma et al., 2014] Sharma, S., de Vries, E. G., Infante, J. R., Oldenhuis, C. N., Gietema, J. A., Yang, L., Bilic, S., Parker, K., Goldbrunner, M., Scott, J. W., and Burris, H. A., r. (2014). Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the DR5 antibody LBY135 alone and in combination with capecitabine in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*, 32(1) :135–44.
- [Shedlock and Weiner, 2000] Shedlock, D. J. and Weiner, D. B. (2000). DNA vaccination : antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol*, 68(6) :793–806.
- [Sheridan et al., 1997] Sheridan, J. P., Marsters, S. A., Pitti, R. M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C. L., Baker, K., Wood, W. I., Goddard, A. D., Godowski, P., and Ashkenazi, A. (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*, 277(5327) :818–21.
- [Shields et al., 2002] Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O’Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., Weikert, S. H. A., and Presta, L. G. (2002). Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30) :26733–26740.
- [Shields et al., 2001] Shields, R. L., Namenuk, A. K., Hong, K., Meng, Y. G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J. A., and Presta, L. G. (2001). High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma ri, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem*, 276(9) :6591–604.
- [Shimada et al., 2007] Shimada, O., Wu, X., Jin, X., Nouh, M. A., Fiscella, M., Albert, V., Matsuda, T., and Kakehi, Y. (2007). Human agonistic antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2 induces cytotoxicity and apoptosis in prostate cancer and bladder cancer cells. *Urology*, 69(2) :395–401.
- [Shinkawa et al., 2003] Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M., Hanai, N., and Shitara, K. (2003). 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. *Journal of Biological Chemistry*, 278(5) :3466–3473.
- [Shirley et al., 2011] Shirley, S., Morizot, A., and Micheau, O. (2011). Regulating TRAIL receptor-induced cell death at the membrane : A deadly discussion. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 6(3) :311–323.

- [Shivange et al., 2018] Shivange, G., Urbanek, K., Przanowski, P., Perry, J. S. A., Jones, J., Haggart, R., Kostka, C., Patki, T., Stelow, E., Petrova, Y., Llana, D., Mayo, M., Ravichandran, K. S., Landen, C. N., Bhatnagar, S., and Tushir-Singh, J. (2018). A single-agent dual-specificity targeting of FOLR1 and DR5 as an effective strategy for ovarian cancer. *Cancer Cell*, 34(2) :331–345.
- [Shkreta et al., 2004] Shkreta, L., Talbot, B. G., Diarra, M. S., and Lacasse, P. (2004). Immune responses to a DNA/protein vaccination strategy against staphylococcus aureus induced mastitis in dairy cows. *Vaccine*, 23(1) :114–26.
- [Shrader et al., 2007] Shrader, M., Pino, M. S., Lashinger, L., Bar-Eli, M., Adam, L., Dinney, C. P. N., and McConkey, D. J. (2007). Gefitinib reverses TRAIL resistance in human bladder cancer cell lines via inhibition of Akt-mediated x-linked inhibitor of apoptosis protein expression. *Cancer Research*, 67(4) :1430–1435.
- [Siberil et al., 2006] Siberil, S., de Romeuf, C., Bihoreau, N., Fernandez, N., Meterreau, J. L., Regenman, A., Nony, E., Gaucher, C., Glacet, A., Jorieux, S., Klein, P., Hogarth, M. P., Fridman, W. H., Bourel, D., Beliard, R., and Teillaud, J. L. (2006). Selection of a human anti-RhD monoclonal antibody for therapeutic use : Impact of IgG glycosylation on activating and inhibitory Fc gamma R functions. *Clinical Immunology*, 118(2-3) :170–179.
- [Siegel et al., 2000] Siegel, R. M., Frederiksen, J. K., Zacharias, D. A., Chan, F. K. M., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R. Y., and Lenardo, M. J. (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*, 288(5475) :2354–2357.
- [Siegemund et al., 2016] Siegemund, M., Seifert, O., Zarani, M., Dzinic, T., De Leo, V., Gottsch, D., Munkel, S., Hutt, M., Pfizenmaier, K., and Kontermann, R. E. (2016). An optimized antibody-single-chain TRAIL fusion protein for cancer therapy. *Mabs*, 8(5) :879–891.
- [Signori et al., 2010] Signori, E., Iurescia, S., Massi, E., Fioretti, D., Chiarella, P., De Robertis, M., Rinaldi, M., Tonon, G., and Fazio, V. M. (2010). DNA vaccination strategies for anti-tumour effective gene therapy protocols. *Cancer Immunol Immunother*, 59(10) :1583–91.
- [Sikic et al., 2007] Sikic, B. I., Wakelee, H. A., Von Mehren, M., Lewis, N. L., Plummer, E. R., Calvert, A. H., Fox, N. L., Kumm, E. A., Jones, S. F., and Burris, H. A. (2007). A phase 1b study to assess the safety of Lexatumumab, a human monoclonal antibody that activates TRAIL-R2, in combination with gemcitabine, pemetrexed, doxorubicin or FOLFIRI. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(12) :3454s–3455s.
- [Skerra and Pluckthun, 1988] Skerra, A. and Pluckthun, A. (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. *Science*, 240(4855) :1038–41.
- [Smith et al., 1994] Smith, C. A., Farrah, T., and Goodwin, R. G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins : activation, costimulation, and death. *Cell*, 76(6) :959–62.
- [Smyth et al., 2003] Smyth, M. J., Takeda, K., Hayakawa, Y., Peschon, J. J., van den Brink, M. R. M., and Yagita, H. (2003). Nature’s TRAIL - on a path to cancer immunotherapy. *Immunity*, 18(1) :1–6.
- [Somasekharan et al., 2013] Somasekharan, S. P., Koc, M., Morizot, A., Micheau, O., Sorensen, P. H., Gaide, O., Andera, L., and Martinou, J. C. (2013). TRAIL promotes membrane blebbing, detachment and migration of cells displaying a dysfunctional intrinsic pathway of apoptosis. *Apoptosis*, 18(3) :324–36.

- [Soria et al., 2010] Soria, J. C., Smit, E., Khayat, D., Besse, B., Yang, X. Q., Hsu, C. P., Reese, D., Wiezorek, J., and Blackhall, F. (2010). Phase 1b study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(9) :1527–1533.
- [Spierings et al., 2004] Spierings, D. C., de Vries, E. G., Vellenga, E., van den Heuvel, F. A., Koornstra, J. J., Wesseling, J., Hollema, H., and de Jong, S. (2004). Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(6) :821–831.
- [Sprick et al., 2000] Sprick, M. R., Weigand, M. A., Rieser, E., Rauch, C. T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P. H., and Walczak, H. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*, 12(6) :599–609.
- [Stewart et al., 2011] Stewart, R., Thom, G., Levens, M., Guler-Gane, G., Holgate, R., Rudd, P. M., Webster, C., Jermutus, L., and Lund, J. (2011). A variant human IgG1-Fc mediates improved ADCC. *Protein Eng Des Sel*, 24(9) :671–8.
- [Stone et al., 2010] Stone, K. D., Prussin, C., and Metcalfe, D. D. (2010). Ige, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2) :S73–S80.
- [Strasser, 2005] Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 5(3) :189–200.
- [Strasser et al., 2000] Strasser, A., O’Connor, L., and Dixit, V. M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*, 69 :217–45.
- [Sturgill and Redmond, 2017] Sturgill, E. R. and Redmond, W. L. (2017). TNFR Agonists : A Review of Current Biologics Targeting OX40, 4-1BB, CD27, and GITR. *American Journal of Hematology-Oncology*, 13(11) :4–15.
- [Suda et al., 2007] Suda, T., Gao, X., Stolz, D. B., and Liu, D. (2007). Structural impact of hydrodynamic injection on mouse liver. *Gene Therapy*, 14(2) :129–137.
- [Suda and Liu, 2007] Suda, T. and Liu, D. (2007). Hydrodynamic gene delivery : its principles and applications. *Mol Ther*, 15(12) :2063–9.
- [Suda et al., 1993] Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., and Nagata, S. (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, 75(6) :1169–78.
- [Sun et al., 2001] Sun, S. Y., Yue, P., Zhou, J. Y., Wang, Y., Choi Kim, H. R., Lotan, R., and Wu, G. S. (2001). Overexpression of BCL2 blocks TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 280(3) :788–97.
- [Sun et al., 2011] Sun, W., Nelson, D., Alberts, S. R., Poordad, F., Leong, S., Teitelbaum, U. R., Woods, L., Fox, N., and O’Neil, B. H. (2011). Phase Ib study of Mapatumumab in combination with sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) and chronic viral hepatitis. *Journal of Clinical Oncology*, 29(4).
- [Sung et al., 2010] Sung, B. K., Ravindran, J., Prasad, S., Pandey, M. K., and Aggarwal, B. B. (2010). Gossypol Induces Death Receptor-5 through Activation of the ROS-ERK-CHOP Pathway and Sensitizes Colon Cancer Cells to TRAIL (Retracted article. See vol. 291, pg. 16923, 2016). *Journal of Biological Chemistry*, 285(46) :35418–35427.

- [Sung et al., 2009] Sung, E.-S., Park, K.-J., Lee, S.-H., Jang, Y.-S., Park, S.-K., Park, Y.-H., Kwag, W.-J., Kwon, M.-H., and Kim, Y.-S. (2009). A novel agonistic antibody to human death receptor 4 induces apoptotic cell death in various tumor cells without cytotoxicity in hepatocytes. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(8) :2276–2285.
- [Syed, 2017] Syed, Y. Y. (2017). Durvalumab : First global approval. *Drugs*, 77(12) :1369–1376.
- [Szegezdi et al., 2011] Szegezdi, E., Reis, C. R., van der Sloot, A. M., Natoni, A., O’Reilly, A., Reeve, J., Cool, R. H., O’Dwyer, M., Knapper, S., Serrano, L., Quax, W. J., and Samali, A. (2011). Targeting AML through DR4 with a novel variant of rhTRAIL. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(10) :2216–2231.
- [Takahashi et al., 2013] Takahashi, K., Takeda, K., Saiki, I., Irimura, T., and Hayakawa, Y. (2013). Functional roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-DR5 interaction in B16F10 cells by activating the nuclear factor-kappaB pathway to induce metastatic potential. *Cancer Sci*, 104(5) :558–62.
- [Takatsuka et al., 2011] Takatsuka, S., Sekiguchi, A., Tokunaga, M., Fujimoto, A., and Chiba, J. (2011). Generation of a panel of monoclonal antibodies against atypical chemokine receptor CCX-CKR by DNA immunization. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 63(3) :250–7.
- [Takeda et al., 2001] Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H., and Okumura, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nature Medicine*, 7(1) :94–100.
- [Tamada et al., 2015] Tamada, T., Shinmi, D., Ikeda, M., Yonezawa, Y., Kataoka, S., Kuroki, R., Mori, E., and Motoki, K. (2015). TRAIL-R2 superoligomerization induced by human monoclonal agonistic antibody KMTR2. *Scientific Reports*, 5.
- [Tang et al., 1992] Tang, D. C., Devit, M., and Johnston, S. A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune-response. *Nature*, 356(6365) :152–154.
- [Tao et al., 1993] Tao, M. H., Smith, R. I. F., and Morrison, S. L. (1993). Structural features of human immunoglobulin-G that determine isotype-specific differences in complement activation. *Journal of Experimental Medicine*, 178(2) :661–667.
- [Tartaglia et al., 1993] Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H. W., and Goeddel, D. V. (1993). A novel domain within the 55 Kd TNF receptor signals cell-death. *Cell*, 74(5) :845–853.
- [Tauzin et al., 2011] Tauzin, S., Chaigne-Delalande, B., Selva, E., Khadra, N., Daburon, S., Contin-Bordes, C., Blanco, P., Le Seyec, J., Ducret, T., Counillon, L., Moreau, J.-F., Hofman, P., Vacher, P., and Legembre, P. (2011). The Naturally Processed CD95L Elicits a c-Yes/Calcium/PI3K-Driven Cell Migration Pathway. *PLOS Biology*, 9(6).
- [Taylor et al., 2008] Taylor, R. C., Cullen, S. P., and Martin, S. J. (2008). Apoptosis : controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3) :231–241.
- [Taylor et al., 2009] Taylor, R. J., Chan, S. L., Wood, A., Voskens, C. J., Wolf, J. S., Lin, W., Chapoval, A., Schulze, D. H., Tian, G., and Strome, S. E. (2009). FcgammaRIIIa polymorphisms and Cetuximab induced cytotoxicity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Immunol Immunother*, 58(7) :997–1006.
- [Tolcher, 2007] Tolcher (2007). Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of Mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor

- necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1 (vol 25, pg 1390, 2007). *Journal of Clinical Oncology*, 25(29) :4701–4701.
- [Tonegawa, 1983] Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 302(5909) :575–81.
- [Trarbach et al., 2010] Trarbach, T., Moehler, M., Heinemann, V., Kohne, C. H., Przyborek, M., Schulz, C., Sneller, V., Gallant, G., and Kanzler, S. (2010). Phase II trial of Mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets and activates the tumour necrosis factor apoptosis-inducing ligand receptor-1 (TRAIL-R1), in patients with refractory colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 102(3) :506–512.
- [Trauth et al., 1989] Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M., and Krammer, P. H. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, 245(4915) :301–5.
- [Trauzold et al., 2006] Trauzold, A., Siegmund, D., Schniewind, B., Sipos, B., Egberts, J., Zorenkov, D., Emme, D., Roder, C., Kalthoff, H., and Wajant, H. (2006). TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, 25(56) :7434–9.
- [Travert et al., 2008] Travert, M., Ame-Thomas, P., Pangault, C., Morizot, A., Micheau, O., Semana, G., Lamy, T., Fest, T., Tarte, K., and Guillaudeux, T. (2008). Cd40 ligand protects from trail-induced apoptosis in follicular lymphomas through nf-kappa b activation and up-regulation of c-flip and bcl-x(1). *Journal of Immunology*, 181(2) :1001–1011.
- [Truneh et al., 2000] Truneh, A., Sharma, S., Silverman, C., Khandekar, S., Reddy, M. P., Deen, K. C., Mclaughlin, M. M., Srinivasula, S. M., Livi, G. P., Marshall, L. A., Alnemri, E. S., Williams, W. V., and Doyle, M. L. (2000). Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors - DR5 is the highest affinity receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(30) :23319–23325.
- [Tschumi et al., 2018] Tschumi, B. O., Dumauthioz, N., Marti, B., Zhang, L., Schneider, P., Mach, J. P., Romero, P., and Donda, A. (2018). CAR-T cells are prone to Fas- and DR5-mediated cell death. *J Immunother Cancer*, 6(1) :71.
- [Tuthill et al., 2015] Tuthill, M. H., Montinaro, A., Zinngrebe, J., Prieske, K., Draber, P., Prieske, S., Newsom-Davis, T., von Karstedt, S., Graves, J., and Walczak, H. (2015). TRAIL-R2-specific antibodies and recombinant TRAIL can synergise to kill cancer cells. *Oncogene*, 34(16) :2138–2144.
- [Twomey et al., 2015] Twomey, J. D., Kim, S. R., Zhao, L. Q., Bozza, W. P., and Zhang, B. L. (2015). Spatial dynamics of TRAIL death receptors in cancer cells. *Drug Resistance Updates*, 19 :13–21.
- [Uchida et al., 2004] Uchida, J. J., Hamaguchi, Y., Oliver, J. A., Ravetch, J. V., Poe, J. C., Haas, K. M., and Tedder, T. F. (2004). The innate mononuclear phagocyte network depletes b lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *Journal of Experimental Medicine*, 199(12) :1659–1669.
- [Ulmer et al., 1993] Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dworki, V. J., Gromkowski, S. H., Deck, R. R., DeWitt, C. M., Friedman, A., and et al. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, 259(5102) :1745–9.
- [van der Horst et al., 2017] van der Horst, H. J., Overdijk, M. B., Breij, E. C. W., Chamuleau, M., Lokhorst, H. M., and Mutis, T. (2017). Potent ex vivo anti-tumor activity

- in relapsed refractory multiple myeloma using novel DR5-specific antibodies with enhanced capacity to form hexamers upon target binding. *Blood*, 130.
- [Van der Sloot et al., 2006] Van der Sloot, A. M., Tur, V., Szegezdi, E., Mullally, M. M., Cool, R. H., Samali, A., Serrano, L., and Quax, W. J. (2006). Designed tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand variants initiating apoptosis exclusively via the DR5 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(23) :8634–8639.
- [van Loghem and Litwin, 1972] van Loghem, E. and Litwin, S. D. (1972). Antigenic determinants on immunoglobulins of nonhuman primates. *Transplant Proc*, 4(1) :129–35.
- [van Noesel et al., 2002] van Noesel, M. M., van Bezouw, S., Salomons, G. S., Voute, P. A., Pieters, R., Baylin, S. B., Herman, J. G., and Versteeg, R. (2002). Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation. *Cancer Res*, 62(7) :2157–61.
- [Vanamee and Faustman, 2018] Vanamee, E. S. and Faustman, D. L. (2018). Structural principles of tumor necrosis factor superfamily signaling. *Sci Signal*, 11(511).
- [Varfolomeev et al., 2005] Varfolomeev, E., Maecker, H., Sharp, D., Lawrence, D., Renz, M., Vucic, D., and Ashkenazi, A. (2005). Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Biol Chem*, 280(49) :40599–608.
- [Vega et al., 2009] Vega, M. I., Huerta-Yepez, S., Martinez-Paniagua, M., Martinez-Miguel, B., Hernandez-Pando, R., Gonzalez-Bonilla, C. R., Chinn, P., Hanna, N., Hariharan, K., Jazirehi, A. R., and Bonavida, B. (2009). Rituximab-mediated cell signaling and chemo/immuno-sensitization of drug-resistant B-NHL is independent of its Fc functions. *Clin Cancer Res*, 15(21) :6582–94.
- [Verhagen et al., 2000] Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., and Vaux, D. L. (2000). Identification of diablo, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102(1) :43–53.
- [Vidarsson et al., 2014] Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispens, T. (2014). IgG subclasses and allotypes : from structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*, 5.
- [Vidarsson et al., 2007] Vidarsson, G., Stemerding, A. M., Stapleton, N. M., Rebers, F. E. M., de Haas, M., and de Winkel, J. G. J. V. (2007). FcRn : an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *European Journal of Clinical Investigation*, 37 :17–17.
- [Von Behring E, 1890] Von Behring E, K. S. (1890). über das zustandekommen der diphterie-immunität und der tetanus-immunität bei thieren. *Dtsch Med Wochenschr*, (49) :111–345.
- [von Karstedt et al., 2015] von Karstedt, S., Conti, A., Nobis, M., Montinaro, A., Hartwig, T., Lemke, J., Legler, K., Annewanter, F., Campbell, A. D., Taraborrelli, L., Grosse-Wilde, A., Coy, J. F., El-Bahrawy, M. A., Bergmann, F., Koschny, R., Werner, J., Ganten, T. M., Schweiger, T., Hoetzenecker, K., Kenessey, I., Hegedus, B., Bergmann, M., Hauser, C., Egberts, J. H., Becker, T., Rocken, C., Kalthoff, H., Trauzold, A., Anderson, K. I., Sansom, O. J., and Walczak, H. (2015). Cancer cell-autonomous TRAIL-R signaling promotes KRAS-driven cancer progression, invasion, and metastasis. *Cancer Cell*, 27(4) :561–73.

- [von Pawel et al., 2014] von Pawel, J., Harvey, J. H., Spigel, D. R., Dediu, M., Reck, M., Cebotaru, C. L., Humphreys, R. C., Gribbin, M. J., Fox, N. L., and Camidge, D. R. (2014). Phase II trial of Mapatumumab, a fully human agonist monoclonal antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1), in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Clinical Lung Cancer*, 15(3) :188–196.
- [Wagner et al., 2007] Wagner, K. W., Punnoose, E. A., Januario, T., Lawrence, D. A., Pitti, R. M., Lancaster, K., Lee, D., von Goetz, M., Yee, S. F., Totpal, K., Huw, L., Katta, V., Cavet, G., Hymowitz, S. G., Amler, L., and Ashkenazi, A. (2007). Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat Med*, 13(9) :1070–7.
- [Wajant, 2015] Wajant, H. (2015). Principles of antibody-mediated TNF receptor activation. *Cell Death and Differentiation*, 22(11) :1727–1741.
- [Wajant et al., 2001] Wajant, H., Moosmayer, D., Wuest, T., Bartke, T., Gerlach, E., Schonherr, U., Peters, N., Scheurich, P., and Pfizenmaier, K. (2001). Differential activation of TRAIL-R1 and-2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene*, 20(30) :4101–4106.
- [Wakelee et al., 2010] Wakelee, H. A., Patnaik, A., Sikic, B. I., Mita, M., Fox, N. L., Miceli, R., Ullrich, S. J., Fisher, G. A., and Tolcher, A. W. (2010). Phase I and pharmacokinetic study of Lexatumumab (HGS-ETR2) given every 2 weeks in patients with advanced solid tumors. *Annals of Oncology*, 21(2) :376–381.
- [Walczak et al., 1997] Walczak, H., DegliEsposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Timour, M. S., Gerhart, M. J., Schooley, K. A., Smith, C. A., Goodwin, R. G., and Rauch, C. T. (1997). TRAIL-R2 : A novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *Embo Journal*, 16(17) :5386–5397.
- [Walczak et al., 1999] Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R. G., Rauch, C. T., Schuh, J. C., and Lynch, D. H. (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med*, 5(2) :157–63.
- [Walsh, 2007a] Walsh, G. (2007a). *Pharmaceutical Biotechnology, concepts and applications*. John Wiley and Sons, West Sussex, England.
- [Walsh, 2007b] Walsh, G. (2007b). *Traditional polyclonal antibody preparations*, book section 13 Antibodies, vaccines and adjuvants, pages 371–373. Wiley, England.
- [Wandinger et al., 2003] Wandinger, K. P., Lunemann, J. D., Wengert, O., Bellmann-Strobl, J., Aktas, O., Weber, A., Grundstrom, E., Ehrlich, S., Wernecke, K. D., Volk, H. D., and Zipp, F. (2003). TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet*, 361(9374) :2036–2043.
- [Wang et al., 2009] Wang, C., Chen, T., Zhang, N., Yang, M., Li, B., Lu, X., Cao, X., and Ling, C. (2009). Melittin, a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting I κ B kinase-NF κ B. *J Biol Chem*, 284(6) :3804–13.
- [Wang et al., 2014a] Wang, C. Y., Thudium, K. B., Han, M. H., Wang, X. T., Huang, H. C., Feingersh, D., Garcia, C., Wu, Y., Kuhne, M., Srinivasan, M., Singh, S., Wong,

- S., Garner, N., Leblanc, H., Bunch, R. T., Blanset, D., Selby, M. J., and Korman, A. J. (2014a). In vitro characterization of the anti-pd-1 antibody nivolumab, bms-936558, and in vivo toxicology in non-human primates. *Cancer Immunology Research*, 2(9) :846–856.
- [Wang et al., 2014b] Wang, F., Lin, J. S., and Xu, R. A. (2014b). The molecular mechanisms of TRAIL resistance in cancer cells : Help in designing new drugs. *Current Pharmaceutical Design*, 20(42) :6714–6722.
- [Wang et al., 2014c] Wang, H. Z., Davis, J. S., and Wu, X. W. (2014c). Immunoglobulin Fc domain fusion to TRAIL significantly prolongs its plasma half-life and enhances its antitumor activity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(3) :643–650.
- [Wang et al., 2008] Wang, J., Lin, Z., Qiao, C. X., Lv, M., Yu, M., Xiao, H., Wang, Q. Y., Wang, L. Y., Feng, J. N., Shen, B. F., Ma, Y. F., and Li, Y. (2008). Characterization of a novel anti-DR5 monoclonal antibody WD1 with the potential to induce tumor cell apoptosis. *Cellular & Molecular Immunology*, 5(1) :55–60.
- [Wang, 2008] Wang, S. (2008). The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway. *Oncogene*, 27(48) :6207–6215.
- [Wang and El-Deiry, 2003] Wang, S. and El-Deiry, W. S. (2003). TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene*, 22(53) :8628–33.
- [Wang and Jeng, 2000] Wang, T. T. and Jeng, J. (2000). Coordinated regulation of two TRAIL-R2/KILLER/DR5 mRNA isoforms by DNA damaging agents, serum and 17beta-estradiol in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 61(1) :87–96.
- [Wang et al., 2018] Wang, X. H., Mathieu, M., and Brezski, R. J. (2018). IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein & Cell*, 9(1) :63–73.
- [Wang et al., 2017] Wang, Y., Yang, Y. J., Wang, Z., Liao, J., Liu, M., Zhong, X. R., Zheng, H., and Wang, Y. P. (2017). Cd55 and cd59 expression protects her2-overexpressing breast cancer cells from trastuzumab-induced complement-dependent cytotoxicity. *Oncology Letters*, 14(3) :2961–2969.
- [Ward et al., 1989] Ward, E. S., Gussow, D., Griffiths, A. D., Jones, P. T., and Winter, G. (1989). Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli. *Nature*, 341(6242) :544–6.
- [Wassenaar et al., 2008] Wassenaar, T. A., Quax, W. J., and Mark, A. E. (2008). The conformation of the extracellular binding domain of death receptor 5 in the presence and absence of the activating ligand TRAIL : A molecular dynamics study. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 70(2) :333–343.
- [Watanabe et al., 1998] Watanabe, N., Nomura, T., Takai, T., Chiba, T., Honjo, T., and Tsubata, T. (1998). Antigen receptor cross-linking by anti-immunoglobulin antibodies coupled to cell surface membrane induces rapid apoptosis of normal spleen B cells. *Scand J Immunol*, 47(6) :541–7.
- [Watier, 2009] Watier, H. (2009). De la sérothérapie aux anticorps recombinants nus. plus d’un siècle de succès en thérapie ciblée. *MEDECINE/SCIENCES*, 2009(25) :999–1009.
- [Wei et al., 2017] Wei, X. Y., Yang, X. Y., Zhao, W. B., Xu, Y. C., Pan, L. Q., and Chen, S. Q. (2017). Optimizing multistep delivery of pegylated tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand toxin conjugates for improved antitumor activities. *Bioconjugate Chemistry*, 28(8) :2180–2189.

- [Weiner, 2010] Weiner, G. J. (2010). Rituximab : mechanism of action. *Semin Hematol*, 47(2) :115–23.
- [Weinlich et al., 2010] Weinlich, R., Brunner, T., and Amarante-Mendes, G. P. (2010). Control of death receptor ligand activity by posttranslational modifications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(10) :1631–1642.
- [White et al., 2013] White, A. L., Chan, H. T., French, R. R., Beers, S. A., Cragg, M. S., Johnson, P. W., and Glennie, M. J. (2013). Fc γ RIIB controls the potency of agonistic anti-TNFR mAbs. *Cancer Immunol Immunother*, 62(5) :941–8.
- [White et al., 2015] White, A. L., Chan, H. T., French, R. R., Willoughby, J., Mockridge, C. I., Roghanian, A., Penfold, C. A., Booth, S. G., Dodhy, A., Polak, M. E., Potter, E. A., Ardern-Jones, M. R., Verbeek, J. S., Johnson, P. W., Al-Shamkhani, A., Cragg, M. S., Beers, S. A., and Glennie, M. J. (2015). Conformation of the human immunoglobulin g2 hinge imparts superagonistic properties to immunostimulatory anticancer antibodies. *Cancer Cell*, 27(1) :138–48.
- [Wiley et al., 1995] Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A., and Goodwin, R. G. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 3(6) :673–682.
- [Wilson et al., 2011] Wilson, N. S., Yang, B., Yang, A., Loeser, S., Marsters, S., Lawrence, D., Li, Y., Pitti, R., Totpal, K., Yee, S., Ross, S., Vernes, J. M., Lu, Y., Adams, C., Offringa, R., Kelley, B., Hymowitz, S., Daniel, D., Meng, G., and Ashkenazi, A. (2011). An Fc γ receptor-dependent mechanism drives antibody-mediated target-receptor signaling in cancer cells. *Cancer Cell*, 19(1) :101–13.
- [Wittebol et al.,] Wittebol, S., Ferrant, A., Wickham, N. W., Fehrenbacher, L., Durbin-Johnson, B., and Bray, G. L. Phase II-study of PRO95780 plus rituximab in patients with relapsed follicular non-hodgkin’s lymphoma (NHL). *Journal of Clinical Oncology*, 28(15) :abstract.
- [Wolchok et al., 2013] Wolchok, J. D., Hodi, F. S., Weber, J. S., Allison, J. P., Urban, W. J., Robert, C., O’Day, S. J., Hoos, A., Humphrey, R., Berman, D. M., Lonberg, N., and Korman, A. J. (2013). Development of Ipilimumab : a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. *Ann N Y Acad Sci*, 1291 :1–13.
- [Woof and Kerr, 2006] Woof, J. M. and Kerr, M. A. (2006). The function of immunoglobulin a in immunity. *J Pathol*, 208(2) :270–82.
- [Wu et al., 1999a] Wu, G. S., Burns, T. F., Zhan, Y., Alnemri, E. S., and El-Deiry, W. S. (1999a). Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor. *Cancer Research*, 59(12) :2770–2775.
- [Wu et al., 1998] Wu, H., Beuerlein, G., Nie, Y., Smith, H., Lee, B. A., Hensler, M., Huse, W. D., and Watkins, J. D. (1998). Stepwise in vitro affinity maturation of vitaxin, an α v β 3-specific humanized mAb. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11) :6037–42.
- [Wu et al., 1999b] Wu, H., Nie, Y., Huse, W. D., and Watkins, J. D. (1999b). Humanization of a murine monoclonal antibody by simultaneous optimization of framework and cdr residues. *J Mol Biol*, 294(1) :151–62.
- [Wu and Kakehi, 2009] Wu, X. X. and Kakehi, Y. (2009). Enhancement of Lexatumumab-induced apoptosis in human solid cancer cells by cisplatin in caspase-dependent manner. *Clinical Cancer Research*, 15(6) :2039–2047.

- [Xu et al., 2010] Xu, J., Zhou, J. Y., Wei, W. Z., and Wu, G. S. (2010). Activation of the Akt survival pathway contributes to TRAIL resistance in cancer cells. *Plos One*, 5(4).
- [Xue et al., 2009] Xue, T., Xue, X. P., Huang, Q. S., Wei, L., Sun, K., and Xue, T. (2009). Monoclonal antibodies against human aspartyl (asparaginyl) beta-hydroxylase developed by DNA immunization. *Hybridoma*, 28(4) :251–257.
- [Yang et al., 2006] Yang, D. H., Makhmoudova, A., Arif, B. M., Feng, Q., Retnakaran, A., Palli, S. R., and Krell, P. J. (2006). DNA versus protein immunisation for production of monoclonal antibodies against choristoneura fumiferana ecdysone receptor (CfEcR). *Vaccine*, 24(16) :3115–26.
- [Yang et al., 1995] Yang, W. P., Green, K., Pinzsweeney, S., Briones, A. T., Burton, D. R., and Barbas, C. F. (1995). Cdr walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-hiv-1 antibody into the picomolar range. *Journal of Molecular Biology*, 254(3) :392–403.
- [Yguerabide et al., 1970] Yguerabide, J., Epstein, H. F., and Stryer, L. (1970). Segmental flexibility in an antibody molecule. *J Mol Biol*, 51(3) :573–90.
- [Yonehara et al., 1989] Yonehara, S., Ishii, A., and Yonehara, M. (1989). A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med*, 169(5) :1747–56.
- [Yoshida et al., 2004] Yoshida, M., Claypool, S. M., Wagner, J. S., Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Roopenian, D. C., Lencer, W. I., and Blumberg, R. S. (2004). Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity*, 20(6) :769–783.
- [Yoshida et al., 2007] Yoshida, T., Shiraishi, T., Horinaka, M., Wakada, M., and Sakai, T. (2007). Glycosylation modulates TRAIL-R1/death receptor 4 protein : different regulations of two pro-apoptotic receptors for TRAIL by tunicamycin. *Oncol Rep*, 18(5) :1239–42.
- [Younes et al., 2010] Younes, A., Vose, J. M., Zelenetz, A. D., Smith, M. R., Burris, H. A., Ansell, S. M., Klein, J., Halpern, W., Miceli, R., Kumm, E., Fox, N. L., and Czuczman, M. S. (2010). A phase 1b/2 trial of Mapatumumab in patients with relapsed/refractory non-hodgkin’s lymphoma. *Br J Cancer*, 103(12) :1783–7.
- [Younes et al., 2006] Younes, M., Georgakis, G. V., Rahmani, M., Beer, D., and Younes, A. (2006). Functional expression of TRAIL receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in esophageal adenocarcinoma. *European Journal of Cancer*, 42(4) :542–547.
- [Zamai et al., 1998] Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I. M., Azzoni, L., Alnemri, E. S., and Perussia, B. (1998). Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity : Differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *Journal of Experimental Medicine*, 188(12) :2375–2380.
- [Zeng et al., 2006] Zeng, Y., Wu, X. X., Fiscella, M., Shimada, O., Humphreys, R., Albert, V., and Kakehi, Y. (2006). Monoclonal antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2 (TRAIL-R2) induces apoptosis in primary renal cell carcinoma cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Int J Oncol*, 28(2) :421–30.
- [Zhang et al., 2013] Zhang, C. H., Jin, K., Xiao, Y. L., Cheng, Y., Huang, Z. H., Wang, S. X., and Lu, S. (2013). Potent monoclonal antibodies against clostridium difficile toxin a elicited by DNA immunization. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 9(10) :2157–2164.

- [Zhang et al., 2016] Zhang, D., Goldberg, M. V., and Chiu, M. L. (2016). Fc engineering approaches to enhance the agonism and effector functions of an anti-ox40 antibody. *Journal of Biological Chemistry*, 291(53) :27134–27146.
- [Zhang et al., 1999] Zhang, G., Budker, V., and Wolff, J. A. (1999). High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther*, 10(10) :1735–7.
- [Zhang et al., 2004] Zhang, M. Y., Shu, Y., Rudolph, D., Prabakaran, P., Labrijn, A. F., Zwick, M. B., Lal, R. B., and Dimitrov, D. S. (2004). Improved breadth and potency of an hiv-1-neutralizing human single-chain antibody by random mutagenesis and sequential antigen panning. *J Mol Biol*, 335(1) :209–19.
- [Zhang et al., 2017] Zhang, X. L., Yang, Y. Y., Fan, D. M., and Xiong, D. S. (2017). The development of bispecific antibodies and their applications in tumor immune escape. *Experimental Hematology and Oncology*, 6.
- [Zhu et al., 2017] Zhu, Y. N., Bassoff, N., Reinshagen, C., Bhere, D., Nowicki, M. O., Lawler, S. E., Roux, J., and Shah, K. (2017). Bi-specific molecule against EGFR and death receptors simultaneously targets proliferation and death pathways in tumors. *Scientific Reports*, 7.
- [Zinonos et al., 2009] Zinonos, I., Labrinidis, A., Lee, M., Liapis, V., Hay, S., Ponomarev, V., Diamond, P., Zannettino, A. C. W., Findlay, D. M., and Evdokiou, A. (2009). Apomab, a fully human agonistic antibody to DR5, exhibits potent antitumor activity against primary and metastatic breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(10) :2969–2980.
- [Zou et al., 1999] Zou, H., Li, Y. C., Liu, H. S., and Wang, X. D. (1999). An Apaf-1 center dot cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry*, 274(17) :11549–11556.



Titre : Génération et caractérisation de nouveaux anticorps anti-DR4 et anti-DR5

Mots-clés : Immuno-Oncologie, Anticorps, Apoptose, DR4, DR5, Immunisation ADN

Résumé : Le développement d'anticorps thérapeutiques a suscité beaucoup d'intérêt au cours des dernières décennies. Plus de 30 d'entre eux ont été approuvés et sont utilisés pour traiter des patients atteints de cancer. Les récepteurs agonistes de TRAIL (DR4 ou DR5) sont surexprimés par les cellules tumorales et capables de déclencher leur mort. Ils représentent donc des cibles idéales. Malgré des résultats encourageants, la plupart des essais cliniques basés sur des anticorps monoclonaux ciblant DR4 ou DR5 ont été interrompus. Cependant, les connaissances actuelles ouvrent des perspectives thérapeutiques de choix pour l'utilisation de tels anticorps en oncologie. Afin de développer de nouveaux anticorps anti-DR4 et anti-DR5 reconnaissant sélectivement les protéines natives d'intérêt, et doués de propriétés antitumorales, nous avons opté pour une approche d'immunisation génique basée sur des injections hydrodynamiques d'ADN complémentaire. Cette approche nous a permis d'obtenir des réponses humorales significatives, et après fusions des rates correspon-

dantes, de générer 21 anticorps monoclonaux capables de reconnaître spécifiquement et avec une très grande affinité les récepteurs DR4 ou DR5, sous leurs formes natives. Parmi ces anticorps monoclonaux, deux sont doués de propriétés pro-apoptotiques, et quatre sont capables d'accroître le potentiel pro-apoptotique du ligand TRAIL. Les propriétés antitumorales de l'anticorps anti-DR4 le plus puissant, l'AcM-C#16, ont également été validées in-vivo dans des modèles de xéno-greffes.

L'ensemble de ce travail démontre, et ce pour la première fois, que la méthode d'immunisation ADN par injection hydrodynamique peut être utilisée pour générer des anticorps monoclonaux thérapeutiques efficaces ciblant des récepteurs de la superfamille du TNF. Au-delà du système TRAIL, cette approche d'immunisation, peu exploitée, pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques en l'adaptant à de nouvelles cibles.

Title : Development of new antibodies targeting DR4 and DR5

Keywords : Immune-Oncology, Antibody, Apoptosis, DR4, DR5, DNA Immunization

Abstract : Development of therapeutic antibodies has attracted many interests in recent decades. More than 30 of them have been approved and are used to treat cancer patients. TRAIL agonist receptors (DR4 or DR5) are overexpressed by the tumour cells and are able to trigger their death. Therefore, they represent ideal targets. Despite encouraging results, most clinical trials based on monoclonal antibodies targeting DR4 or DR5 have been discontinued. However, the current knowledge opens therapeutic perspectives of choice for the use of such antibodies in oncology. In order to develop new anti-DR4 and anti-DR5 antibodies recognizing selectively the native form of the proteins of interest, and endowed with antitumor properties, we have chosen to perform a gene immunization approach based on hydrodynamic injections of complementary DNA. This approach allowed us to obtain significant humo-

ral responses, and after fusions of the corresponding spleens, to generate 21 monoclonal antibodies capable of recognizing specifically and with a very high affinity the DR4 or DR5 receptors, in their native forms. Of these monoclonal antibodies, two are endowed with pro-apoptotic properties, and four are capable of increasing the pro-apoptotic potential of the TRAIL ligand. The antitumor properties of the most potent anti-DR4 antibody, mAb-C16, have also been validated using in-vivo xenografts models.

All of this work demonstrates, for the first time, that the DNA immunization hydrodynamic injection method can be used to generate therapeutically effective monoclonal antibodies targeting TNF superfamily receptors. Beyond the TRAIL system, this immunization approach, little exploited, could open new therapeutic perspectives by adapting it to new targets.