

THÉRAPEUTIQUE

Anticorps recombinants : vers un renouveau de la sérothérapie anti-scorpionique ?

J. Muzard (1), P. Billiald (1, 2), M. Goyffon (1) & N. Aubrey (2)

(1) USM 505, CP 39, Muséum national d'histoire naturelle. 12, rue Buffon. 75231 Paris Cedex 05, France.

(2) Faculté de pharmacie. Laboratoire de biochimie générale et biothérapies. 31, avenue Monge. 37200 Tours, France.

Manuscrit n° 2751. "Thérapeutique". Reçu le 23 décembre 2004. Accepté le 20 juin 2005.

Summary: Recombinant antibodies: a new application in scorpion envenomation?

Serotherapy is the only specific treatment for envenomation. The antibodies are obtained after the purification of serum from hyperimmunised horses and are used after fragmentation in the form of polyclonal Fab or F(ab)'₂. The anti-venom sera are heterogeneous, and their protective effect is often weak. The administration of these preparations induces risks of immediate or delayed side effects: hypersensitivity reactions, anaphylactic shock and serum sickness.

This observation led us to develop new forms of antibodies produced by molecular engineering, capable of specifically neutralizing the neurotoxins responsible for the toxicity of the venom of *Androctonus australis* Hector. The recombinant antibody fragments are more homogeneous than conventional antivenoms and perfectly characterized in terms of specific activity. The method used to obtain them eliminates the risk of transmission by non-conventional transmissible agents. The earliest results confirm the importance of these new molecules (scFv, recombinant Fab, diabody, triabody) and their ability to neutralize the action of scorpion neurotoxins.

They could open the path to a new generation of more homogeneous antivenoms that are better tolerated and have well-characterized intrinsic properties.

Résumé :

La sérothérapie est le seul traitement spécifique des envenimations. Les anticorps d'origine équine sont obtenus après purification du sérum d'animaux hyperimmunisés et sont utilisés après fragmentation sous forme de Fab ou de F(ab)'₂ polyclonaux. Les sérums antivenimeux sont hétérogènes et leur pouvoir protecteur variable reste souvent faible. L'administration de ces préparations comporte des risques d'effets indésirables : réactions d'hypersensibilité, choc anaphylactique, maladie sérique.

Ce constat nous a conduit à développer de nouveaux formats d'anticorps issus de l'ingénierie moléculaire, capables de neutraliser spécifiquement les quelques neurotoxines à l'origine de la toxicité du venin d'*Androctonus australis* Hector. Les fragments d'anticorps recombinants sont plus homogènes que les antivenins conventionnels et parfaitement caractérisés en terme d'activité spécifique. Leur méthode d'obtention élimine le risque de transmission d'agents pathogènes non conventionnels.

Les premiers résultats obtenus confirment le pouvoir protecteur de ces molécules, ce qui pourrait ouvrir la voie à une nouvelle génération d'agents thérapeutiques plus homogènes, mieux tolérés et aux propriétés intrinsèques bien caractérisées.

scorpion
neurotoxin
antivenom
passive immunotherapy
recombinant antibody
molecular engineering

scorpion
neurotoxine
antivenin
immunothérapie passive
anticorps recombinant
ingénierie moléculaire

Dans les pays où cohabitent scorpions et serpents venimeux dangereux, la létalité due aux piqûres de scorpions est la plus importante (Mexique). Cette observation illustre la gravité de l'envenimation scorpionique qui est liée à la présence dans le venin de neurotoxines basiques, de faible masse molaire qui sont parmi les plus puissantes décrites à ce jour dans le règne animal. Ces polypeptides, hautement diffusibles, agissent sur les canaux sodium des cellules nerveuses et musculaires. Les effets toxiques sont essentiellement périphériques et d'intensité variable (6). Dans un petit nombre de cas, ils conduisent à la mort par défaillance cardio-vasculaire brutale et/ou oedème pulmonaire. Les enfants et les personnes âgées sont les plus exposés. On estime que l'espèce *Androc-*

tonus australis est responsable de 80 % des cas de piqûres de scorpion en Afrique du nord. L'effet létal de son venin, évalué sur la souris de laboratoire, est dû essentiellement à trois neurotoxines représentant moins de 5 % du poids sec du venin. Ces toxines, constituées d'une soixantaine de résidus d'acides aminés, présentent de fortes homologues structurales et appartiennent à deux groupes immunologiques représentés par AabI et AabII (9).

La sérothérapie est aujourd'hui encore le seul traitement spécifique des envenimations scorpioniques, même si son intérêt en l'état actuel est souvent discuté, parfois contesté. Elle repose le plus souvent sur l'utilisation de fragments Fab et F(ab)'₂ polyclonaux obtenus par protéolyse ménagée d'anticorps

équins. La masse molaire de ces fragments d'anticorps reste très supérieure à celle des toxines de sorte qu'ils diffusent beaucoup plus lentement et moins profondément dans les tissus. La principale conséquence en est une perte d'efficacité du sérum lorsqu'augmente le délai séparant l'envenimation de l'utilisation du sérum. À cela s'ajoutent des risques d'effets indésirables liés à l'origine des antivenins. Les fragments Fab ou F(ab')₂ polyclonaux injectés aux patients sont mieux tolérés que les immunoglobulines (Ig) entières mais n'excluent pas totalement les réactions d'intolérance immédiate (réactions érythémateuses, fièvre, choc anaphylactique) ou retardées (maladie sérique). Les antisérums restent mal caractérisés, les produits de protéolyse sont chimiquement hétérogènes et le titre neutralisant des sérums varie sensiblement d'un lot à l'autre d'où, parfois, la mise en cause de leur efficacité. L'utilisation d'IgG de mouton mieux tolérées que les IgG de cheval a été suggérée, mais la réceptivité des ovins à certains agents transmissibles non conventionnels (tremblante) rend discutable l'emploi d'immunsérums provenant de ces espèces.

Au cours du XX^e siècle, quelques améliorations dans la préparation des antivenins ont pu être notées : élimination de protéines sériques immunogènes, utilisation de fragments d'anticorps polyclonaux : Fab ou F(ab')₂. Pour nombre d'auteurs, aucun progrès majeur n'a été accompli, même si les méthodes d'isolement des fragments actifs d'anticorps ont sensiblement évolué (13). Cependant, ce constat récent demande à être nuancé. Il est maintenant possible de concevoir de nouveaux formats de fragments d'anticorps actifs aux propriétés mieux adaptées à des applications spécifiques et de

les produire dans des organismes génétiquement modifiés. La figure 1 en donne un aperçu. L'ADNc codant des fragments Fab ou F(ab')₂ recombinants identiques à ceux qui sont issus de la protéolyse ménagée des anticorps peut être cloné dans des vecteurs d'expression. Il peut être ensuite modifié pour produire des fragments chimérisés constitués de domaines variables d'origine murine et de domaines constants CH1 et CL humains, mieux tolérés par l'organisme receveur. Des fragments d'anticorps peuvent encore être humanisés après incorporation des séquences hypervariables d'origine murine (*complementary determining regions* [CDR]) entre les séquences « charpentes » (*frameworks* [FR]) des régions variables d'Ig humaines. De nouveaux formats d'anticorps thérapeutiques sont même envisageables (figure 1). Les fragments scFv (pour « fragment variable simple chaîne ») constitués uniquement des domaines variables d'un anticorps dont l'association est stabilisée par un lien peptidique sont les structures minimales capables de reconnaître un antigène. Leur petite taille favorise une diffusion rapide dans les tissus profonds. Selon la taille du lien peptidique, les scFv sont produits sous la forme de monomères monovalents (25 kDa), de dimères bivalents (diabody, 50 kDa) ou de multimères multivalents (triabody, tétrabody, pentabody) mono- ou bispécifiques. Chacun possède des caractéristiques structurales propres qui lui confèrent des propriétés pharmacocinétiques nouvelles et il est intéressant d'en évaluer les qualités dans la perspective d'une intervention thérapeutique consécutive à une envenimation scorpionique.

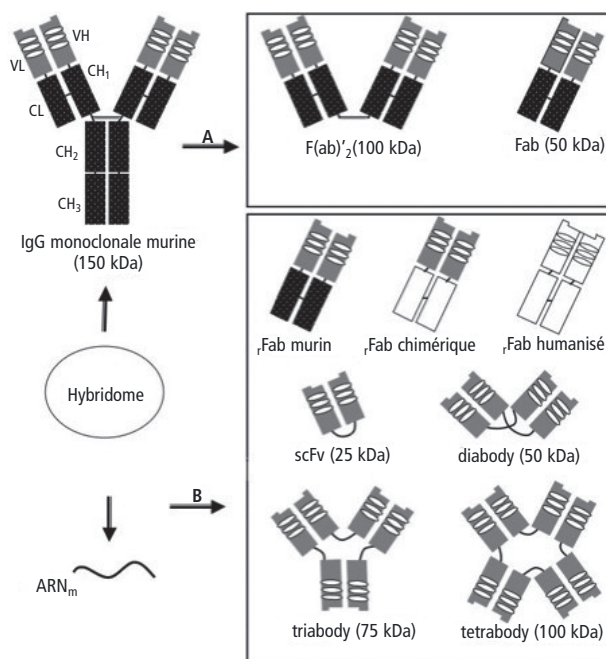
L'obtention d'anticorps monoclonaux dirigés contre les neurotoxines de scorpion est difficile en raison de la haute toxicité de ces molécules pour la souris, de leur faible masse moléculaire et de leur immunogénicité réduite. Moins de cinq anticorps monoclonaux neutralisant des toxines scorpioniques ont été décrits à ce jour, toutes espèces confondues (4, 5, 8). Parmi ceux-ci, les IgG 9C2 et 4C1, respectivement dirigés contre les neurotoxines *AabI* et *AabII* d'*Androctonus australis* ont été obtenus après immunisation de souris avec les toxines préalablement isolées et éventuellement couplées à une protéine porteuse. Ces deux anticorps, pré-incubés avec le venin d'*A. australis*, en neutralisent les effets létaux lorsque le mélange est injecté à des souris par voie sous cutanée (5). Les hybridomes sécrétants de ces anticorps nous ont donc servi de support pour développer, construire et évaluer le potentiel thérapeutique de fragments scFv, diabody et Fab recombinants.

Un Fab recombinant (rFab) constitué de la chaîne légère de l'IgG 9C2 associée au fragment Fd correspondant conservant les propriétés fonctionnelles de l'anticorps parental en terme de spécificité, d'affinité et de pouvoir neutralisant (3). Toutefois, on note que les rFab sont des molécules difficiles à produire dans les systèmes d'expression procaryotiques et, dans le cas particulier du rFab 9C2, le rendement en molécules actives après purification reste extrêmement faible. D'autres auteurs rapportent également des difficultés à produire en quantité un Fab recombinant chimérique dirigé contre la neurotoxine CnII du scorpion mexicain *Centruroides noxius* (11). Des systèmes d'expression autres que le système bactérien pourraient être mieux adaptés (10).

Exprimés sous forme de scFv solubles (25 kDa), les domaines variables de l'anticorps 9C2 sont produits en quantité suffisante pour une évaluation de leurs propriétés structurales et fonctionnelles, mais ces molécules, même si elles sont hautement diffusibles dans les tissus profonds, sont très rapidement éliminées par voie rénale. Leur demi-vie, de quelques minutes

Figure 1.

Fragments d'anticorps monoclonaux produits à partir d'hybridomes murins par fragmentation enzymatique (A) ou ingénierie moléculaire (B).
Monoclonal antibodies fragments produced from murine hybridomae by enzymatic fragmentation (A) or molecular engineering (B).



A) les fragments F(ab')₂ et Fab sont respectivement obtenus par traitement des IgG à la pepsine ou à la papaine.

B) des fragments Fab, mais aussi de nouveaux formats d'anticorps peuvent être obtenus après clonage, modification et expression dans des organismes transgéniques de l'ADNc codant les domaines variables et constants des anticorps.

VH et VL représentent respectivement les domaines variables issus des chaînes lourde et légère d'un anticorps, responsables de la liaison à l'antigène. Les CDRs sont les boucles hypervariables de l'anticorps, responsables de la spécificité de reconnaissance antigénique. CL, CH1, CH2 et CH3 indiquent les domaines constants d'anticorps. Les domaines constants et les régions charpentes des domaines variables d'anticorps d'origine humaine sont représentés en blanc.

seulement, est trop courte pour une efficacité thérapeutique maximale sauf à les administrer en perfusion continue, à disposer en conséquence de la quantité suffisante et sans préjuger des effets sur le rein (1).

Dans le format diabody, la taille du lien peptidique joignant les domaines VH et VL du scFv a été réduite de sorte que de nouvelles contraintes stériques apparaissent, empêchant les domaines VH et VL d'une même sous-unité de s'associer en une structure fonctionnelle. Il se forme alors des dimères (50 kDa) dans lesquels les domaines VH et VL de deux sous-unités différentes s'associent pour former le site de liaison à la toxine. Le diabody constitué des domaines variables de l'anticorps 9C2 est bivalent, très stable et son pouvoir protecteur élevé. Ainsi, l'injection par voie intrapéritonéale de 20 µg de diabody 9C2 protège la totalité des souris ayant reçu dix minutes auparavant l'équivalent de 2 DL50 de toxine *AabI* administrées par voie sous-cutanée. Ces résultats obtenus avec une injection différée de l'antidote, comme c'est le cas dans le cadre d'une envenimation naturelle, démontrent clairement le potentiel thérapeutique de ces nouveaux anticorps (2). Leur activité spécifique est plus de 400 fois supérieure à celle des antivenins conventionnels constitués de protéines hétérologues, très hétérogènes et qui sont perfusées en quantités élevées, allant jusqu'à 2 g, pour traiter des envenimations sévères.

Même si la molécule diabody dérivée de l'anticorps 9C2 neutralise les toxines immunologiquement apparentées à *AabI*, la protection vis-à-vis du venin entier d'*A. australis* ne sera satisfaisante que si les deux groupes immunologiques de neurotoxines actives sur les canaux sodium sont neutralisées. Pour cela, il est maintenant nécessaire d'évaluer les effets d'un cocktail de diabodys, l'un dérivé de l'anticorps 9C2, l'autre dérivé de l'anticorps 4C1 ou de développer de nouveaux formats d'anticorps polyspécifiques. Plusieurs agencements des domaines variables des anticorps 9C2 et 4C1 peuvent alors être envisagés de façon à créer des molécules bispécifiques. Il est aussi envisageable d'améliorer l'affinité de ces anticorps, voire d'en moduler la spécificité et ainsi de concevoir des antivenins polyvalents, constitués d'un petit nombre de fragments d'anticorps. Des travaux récents réalisés avec des antigènes autres que des toxines en montrent la faisabilité (14).

Les sérums antivenimeux utilisés à l'heure actuelle ne sont très certainement que des antidotes de première génération. La manipulation *in vitro* des anticorps, notamment par les techniques de génie génétique, a donné naissance au cours des cinq à dix dernières années à de nouvelles molécules thérapeutiques dans des domaines variés qui constituent des priorités dans les pays industrialisés (oncologie, maladies cardio-vasculaires, infectiologie, rhumatologie, traitements immunosuppresseurs) (12). Le Rituximab®, l'Abciximab® et le Palivizumab® en sont des exemples significatifs. Toutes ces molécules sont issues d'anticorps monoclonaux murins qui ont été chimérisés ou humanisés afin d'en réduire l'immunogénicité.

Les travaux récents menés dans plusieurs laboratoires montrent bien l'intérêt des anticorps recombinants lorsqu'ils sont dirigés contre des toxines scorpioniques (2, 7). Toutefois,

avant que ces études laissent entrevoir des améliorations considérables en sérothérapie antivenimeuse, il faudra surmonter des contraintes géopolitiques et socio-économiques qui font toujours du scorpionisme une pathologie orpheline.

Références bibliographiques

- ADAMS GP & SCHIER R – Generating improved single-chain Fv molecules for tumor targeting. *J Immunol Methods*, 1999, **231**, 249-260.
- AUBREY N, DEVAUX C, SIZARET PY, ROCHAT H, GOYFFON M & BILLIALD P – Design and evaluation of a diabody to improve protection against a potent scorpion neurotoxin. *Cell Mol Life Sci*, 2003, **60**, 617-628.
- AUBREY A, MUZARD J, PETER JC, ROCHAT H, GOYFFON M *et al.* – Engineering of a recombinant Fab from a neutralizing IgG directed against scorpion neurotoxin *Aahl*, and functional evaluation versus other antibody fragments. *Toxicon*, 2004, **43**, 233-241.
- BAHRAOUI E, PICHON J, MULLER JM, DARBON H, EL AYEY M, GRANIER C, MARVALDI J & ROCHAT H – Monoclonal antibodies to scorpion toxins. Characterization and molecular mechanisms of neutralization. *J Immunol*, 1988, **141**, 214-220.
- CLOT-FAYBESSE O, JUIN M, ROCHAT H & DEVAUX C – Monoclonal antibodies against the *Androctonus australis* Hector scorpion neurotoxin I: characterisation and use for venom neutralisation. *FEBS Lett*, 1999, **458**, 313-318.
- GOYFFON M, VACHON M & BROGLIO N – Epidemiological and clinical characteristics of the scorpion envenomation in Tunisia. *Toxicon*, 1982, **20**, 337-344.
- JUAREZ-GONZALEZ VR, RIANO-UMBARILA L, QUINTERO-HERNANDEZ V, OLAMENDI-PORTUGAL T, ORTIZ-LEON M *et al.* – Directed evolution, phage display and combination of evolved mutants: a strategy to recover the neutralization properties of the scFv version of BCF2 a neutralizing monoclonal antibody specific to scorpion toxin Cn2. *J Mol Biol*, 2005, **346**, 1287-1297.
- LICEA AF, BECERRIL B & POSSANI LD – Fab fragments of the monoclonal antibody BCF2 are capable of neutralizing the whole soluble venom from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon*, 1996, **34**, 843-847.
- MARTIN MF & ROCHAT H – Large scale purification of toxins from the venom of the scorpion *Androctonus australis* Hector. *Toxicon*, 1986, **24**, 1131-1139.
- SCHILLBERG S, FISHER R, & EMANS N – Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cell Mol Life Sci*, 2003, **60**, 433-445.
- SELISKO B, COSIO G, GARCIA C, BECERRIL B, POSSANI LD & HORJALES E – Bacterial expression, purification and functional characterization of a recombinant chimeric Fab derived from murine mAb BCF2 that neutralizes the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon*, 2004, **43**, 43-51.
- STACY KM – Therapeutic Mabs: Saving lives and making billions. *The Scientist*, 2005, **19**, 17-19.
- THEAKSTON RD, WARRELL DA & GRIFFITHS E – Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*, 2003, **41**, 541-557.
- ZAHND C, SPINELLI S, LUGINBUHL B, AMSTUTZ P, CAMBILLAU C & PLUCKTHUN A – Directed *in vitro* evolution and crystallographic analysis of a peptide-binding single chain antibody fragment (scFv) with low picomolar affinity. *J Biol Chem*, 2004, **279**, 18870-18877.